

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

## **FONTES DE GORDURA NA DIETA DE VACAS EM LACTAÇÃO**

**José Esler de Freitas Júnior**

Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL  
2012

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

## **FONTES DE GORDURA NA DIETA DE VACAS EM LACTAÇÃO**

**José Esler de Freitas Júnior**

**Orientador: Prof. Dr. Mauro Dal Secco de Oliveira**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó**

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

JABOTICABAL – SP  
Março de 2012

F866f Freitas Júnior, José Esler.  
Fontes de gordura na dieta de vacas em lactação / José Esler de  
Freitas Júnior. – – Jaboticabal, 2012  
xix, 120 f. : il ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012  
Orientador: Mauro Dal Secco de Oliveira  
Banca examinadora: Arlindo Saran Netto, Marcos Veiga dos  
Santos, Atushi Sugohara, Jane Maria Bertocco Ezequiel  
Bibliografia

1. Vacas leiteiras. 2. Dinâmica ruminal. 3. Lipídios. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.085:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço  
Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** FONTES DE GORDURA NA DIETA DE VACAS EM LACTAÇÃO

**AUTOR:** JOSÉ ESLER DE FREITAS JÚNIOR

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. MAURO DAL SECCO DE OLIVEIRA

**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. FRANCISCO PALMA RENNÓ

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

Prof. Dr. MAURO DAL SECCO DE OLIVEIRA

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

Prof. Dra. JANE MARIA BERTOCCO EZEQUIEL

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

Prof. Dr. ATUSHI SUGOHARA

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

Prof. Dr. ARLINDO SARAN NETTO

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos de Pirassununga - USP

Prof. Dr. MARCOS VEIGA DOS SANTOS

Departamento de Nutrição e Produção Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP / Pirassununga/SP

Data da realização: 24 de fevereiro de 2012.

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**JOSÉ ESLER DE FREITAS JÚNIOR** – nascido em 06 de agosto de 1981 TAIÓBEIRAS-MG, filho de José Ferreira de Freitas e Anália de Oliveira Freitas, concluiu a sua carreira pré-acadêmica na Escola Agrotécnica Federal de Salinas-EAFSAL– MG, finalizando seus estudos em nível de ensino médio no ano de 1999. Em março de 2002, ingressou no curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), onde foi monitor das disciplinas de Bromatologia e Análise de Alimentos e Anatomia dos Animais Domésticos durante dois anos exercendo atividades de pesquisa, ensino e extensão. Recebeu premiação pelo Conselho Regional de Medicina Veterinária e Zootecnia do Estado de Minas Gerais como melhor aluno entre os formandos do curso de Zootecnia do ano 2006. Ao longo da graduação desenvolveu pesquisas nas áreas de nutrição inclusive com experimento de transição em vacas leiteiras sob orientação dos Profs. Dr. Vicente Ribeiro Rocha Júnior e o Prof. Dr. Francisco Palma Rennó. Em março de 2007, iniciou o curso de Mestrado em Medicina Veterinária pela Universidade de São Paulo na área de concentração em Nutrição e Produção Animal, sob a orientação do prof. Dr. Francisco Palma Renno, concluindo o mesmo em dezembro de 2008. Em março de 2009, ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal sob orientação do Prof. Dr. Mauro Dal Secco de Oliveira com a coorientação do Prof. Dr. Francisco Palma Rennó. Atualmente é bolsista de Doutorado do CNPq, desenvolvendo pesquisas junto aos grupos de nutrição em bovinos leiteiros da UNESP de Jaboticabal e da Universidade de São Paulo de Pirassununga. É membro da American Dairy Science Association (ADSA) desde março de 2009.

*Aprendi que o sucesso é consequência natural do empenho, da dedicação, da doação e do esforço pessoal, pois essas atitudes permitirão que mostremos o nosso melhor. O segredo é permanecer na busca incessante pelo aprimoramento e evolução. A recompensa será a obtenção de resultados cada vez melhores.*

*O único lugar onde o sucesso vem antes do trabalho é no dicionário (Albert Einstein/Físico Alemão)*

*E mesmo que meus passos sejam falsos, mesmo que meus caminhos sejam errados, mesmo que meu jeito de levar a vida incomode, eu sei quem sou... e sei pelo que devo lutar, e se você acha que meu orgulho é grande, é porque nunca viu o tamanho da minha fé." (Tião Carreiro)*

## ***DEDICO***

Aos meus pais José Ferreira de Freitas e Anália de Oliveira Freitas por doarem carinho, dedicação e amor por anos a fio educando-me, sem tolher a liberdade, tão necessária ao desenvolvimento do espírito crítico, abrindo mão de quase tudo, emocional e financeiramente para me dar estrutura, possibilitando avanço da formação profissional e o meu crescimento como pessoa através da educação;

Ao meu irmão Kleser e sua esposa Eliane pelo apoio e auxílio imprescindível durante a minha vida acadêmica;

A minha irmã Mara e ao seu marido Denílson pelo apoio moral, companheirismo, auxílio, dedicação para com a minha pessoa que me faz hoje uma pessoa melhor;

Aos meus primos Reubeth, Zaqueu, Josielly, e minha Tia Anísia pelo apoio e acolhimento durante os meus anos acadêmicos;

A minha prima Silvia e seu marido Frabício pela convivência e aprendizado durante as nossas conversas na minha jornada acadêmica;

Aos meus padrinhos Aparecida (minha segunda mãe) e Sílvia pela indiscutível, essencial e especial ajuda e acolhimento durante meus anos acadêmicos, sempre colaborando e sendo essenciais para minha formação profissional e pessoal;

A todos os funcionários da Escola Estadual João Porfírio (Salinas, MG), pelo apoio a minha mãe e indiretamente a mim, para conclusão de mais esta fase da minha vida;

Ao meus avós Maria (Vó Maria), e Ercilia (Vó Cila) que em minha vida torceram e oraram por mim por cada novo desafio, e conquistas sejam elas pequenas ou grandes;  
Ao meu co-orientador Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, que me ressaltou a importância do esforço e dedicação ao trabalho, e a preservação da confiança e da cordialidade no trabalho e na vida;

*Dedico este trabalho com imensa gratidão*



## ***AGRADECIMENTOS***

À Deus por tornar tudo possível;

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade de realização do curso de Doutorado;

À Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal pelo acolhimento durante o meu curso de Doutorado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo, que gerou tranquilidade e possibilitou a dedicação intensa e exclusiva a este trabalho;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela concessão de auxílio à pesquisa que possibilitou a realização deste estudo;

Ao meu co-orientador e amigo Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, pela ajuda, pela competência, pelo profissionalismo, pelos ensinamentos, pela confiança, pela paciência, imprescindível apoio, e dedicação dispensada, que possibilitaram a geração dos resultados, que hoje, com orgulho, apresento;

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Mauro Dall Seco de Oliveira, pela orientação, pela competência, pelo profissionalismo, e principalmente pela confiança em mim depositada durante o meu curso de Doutorado;

Ao professor Kevin Havartine (Universidade da Pensilvânia- EUA) pela ajuda, assistência na preparação e processamentos dos dados, pela competência, pelo profissionalismo, pela paciência, imprescindível apoio, e dedicação dispensada, que possibilitaram a geração dos resultados;

A Caroline minha namorada, pelo companherismo e apoio na condução das análises e no processo de elaboração deste estudo;

À Marina, minha amiga e companheira, que sempre me apoiou durante o tempo em que estamos juntos, me escutando, auxiliando, tornando-me uma pessoa melhor a cada dia em sua companhia e fazendo me enxergar e aprender a vida de uma forma melhor;

Aos colegas de Doutorado Jefferson Gandra, Rafael Barletta, Lenita Verdurico, Vitor Bettero, e aos estudantes de mestrado, Roldolfo Mingoti, Cybele Emilia, Gustavo Ferreira, Gustavo Ferreira de Almeida e Tiago Del Valle;

Em especial agradeço a Beatriz Venturelli, Mayara Clepf, Rodrigo Gardinal, Elmerison Ferreira, e ao Gustavo Calomeni que foram de extrema importância para condução do experimento e realização das análises laboratoriais. Aos estudantes de Iniciação Científica Thiago Vendramini, Vanessa Lacuna, Bruna Venevento, Caio Takiya, e a Karin Akimi Koyama pela ajuda durante a condução do experimento;

A minha colega de pós-doutorado Taissa Canaes pela atenção companherismo, e ajuda sempre disponível com extrema dedicação;

Ao Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Ignês Leão e ao Sr. Joécio de Paula do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa pela atenção e pelos ensinamentos diante da grande competência e experiência no processo cirúrgico dos animais;

Ao Prof<sup>a</sup>. Dra. Angélica Simone Cravo Pereira do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ/USP, pelos ensinamentos, pela amizade, nos anos em que convivemos sempre me ajudando gerando oportunidades na minha vida acadêmica no meu mestrado e doutorado;

Aos funcionários do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, Lenon Zero da Silva, José Carlos Corrêa, Diogo Constate Martinelli, Lupércio Miguel Marchetti, João Batista da Silva.

Ao Sr. Antônio Carlos Bueno da Silva (Carlinhos) pelo apoio durante a realização e recuperação da cirurgia de implantação das cânulas dos animais;

À todos os professores do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP);

Ao Prof. Dr. Luis Felipe Prada e Silva pela atenção durante o desolvimento dos protocolos de coleta; Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Mazza Rodriguez pela atenção e auxílio durante o meu curso; À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Navajas Rennó, da Universidade Federal de Viçosa – UFV, pela atenção, auxílio e importante participação na obtenção dos resultados;

A empresa Química Geral do Nordeste – QGN e Church & Dwight, pela doação de produtos para a realização deste estudo;

Aos funcionários da Secretaria do VNP, Sr. Fábiana e Sra. Alessandra de Cássia T. da Silva, e João Paulo pelo apoio e atenção dispensadas;

Ao Sr. Ari Luiz de Castro, Sr. Gilson Luiz Alves de Godoy, Sr<sup>a</sup>. Simi Luiza Durante Aflalo Robassini, e Sr<sup>a</sup>. Isabel das Graças Ramos, funcionários do Laboratório de

Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, pelo imprescindível auxílio na realização das análises laboratoriais;

À Sra. Leonila Ester Reinert Raspantini e Sr. Paulo Cesar Fabrício Raspantini, técnicos do Centro de Pesquisas Toxicológicas (CEPTOX) do Departamento de Patologia da FMVZ-USP, pelo aprendizado e pela nossa amizade;

Aos funcionários da Fabrica de Ração da PCAPS, Srs. Cláudio de Jesus Aparecido São Romão, Israel Andrietta e José Luiz Aparecido Landgraf, agradeço a atenção dispensada;

À Sr<sup>a</sup>. Tânia a senhora Amélia e ao Sr. Edílson, da Assistência Social da PCAPS, pela atenção durante os anos em que estive na USP;

À todos os estagiários que me auxiliaram na realização deste trabalho;

## SUMÁRIO

|                                                        | Pág.      |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| <b>FONTES DE GORDURA NA DIETA DE VACAS EM LACTAÇÃO</b> |           |
| RESUMO.....                                            | xviii     |
| <b>FAT SOURCES IN THE DIET OF COWS ON LACTATION</b>    |           |
| SUMMARY .....                                          | xx        |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                              | <b>01</b> |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>                   | <b>03</b> |
| 2.1 Ácidos graxos em dietas de ruminantes.....         | 03        |
| 2.2 Digestão e metabolismo de ácidos graxos.....       | 06        |
| 2.3 Fluxo intestinal de ácidos graxos.....             | 14        |
| 2.4 Consumo de matéria seca.....                       | 18        |
| 2.5 Fermentação ruminal.....                           | 20        |
| 2.6 Digestibilidade aparente dos nutrientes.....       | 22        |
| 2.7 Produção e composição do leite.....                | 24        |
| 2.8 Perfil de ácidos graxos do leite .....             | 28        |
| 2.9 Parâmetros Sanguíneos.....                         | 30        |
| 2.9.1 Fontes de Ácidos Graxos na dieta .....           | 32        |
| 2.9.1.1 Óleo de soja.....                              | 33        |
| 2.9.1.2 Grão de soja .....                             | 35        |
| 2.9.1.3 Sais de cálcio de ácidos graxos.....           | 37        |
| 2.9.1.4 Referências .....                              | 41        |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                      | <b>55</b> |
| 3.1 Local, instalações e animais.....                  | 55        |
| 3.2 Dietas experimentais e análise de alimentos.....   | 56        |
| 3.3 Digestibilidade aparente.....                      | 61        |
| 3.4 Fermentação ruminal.....                           | 61        |

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.5 Síntese de proteína microbiana.....                              | 63  |
| 3.6 Produção e composição do leite .....                             | 64  |
| 3.7 Taxa de passagem de líquido e dinâmica ruminal.....              | 65  |
| 3.8 Balanço de energia e de nitrogênio.....                          | 66  |
| 3.9.1 Biohidrogenação ruminal e fluxo abomasal de ácidos graxos      | 68  |
| 3.9.2 Perfil de ácidos graxos.....                                   | 71  |
| 3.9.3 Avaliação do escore de condição corporal e peso corporal ..... | 73  |
| 3.9.4. Metabolitos sanguíneos.....                                   | 73  |
| 3.9.5. Análises estatísticas.....                                    | 75  |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                       | 76  |
| 4.1 Consumo e digestibilidade de nutriente.....                      | 76  |
| 4.2 Fermentação ruminal.....                                         | 80  |
| 4.3 Síntese de proteína microbiana .....                             | 84  |
| 4.4 Produção e composição do leite.....                              | 86  |
| 4.5 Perfil de ácidos graxos do leite .....                           | 88  |
| 4.6 Perfil e ácidos graxos do plasma .....                           | 90  |
| 4.7 Balanço de nitrogênio.....                                       | 92  |
| 4.8 Balanço de energia.....                                          | 93  |
| 4.9 Metabólitos sanguíneos.....                                      | 97  |
| 4.9.1 Dinâmica Ruminal e Biohidrogenação.....                        | 97  |
| 4.9.1.1 Cinética de digestão ruminal.....                            | 98  |
| 4.9.1.2 Fluxo abomasal de ácidos graxos e biohidrogenação.....       | 103 |
| 5. CONCLUSÃO.....                                                    | 111 |
| 6. IMPLICAÇÕES.....                                                  | 111 |
| 7. REFERÊNCIAS.....                                                  | 112 |

## LISTA DE TABELAS

|           |                                                                                                                                                                 |     |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabela 1  | Composição química, nutrientes digestíveis totais (NDT) energia líquida de lactação (EL <sub>L</sub> ), e energia bruta (EB), obtidos para os ingredientes..... | 57  |
| Tabela 2  | Composição química bromatológica dos concentrados experimentais.....                                                                                            | 58  |
| Tabela 3  | Composição química bromatológica e composição de ácidos graxos das dietas experimentais.....                                                                    | 59  |
| Tabela 4  | Composição de ácidos graxos dos ingredientes (g/100g de AG).....                                                                                                | 60  |
| Tabela 5  | Consumo e a digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes.....                                                                                | 77  |
| Tabela 6  | Parâmetros de fermentação ruminal .....                                                                                                                         | 81  |
| Tabela 7  | Síntese de proteína microbiana.....                                                                                                                             | 85  |
| Tabela 8  | Produção e composição do leite .....                                                                                                                            | 86  |
| Tabela 9  | Perfil de ácidos graxos do leite .....                                                                                                                          | 89  |
| Tabela 10 | Perfil de ácidos do plasma.....                                                                                                                                 | 90  |
| Tabela 11 | Balanço de nitrogênio .....                                                                                                                                     | 93  |
| Tabela 12 | Balanço de energia .....                                                                                                                                        | 94  |
| Tabela 13 | Metabólitos sanguíneos de acordo com as dietas experimentais.....                                                                                               | 96  |
| Tabela 14 | Dinâmica ruminal e taxa de passagem de líquido .....                                                                                                            | 98  |
| Tabela 15 | Dinâmica ruminal, concentrações e digestibilidade de nutrientes.....                                                                                            | 100 |
| Tabela 16 | Dinâmica ruminal, concentrações e digestibilidade da FDN .....                                                                                                  | 101 |
| Tabela 17 | Consumo, fluxo abomasal, e composição de ácidos graxos no abomaso...                                                                                            | 103 |
| Tabela 18 | Quantidades de ácidos graxos no rúmen.....                                                                                                                      | 105 |
| Tabela 19 | Dinâmica e biohidrogenação dos ácidos graxos.....                                                                                                               | 108 |
| Tabela 20 | Perdas de ácidos graxos a partir do consumo e do fluxo abomasal.....                                                                                            | 110 |

**LISTA DE FIGURAS**

|          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 | Biohidrogenação ruminal dos ácidos linoléico e linolênico, pelos grupos a e b de bactérias.....                                                                                                                                                                                                                           | 09 |
| Figura 2 | Padrão de biohidrogenação ruminal.....                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 11 |
| Figura 3 | Cromatogramas das análises referentes às amostras de leite ilustrando a separação do ácido vacênico, ácido linoléico conjugado (CLA) C18:2 cis-9, trans-11, e CLA C18:2 trans-10, cis-12, para as vacas submetidas as dietas controle (a) óleo de soja (b), grão de soja, (c) e sais de cálcio de ácidos graxos (d) ..... | 72 |
| Figura 4 | Valores de pH a partir da alimentação de com as dietas experimentais.....                                                                                                                                                                                                                                                 | 82 |
| Figura 5 | Concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH <sub>3</sub> ) a partir da alimentação de acordo com as dietas experimentais.....                                                                                                                                                                                             | 82 |



**LISTA DE ABREVIações E SIGLAS**

|                   |                                             |
|-------------------|---------------------------------------------|
| AG                | ÁCIDOS GRAXOS                               |
| AGL               | ÁCIDOS GRAXOS LIVRES                        |
| AGPI              | ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS               |
| CMS               | CONSUMO DE MATÉRIA SECA                     |
| CT                | CARBOIDRATOS TOTAIS                         |
| ED                | ENERGIA DIGESTÍVEL                          |
| EE                | EXTRATO ETÉREO                              |
| ELL               | ENERGIA LÍQUIDA DE LACTAÇÃO                 |
| FDN               | FIBRA EM DETERGENTE NEUTRO                  |
| GSI               | GRÃO DE SOJA INTEGRAL                       |
| MO                | MATERIA ORGÂNICA                            |
| MS                | MATÉRIA SECA                                |
| N-NH <sub>3</sub> | NITROGÊNIO AMONÍACAL                        |
| SCAG              | SAIS DE CÁLCIO DE ACIDOS GRAXOS             |
| SCAGI             | SAIS DE CÁLCIO DE ACIDOS GRAXOS INSATURADOS |
| HDL               | COLESTEROL DE ALTA DENSIDADE                |
| LDL               | COLESTEROL DE BAIXA DENSIDADE               |
| VLDL              | COLESTEROL DE MUITO BAIXA DENSIDADE         |
| PDR               | PROTEINA DEGRADAVEL NO RÚMEN                |
| PNDR              | PROTEINA NÃO DEGRADÁVEL NO RÚMEN            |
| BHB               | BETAHIDROXIBUTIRATO                         |
| SPM               | SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA              |
| DP                | DESVIO PADRÃO                               |

## FONTES DE GORDURA NA DIETA DE VACAS EM LACTAÇÃO

**RESUMO** - O objetivo deste estudo foi avaliar a biohidrogenação ruminal e o fluxo intestinal de ácidos graxos em vacas leiteiras suplementadas com diferentes fontes de gordura dietética. Foram utilizadas 8 vacas da raça Holandesa no terço médio de lactação ( $80 \pm 20$  dias em lactação; média  $\pm$  DP) canuladas no rúmen e abomaso ( $580 \pm 20$  kg de peso corporal; média  $\pm$  DP), agrupadas em dois quadrados latinos  $4 \times 4$  balanceados, alimentadas com as seguintes dietas: 1) Controle (C), dieta a base de milho e farelo de soja; 2) Óleo de soja refinado (OS); 3) Grão de soja *in natura* (GS); e 4) sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (SCAG). A produção de leite e o consumo de matéria seca foram mensurados diariamente durante todo o período experimental. As amostras utilizadas para análise da composição e o perfil de ácidos graxos do leite foram coletadas de dois dias alternados, sendo provenientes das duas ordenhas diárias. As amostras de sangue para análise dos metabólitos sanguíneos foram coletadas em tubos vacuolizados por punção da veia e/ou artéria coccígea e em tubos com EDTA para análise do perfil de ácidos graxos. Para avaliação da fermentação ruminal as amostras de líquido ruminal foram coletadas nos tempos zero (antes da alimentação), e 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas após alimentação matinal. A digestibilidade foi determinada por meio da utilização do indicador externo óxido crômico. O indicador FDNi foi utilizado para estimativa do fluxo abomasal de matéria seca. Foram utilizados dois modelos para calcular a biohidrogenação ruminal: Modelo A) calculado pela taxa de desaparecimento entre o consumido e o fluxo abomasal; Modelo B): calculado por meio da dinâmica ruminal, taxa fracional de desaparecimento ruminal, e fluxo abomasal. Não houve efeito das fontes de gordura sobre o consumo e a digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes, produção e a composição do leite, síntese de proteína microbiana, perfil de ácidos graxos do leite e do sangue. Os balanços de nitrogênio e de energia, também não foram influenciados pelas fontes de gordura. Porém, os animais alimentados com as dietas contendo fontes de gordura apresentaram maiores concentrações séricas de colesterol total, HDL,

albumina, uréia, nitrogênio ureico no soro, e maiores concentrações das enzimas aspartatoaminotransferase, e gamaglutamiltransferase no sangue. A dieta com óleo de soja promoveu maiores valores de pH ruminal em relação as dietas contendo grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos. Os animais alimentados com as dietas contendo fontes de gordura promoveram maiores concentrações de nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ), e maiores concentrações de acetato e propionato em relação à dieta controle. As vacas que foram alimentadas com a dieta contendo óleo de soja apresentaram maior consumo de ácidos graxos em relação às dietas com grão de soja e sais de cálcio (928,15 vs 869,29 e 867,73 g/dia). Os animais alimentados com a dieta contendo óleo de soja, apresentaram maior taxa de biohidrogenação do ácido linoléico (93,71 vs 86,35; 82,34% respectivamente), e uma tendência para redução da biohidrogenação do ácido linolênico (93,18 vs 76,49; 70,36%)  $P < 0,059$  quando comparada aos animais que receberam as dietas contendo grão de soja e sais de cálcio pelo modelo A. A média da taxa de biohidrogenação para o C18:3 deste estudo foi de 79,09 % para o modelo A e 83,49% para o modelo B. A utilização de grão de soja cru integral e sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, reduzem a taxa de biohidrogenação ruminal e aumentam o fluxo dos ácidos insaturados linoléico e linolênico no intestino de vacas leiteiras em lactação, sem alterar os demais parâmetros envolvidos no processo digestório e metabolismo de ácidos graxos.

**Palavras chave:** lipídios, dinâmica ruminal, digestibilidade, produção e composição do leite

## FAT SOURCES IN THE DIET OF LACTATION COWS

**SUMMARY** - The aim of this study was to evaluate the ruminal biohydrogenation and intestinal flow of fatty acids in dairy cows supplemented with different sources of dietary fat. Eight Holstein cows in the mid lactation ( $80 \pm 20$  day in milk; mean SD) cannulated in the rumen and abomasum ( $580 \pm 20$  kg of weight; mean  $\pm$  SD) with milk yield of 25 kg/d were assigned randomly into two 4 x 4 Latin squares, fed the following diets: 1) control (C); 2) refined soybean oil (SO); 3) whole soybean raw (WS) and 4) calcium salts of unsaturated fatty acids (CSFA). Milk yield and dry matter intake were measured daily throughout the experimental period. The samples used for analysis of composition and fatty acid profile of the milk were collected from two alternate days, and from the two daily milkings. Blood samples for analysis of blood metabolites were collected in tubes vacuolated by vein puncture and/or coccygeal artery and were collected in tubes with EDTA to obtain the plasma. To evaluation of the rumen fermentation ruminal fluid samples were collected at time zero (before feeding), and 2, 4, 6, 8, 10 and 12 hours after morning feeding. The digestibility was determined by using the external marker chromic oxide. The marker NDFi was used to determine the abomase flow from the dry matter. Two models were used to calculate the rate biohydrogenation: Model A): calculated by disappearance rate using abomasal fatty acids flow, and fatty acids intake and; Model B): calculated by ruminal turnover, fractional passage rate and fractional biohydrogenation rate and ruminal pool for each fatty acid. There was no effect of fat sources on intake and total apparent digestibility of the dry matter and nutrients and on yield and milk composition, microbial protein synthesis, fatty acid profile of milk and blood. The balances of nitrogen and energy were also not influenced by fat sources. However, animals fed fat sources had higher serum concentrations of total cholesterol, HDL, albumin, urea, serum urea nitrogen, and higher concentrations of the enzymes aspartate aminotransferase and gamma-glutamyltransferase in blood. The diet with soybean oil promoted higher ruminal pH comparing to diets containing soybean and calcium salts of fatty acids. Animals fed diets

containing fat sources promoted higher concentrations of ammonia nitrogen ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ), and higher concentrations of acetate and propionate in relation to the control diet. Cows fed diet containing soybeans oil showed higher fatty acids intake in relation to the diets containing whole soybean and salts calcium (928.15 vs 869.29 e 867.73 g/day). Cows fed diet containing soybeans oil showed higher biohydrogenation rate from the acids linoleic (93.71 vs 86.35; 82.34% respectively), tendency to decrease from the biohydrogenation rate (93.18 vs 76.49; 70.36%) in relation to the diets containing whole soybean and salts calcium by A model. The average biohydrogenation rate to linolenic acid was 79.09 % to A model, and 83.49% to B model. The use whole soybeans and calcium salts of fatty acids unsaturated in diets of dairy cows, promoted decrease ruminal biohydrogenation rate of the linoleic and linolenic acids and increase of the abomasal fatty acids flow in dairy cows mid lactation in relation to the diets containing soybean oil does not alter the consumption and productive performance, and other parameters involved in the digestive process and metabolism of fatty acids.

**Key Word:** digestibility, lipids, milk yield and composition, ruminal dynamic

## 1. INTRODUÇÃO

A suplementação de ácidos graxos na alimentação de ruminantes tem sido considerado o principal meio de aumentar o valor energético da dieta destes animais. Nos últimos 40 anos a inclusão de diferentes fontes de ácidos graxos em dietas de ruminantes tem sido o objetivo de muitos pesquisadores buscando o conhecimento do valor nutricional dos lipídios presentes no leite e na carne. Esse interesse ocorreu devido à descoberta dos efeitos nutraceuticos de certos ácidos graxos sobre a saúde humana, especialmente na prevenção de doenças coronárias, efeito anticarcinogênico e o seu papel no desenvolvimento infantil e na prevenção de doenças mentais (RIEDIGER et al., 2009; LOURENÇO et al., 2010; DOREAU, 2011).

Entre os diversos interesses pelos conceitos de saúde pública considerando o consumo de ácidos graxos recebe destaque o consumo de leite, sendo desejado o consumo particularmente de ácidos graxos insaturados e menores concentrações de ácidos graxos saturados de cadeia curta e média (GLASSER et al., 2008).

Além disso, a utilização de fontes suplementares de ácidos graxos em dietas de vacas leiteiras pode causar também efeitos negativos, como redução do consumo de matéria seca e da digestibilidade da fibra, ou ainda representar efeitos positivos no âmbito da produção animal, como a otimização de muitas funções fisiológicas nos animais suplementados. De forma geral, as respostas dependem da fonte e da quantidade de gordura inserida na dieta podendo gerar mais ou menos intermediários da biohidrogenação de ácidos graxos que são biologicamente ativos e alteram a eficiência reprodutiva (STAPLES et al., 1998), síntese da gordura do leite (BAUMAN et al., 2003), e o metabolismo das vacas (DRAKCLEY et al., 2000).

Após definido qual fonte de gordura a ser utilizada, é preciso destacar que somente dois processos podem alterar o perfil de ácidos graxos da gordura de produtos oriundos de ruminantes: (1) modificação dos ácidos graxos durante os processamentos dos produtos utilizados nas dietas ou; (2) alterações nas dietas dos animais. Os resultados encontrados na literatura demonstram variações nas concentrações dos ácidos graxos com potenciais efeitos biológicos, sendo alguns conclusivos para o

aumento na produção (CHILLIARD et al., 1991; CHELIKANI et al., 2004), redução da produção (AVILA et al., 2000) ou outros autores sugerem que a resposta depende da dieta basal (LOOR et al., 2005b).

De uma forma geral, grande parte da alteração dos ácidos graxos ocorrida pelo processo de biohidrogenação ruminal pode produzir diversos isômeros (DOREAU e FERLAY, 1994; GLASSER et al., 2008) de forma que o consumo de ácidos graxos na dieta não pode ser considerado indicador real do aproveitamento dos AG absorvidos da dieta. Isso ocorre porque em ruminantes existe uma diferença entre os ácidos presentes na dieta e os ácidos graxos absorvidos no intestino devido às alterações oriundas do metabolismo ruminal. Por esse motivo, o estudo do fluxo pós-ruminal de AG se torna cada vez mais essencial para que sejam entendidos as perdas e os processos pelos quais os AG da dieta podem passar até serem absorvidos.

Além disso, a capacidade para estimar alterações e absorção de ácidos graxos depende do entendimento do metabolismo de ácidos graxos no rúmen e como alguns fatores tais como a dinâmica ruminal, taxa de passagem, taxa de digestão, características da população microbiana (ALLEN, 2000), fase fisiológica do animal, tipo de volumoso e o tipo e quantidade da fonte de ácido graxo utilizada. Esses fatores devem ser levados em consideração, pois, a biohidrogenação consiste em processo dinâmico, de autodefesa dos microrganismos ruminais variando assim com as condições da suplementação.

O processo de biohidrogenação pode ocorrer de duas formas, sendo completa, resultando em ampla variedade de isômeros dos ácidos graxos C18:3 e C18:2, os ácidos graxos mais abundantes nas dietas de animais ruminantes, ou incompleta promovendo aumento do fluxo duodenal de ácidos graxos trans – C18:1 oriundos dos ácidos linoléico conjugado C18:2 cis-9, trans-11- CLA e C18:2 trans-10, cis -12 – CLA (CHILLIARD et al., 2007).

Dessa forma, o presente experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação de diferentes fontes de gordura na dieta de vacas em lactação sobre o metabolismo digestivo, biohidrogenação ruminal e fluxo abomasal de ácidos graxos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Ácidos graxos em dietas de ruminantes

A maioria dos ácidos graxos encontrados na natureza tem número de carbonos que comumente varia de 14 a 24, sendo classificados como saturados (todos os carbonos com ligações simples), ou insaturados (com uma ou mais ligações duplas). Se os ácidos graxos têm uma única ligação dupla, este pode ser classificado como ácido graxo monoinsaturado (AGMI), e se este tem uma ou mais ligações duplas, é classificado como ácido graxo poliinsaturado (AGPI) (LEHNINGER, 2005).

Os ácidos graxos presentes em forragens, sementes de oleaginosas, e seus respectivos óleos são em sua maioria poliinsaturados de 18 carbonos (C18:2 n-6 e C18:3 n-3), enquanto que alguns óleos de sementes são ricos em ácidos graxos monoinsaturados (principalmente C18:1 cis-9) e produtos marinhos (óleos de peixe, algas etc.) são ricos em ácidos graxos de cadeia longa (principalmente o ácido eicosapentanoico (EPA) - C 20:5, n-3 e o ácido docosapentanoico (DHA)- C22:6 n-3). Estes ácidos graxos da dieta são extremamente metabolizados e biohidrogenados no rúmen, gerando não somente produtos finais como o ácido estárico C18:0 mas também uma série de isômeros dos ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) e ácidos monoinsaturados (AGMI). Esses ácidos graxos intermediários da biohidrogenação variam bastante de acordo com a composição da dieta (CHILLIARD et al., 2007).

Neste contexto, os pesquisadores escolhem fontes de ácidos graxos poliinsaturados (C18:2 e C18:3) a serem utilizados em dietas de vacas leiteiras visando justamente a exploração dos processos digestivos. Na maioria dos estudos conduzidos nas décadas de 80 e 90 as fontes de gordura mais utilizadas nas dietas de vacas leiteiras incluíam: óleos, sementes de oleaginosas *in natura* ou extrusadas, gordura amarela, gordura amarela hidrogenada, sebo, sebo parcialmente hidrogenado, sebo peletizado, ácidos graxos peletizados e sais de cálcio de ácidos graxos. Estas fontes variam em características físicas e químicas que afetam a sua digestibilidade, bem como os efeitos associados sobre o consumo de matéria seca (ALLEN, 2000). As



fontes de ácidos graxos mais comuns utilizadas em rebanhos leiteiros possuem variação no número de carbonos de 16 a 18, variando também o grau de saturação e de esterificação. É preciso enfatizar que o fornecimento de sebo bovino está proibido no Brasil conforme Instrução Normativa (IN 8 de 2004) Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento/MAPA.

Quando se analisa o efeito da ingestão de ácidos graxos insaturados em animais ruminantes e não ruminantes é possível determinar a imensa diferença entre a manipulação de AG ingeridos e/ou absorvidos no intestino entre essas duas espécies. Em animais não ruminantes os ácidos graxos que são absorvidos no intestino não são previamente metabolizados, portanto existe uma relação próxima entre os ácidos graxos da dieta e a composição dos ácidos graxos absorvidos. Em ruminantes, de forma contrária, os AG são de forma extensiva metabolizados no rúmen, resultando na hidrogenação e no aparecimento de alguns isômeros, como os ácidos linolêicos conjugados (CLA). Existe, portanto, uma grande diferença entre os AG presentes na dieta e os absorvidos. Depois de sua absorção e seu transporte os AG são sintetizados na glândula mamária no músculo ou no tecido adiposo (DOREAU et al., 2011).

Do ponto de vista nutricional e da produção animal, as fontes de ácidos graxos, representam, o combustível fisiológico com maior valor energético de 9,0 Mcal/kg, equivalente a cerca de 2,25 vezes a energia de carboidratos e da proteína, mas isso desde que seja absorvida e fique a disposição para ser metabolizada (energia metabolizável). Portanto, varia em função da digestibilidade e da fonte de ácidos graxos da dieta.

De forma geral, a suplementação de ácidos graxos nas dietas de ruminantes tem as seguintes vantagens: disponibilidade comercial de fontes de boa qualidade; aumento da ingestão de energia quando a ingestão de matéria seca é reduzida (aumento da eficiência do uso de energia); aumento da eficiência do uso de energia em decorrência de menor incremento calórico; aumento parcial da eficiência da produção de leite pela incorporação direta da gordura da dieta na gordura do leite; substituição de carboidratos rapidamente fermentáveis visando à otimização de consumo de forragem e fermentação ruminal (participação de nutrientes para a secreção do leite); aumento da

flexibilidade para o preparo da ração; utilizados para modificação da composição da gordura do leite ou de tecidos para aceitação pelo consumidor e aumento da absorção de nutrientes solúveis (NRC 2001; PALMQUIST e MATTOS, 2006). Além disso, os ácidos graxos quando incluídos de forma suplementar tem sido prática comum na alimentação de vacas em lactação, especialmente por permitir maior aporte de energia para a síntese de leite e de seus componentes, melhorando o status energético dos animais durante mudanças fisiológicas onde há alta exigência de energia (STAPLES et al., 2001), visando também a exploração do processo de digestão e produção de ácidos graxos com diversos benefícios a saúde humana.

Embora se apresente como alternativa viável nas dietas de ruminantes como fonte de energia, é preciso considerar que para vacas em lactação o uso de lipídeos pode promover variáveis respostas na produção e composição do leite, sendo que a resposta à suplementação depende da dieta basal fornecida (especialmente o volumoso), estágio de lactação, balanço energético e composição e quantidade da fonte de gordura utilizada (ONETTI e GRUMMER, 2004). Além disso, ácidos graxos aproveitados no rúmen podem ter efeitos associativos sobre a digestão de nutrientes. De acordo com o NRC (2001), mudanças no consumo de matéria seca, teor de gordura do leite e digestibilidade de fibra, são indicativos de que a fermentação ruminal foi alterada durante o fornecimento de gordura nas rações.

O aumento do consumo de energia proporcionado pelo uso de fontes de gordura, e adequada quantidade de carboidratos não fibrosos nas dietas podem evitar problemas metabólicos, perda excessiva de peso, baixa eficiência reprodutiva e baixo desempenho produtivo em vacas leiteiras (HAVARTINE e ALLEN 2006a). Certos alimentos também podem ser considerados fontes de energia de baixo custo, como óleos vegetais e sementes de oleaginosas.

Considerando os inúmeros benefícios da suplementação de gordura para vacas em lactação, alguns fatores devem ser considerados essenciais para que se tenha sucesso com a suplementação de gordura. Entre estes fatores o período de adaptação se apresenta como o principal. De acordo com STAPLES et al. (2001) e GRUMMER (1990), a adaptação e a aceitabilidade das fontes de gordura durante o período de

suplementação são fatores determinantes para respostas positivas no desempenho dos animais, pois quando se avalia diferentes fontes de gordura nas rações de vacas leiteiras, respostas diferentes são esperadas e muito relacionadas ao tipo e nível de inclusão do suplemento na ração. De acordo com GRUMMER et al. (1990) a redução na aceitabilidade das fontes de gordura pode em parte explicar redução no consumo de matéria seca e baixa produção de leite. Segundo estes mesmos autores, as diferenças na aceitabilidade de diferentes fontes de gordura podem ser minimizadas misturando os suplementos aos outros ingredientes da dieta.

Dessa forma, além de ser considerada uma fonte de energia, os ácidos graxos também são indicados e utilizados como moderadores do metabolismo e da fisiologia. Baseado nessas alterações no processo de digestão, a biohidrogenação ruminal deve ser determinada de acordo com a quantidade e o tipo de ácidos graxos presentes na digesta pós-rúmen, pois é a estrutura destes ácidos que determina a sua característica fisiológica e qualifica a fonte de gordura adicionada na ração (PALMQUIST, 2007).

## **2.2 Digestão e metabolismo de ácidos graxos**

De acordo com JENKINS (1992) e JENKINS (1993), o processo de digestão de lipídeos em ruminantes pode ser resumido por duas principais etapas, sendo: lipólise e biohidrogenação de ácidos graxos insaturados. A cinética ruminal do processo de digestão de lipídeos, resumida nestes dois processos, tem sido objeto de estudo por vários anos (JENKINS 2007; PALMQUIST 2007). Isso porque a biohidrogenação pode ser considerada um processo de autodefesa dos microrganismos ruminais, que convertem ácidos graxos insaturados (C18:2 e C18:3) em ácidos graxos saturados, menos tóxicos à população microbiana ruminal (PALMQUIST e MATTOS, 2006). Esse processo reduz o fluxo intestinal de ácidos graxos poliinsaturados para duodeno e contribui para o acúmulo de isômeros do ácido linoléico conjugado (CLA), cis e trans, em produtos derivados de ruminantes. De acordo com DOREAU, (2011) a biohidrogenação pode ser considerada processo bioquímico o qual leva a transformação de ácidos graxos insaturados no rúmen para ácidos graxos saturados com ambos a isomerização e hidrogenação.

Durante o processo de digestão e absorção de lipídios em ruminantes, há três possíveis destinos dos ácidos graxos advindos das dietas: 1) oxidação; 2) transferência para o leite; e 3) deposição na gordura corporal. Neste contexto, a digestão e o metabolismo de lipídios têm considerável importância, pois tanto o metabolismo ruminal como a digestão pós-ruminal estão diretamente ligados a eficiência de utilização dos ácidos graxos (COPPOCK e WILKS, 1991).

O metabolismo de lipídeos no rúmen e associado mecanismos complexos, os quais dependem da atividade microbiana. O primeiro passo do metabolismo de lipídeos no rúmen consiste na lipólise, o qual converte AG esterificados em ácidos graxos livres. A hidrólise é predominantemente realizada pelas bactérias ruminais, sendo geralmente alta (>85%) e podendo ser influenciada por alguns fatores, como o nível de gordura na dieta, pH ruminal e a utilização de ionóforos, que podem inibir a atividade e crescimento de bactérias (DOREAU e CHILLIARD, 1997; HARFOOT e HAZLEWOOD, 1997). Depois da lipólise, uma vez que o radical hidroxí está livre, os AG podem ser isomerizados e hidrogenados pelas isomerasas e hidrogenases. Alguns AG são utilizados pelos microrganismos, os quais podem ser sintetizados. Em mais de uma década após a revisão detalhada e bem conhecida de HARFOOT e HAZLEWOOD (1997), um esquema representativo da revisão do processo microbiano foi demonstrado por LOURENCO et al (2010).

As espécies de bactérias *Anaerovibrio lipolytica* são conhecidas por ser responsável por este processo (HENDERSON, 1971). Entretanto, as lípases possuem atividade sobre os triglicerídeos, mas hidrolisa galactolipídeos e fosfolipídeos. Outras bactérias da espécie *Butirivibrio* têm sido estudadas por sua atividade esterase (HAZLEWOOD e DAWSON 1979) e podem quebrar AG livres de fosfolipídeos e galactolipídeos. A evolução no conhecimento da metanogênese microbiana ruminal pode resultar na identificação de outras bactérias contendo lípases ou esterases. Algumas atividades poderiam ser associadas com a fração protozoárias (HARFOOT e HAZLEWOOD 1997), mas a dimensão da atividade destes microrganismos não é conhecida. DEVILLARD et al., (2006) demonstraram grande diversidade de protozoários que possuem ação sobre os AG. As lípases de plantas são consideradas ativas para o

processo de lipólise de galactolipídeos e fosfolipídeos de forragens. Embora a extensão deste processo tenha sido considerado em menor escala nos últimos anos, os estudos “in vitro” recentes tem demonstrado que a contribuição de lipases de plantas foi significativa em pastagens e outras forragens (LEE et al., 2004; VANRANST et al., 2009).

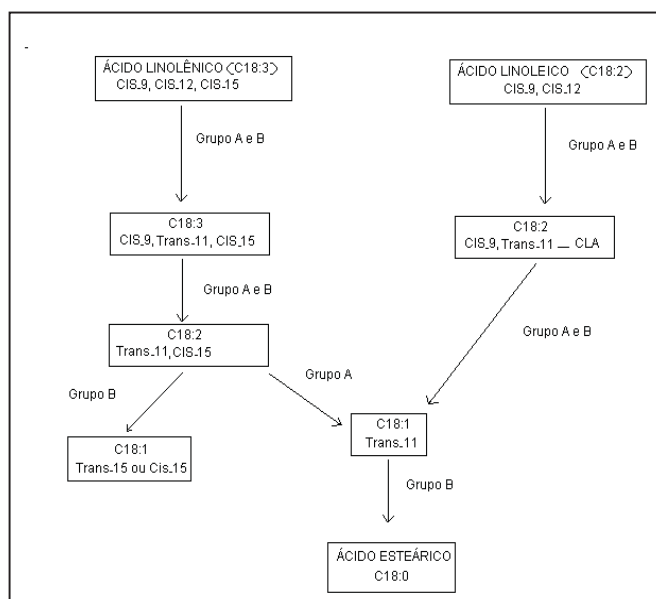
Entretanto a respectiva contribuição das bactérias e lipases de plantas sobre a lipólise de forragens não é conhecida. Os intermediários produzidos a partir de produção de mono ou diacilgliceróis, na forma de AG livres dos lipídeos no rúmen e composição duodenal, são diferentes quando quantidades altas de gordura são fornecidas.

Embora a biohidrogenação possa ser alta, acima de 90% de acordo com CHILLIARD et al., (2007) e ALLEN (2000), o desaparecimento dos ácidos graxos 18:3, n-3 e 18:2, n-6 no rúmen varia em média 93 a 85%, respectivamente. De acordo com NRC (2001) a estimativa de hidrogenação de AGPI varia de 60 a 90%, enquanto que a biohidrogenação de suplementos que contém AGPI pode ser de 30 a 40% se os ácidos graxos são fornecidos como sais de cálcio de ácidos graxos.

A intensidade da biohidrogenação depende da fonte e da quantidade destes ácidos graxos exceto quando eles são protegidos da ação microbiana (JENKINS et al., 2007). Os ácidos graxos presentes em células vegetais em volumosos torna a porcentagem de concentrado da dieta o principal fator que afeta a biohidrogenação. Dietas contendo mais de 70% de concentrado reduzem a biohidrogenação (FUENTES et al., 2009). Este comportamento pode ser atribuído devido ao baixo valor de pH, o qual tem sido mostrado ser o limitante para a taxa de lipólise (DOREAU, 2011) e para a isomerização do ácido linoléico e a segunda redução, levando ao acúmulo de ácido vacênico.

A suplementação de óleos nas dietas tem apresentado alta biohidrogenação no rúmen. Óleo de girassol nas rações de vacas em lactação apresentou aproximadamente 80% de biohidrogenação (KALSCHEUR et al., 1997). A saturação de AG no rúmen de vacas secas excedeu 75% quando óleo de soja foi adicionado em 8% da dieta total (BATEMAN e JENKINS, 1998). Uma vez que os lipídios nos alimentos

estão, em sua maioria, na forma esterificada e as bactérias responsáveis pela hidrogenação atuam somente sobre ácidos graxos livres, a lipólise é, portanto, um pré-requisito para liberação dos ácidos graxos livres e glicerol.



Fonte: Davis e Brown (1970), elaborada Pennington e Davis (1975).

Figura 1 - Biohidrogenação ruminal dos ácidos linoléico e linolênico, pelos grupos A e B de bactérias

O primeiro esquema sobre a teoria da biohidrogenação foi proposta por DAVIS e BROWN (1970), e elaborada por PENNINGTON e DAVIS (1975). Após hidrólise os ácidos graxos poliinsaturados tornam-se então, disponíveis à ação microbiana para o processo de biohidrogenação, que se inicia pela isomerização da ligação *cis*-12 dos ácidos linoléico e linolênico à ligação *trans*-11, que quando resultante do ácido linoléico, formação AG *cis*-9, *trans*-11, ou ácido linoléico conjugado (CLA) (Figura 1). Em seguida, a dupla ligação *cis*-9 é hidrogenada, produzindo C18:1 *trans*-11 e C18:2 *trans*-11, *cis*-15 para os ácidos linoléico e linolênico, respectivamente. O C18:2 *trans*-11, *cis*-15 sofre uma hidrogenação na dupla ligação *cis*-15, produzindo também C18:1 *trans*-11, o qual é também hidrogenado na C18:1 *trans*-11, resultando em ácido esteárico

(Figura 1). As bactérias envolvidas na biohidrogenação têm sido classificadas em dois grupos A e B, de acordo com o padrão metabólico (KEMP e LANOER, 1984). É preciso enfatizar que para se obter completa biohidrogenação de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ambos os grupos de bactérias são geralmente necessários.

A ação específica de diferentes grupos microbianos (A e B) na hidrogenação de lipídios no rúmen também é demonstrada na Figura 1. O grupo A hidrogena os ácidos linoléico e linolênico somente a C18:1 *trans*-11, já o grupo B é capaz de hidrogenar ácidos graxos monoinsaturados a ácido esteárico. Nestes esquema a espécie *Butyrivibrio fibrisolvens* já havia sido reconhecida como a principal bactéria responsável pela biohidrogenação de ácidos graxos insaturados no rúmen (KEPLER et al., 1970).

Entretanto, a biohidrogenação pode ser menor dependendo da concentração de hidrogênio (H) no rúmen, onde somente 1 a 2% do hidrogênio metabólico é usado para este processo (CZERKAWSK, 1984). Por outro lado, esse processo contribui para a retirada de íons  $H^+$  do ambiente ruminal, evitando seu acúmulo, e para a redução da produção de metano ( $CH_4$ ) pelas bactérias metanogênicas, uma vez que estas consomem hidrogênio, aumentando desta forma a eficiência energética da dieta se todas as duplas ligações são completamente convertidas em ligações simples, e os ácidos graxos são saturados.

Enquanto que a maioria dos ácidos graxos são modificados através do metabolismo ruminal, a hidrogenação não é normalmente completa, e ampla variedade de ácidos graxos são resultantes da uma biohidrogenação incompleta (BEYERS e SCHEHING, 1993) (Figura 2).

Embora o processo possa ser eficiente (90%), o grau de hidrogenação é dependente das características químicas das fontes de gordura utilizadas, do tempo de retenção no rúmen, e das características da população microbiana presente no rúmen-retículo (RR) (BICKERSTAFFE e WARNER, 1968). A biohidrogenação aumenta com o grau de insaturação de ácidos graxos (AG), e pode ser reduzida pelo grau de insaturação das rações (WU, 1991). Além disso, a extensão pela qual este processo ocorre depende também da frequência de alimentação (NRC, 2001).



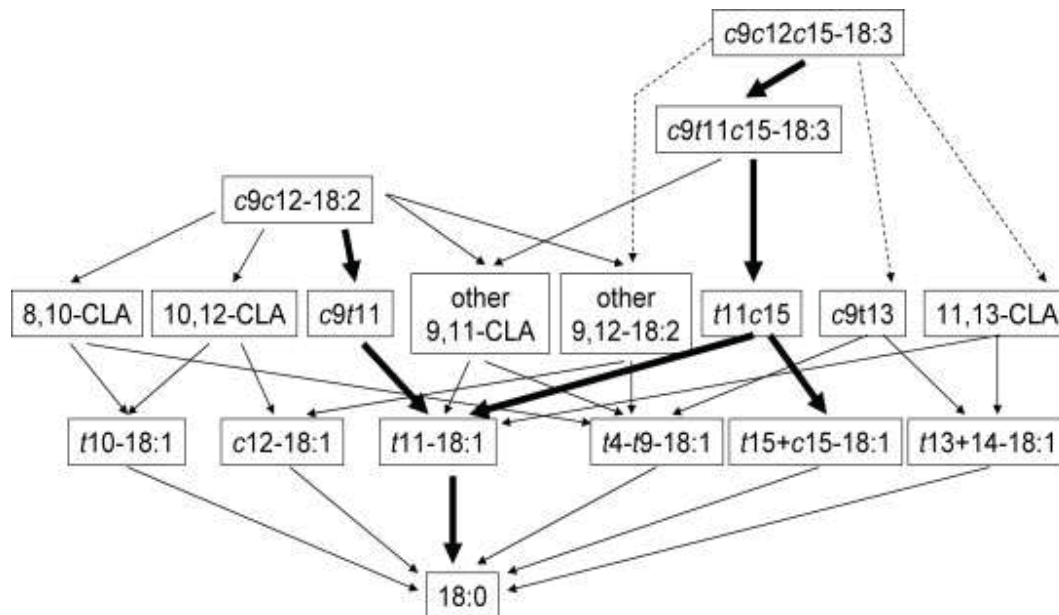


Figura 2 - Padrão de Biohidrogenação ruminal.  
Fonte: Chilliard et al., (2007).

Parte dos ácidos graxos são absorvidos no intestino e secretados no leite, e alguns intermediários da biohidrogenação são transformados por tecidos especialmente pela glândula mamária. A transformação na glândula mamária pela ação enzima  $\Delta^9$  Dessaturase (esteroil-CoA dessaturase) que age pela adição de uma dupla ligação no carbono cis-9 em diferentes ácidos graxos reduzindo a saturação mudando o perfil de ácidos graxos do leite (DOREAU, 2011). Os intermediários da BHB agem como reguladores no processo de lipogênese da glândula mamária. Para finalizar o processo de digestão os AGPI podem escapar da fermentação ruminal e serem absorvidos diretamente no intestino delgado.

O principal ácido graxo usado como substrato para esquema do processo de biohidrogenação proposto por CHILLIARD et al. (2007) em animais em pastagens é o ácido linolênico C18:3 cis-9, cis-12, cis-15 representando o mais abundante AG presente na forma de glicolípídeos e fosfolípídeos de pastagem e outras forragens. Por outro lado, animais confinados recebendo suplementos de ácidos graxos possuem como ácido graxo principal em sua maioria o ácido linoléico C18:2 cis-9, cis-12 na forma de



triacilgliceróis. O metabolismo do ácido linoléico envolve a formação de ácido linoléico conjugado (CLA) principalmente C18:2 cis-9, trans-11 ou popularmente conhecido como ácido rumênico, que posteriormente pode ser convertido em ácido esteárico (C18:0). O ácido linolênico C18:3 é metabolizado de forma semelhante, embora o número de ligações insaturadas pode levar a um padrão de biohidrogenação mais complexo (HARFOOD e HAZLEWOOD, 1997; JENKINS et al., 2008). O principal intermediário do metabolismo do ácido graxo C18:3 foi demonstrado recentemente (WASOWSKA et al., 2006) como sendo o ácido trienoico, C18:3 cis-9 trans-11, cis-15. Outros intermediários identificados incluem C18:3 trans-9, trans-11, cis-15 e o ácido graxo C18:2 trans-11, cis-15 (Figura 2).

Do padrão que resulta em um pequeno número de isômeros, isto tem sido demonstrado KEENEY, (1970) que a digesta do rúmen as bactérias contem um variedade de isômeros de cis e trans C18:1. Isômeros gerais de CLA foram também descritos. Isômeros de C18:3 n-3 podem ser associados com AGPI que resultam numa serie de isômeros (principalmente c9t11c15-18:3, t9t12t15-18:3, t11c15-18:2, t11t13-CLA, t11c13-CLA, t11-18:1, t13-18:1) enquanto o metabolismo de 18:2, n-6 resulta na produção de 8,10-CLA, 9,11-CLA, t10c12:CLA e principalmente t10-18:1. Isto tem sido demonstrado *in vivo* com suplemento de lipídeos de sementes de linhaça (LOOR et al., 2004; LOOR et al., 2005a; AKRAIM et al., 2006), e mais especificamente *in vitro* com AG puros (HINO et al., 2006). Usando os AG c9- 18:1 e t9-18:1, os resultados demonstraram que estes AG podem ser convertidos em uma grande número de isômeros 18:1 (PROELL et al., 2002).

Com relação à digestão pós-rúmen, são várias as diferenças que demonstram a singularidade da digestão de gorduras em ruminantes. Nesses animais o conteúdo duodenal não é neutralizado pelo bicarbonato pancreático, portanto o pH permanece baixo. Em virtude da lipólise de glicerídeos ter ocorrido quase completamente no rúmen, os ácidos graxos estão na forma não esterificada e protonada, e adsorvidos nas partículas dos alimentos. A bile funciona então como detergente para remover os ácidos graxos dessas partículas, em vez de emulsificar os glicerídeos e ativar as lipases, como em animais monogástricos (PALMQUIST e MATTOS, 2006).

Em todas as espécies a formação de micelas pode ser considerada o principal fator para o processo de solubilização e, portanto, a fase decisiva para a eficiência de absorção de ácidos graxos (BAUMAN e LOCK, 2006). A quantidade de lipase encontrada em ruminantes é somente 25% daquela observada em suínos. A bile de ruminantes é fonte importante de lecitina que quando hidrolisada pela enzima pancreática fosfolipase forma 1-Acil isolecitina e o ácido oléico, sendo que essas substâncias funcionam como poderosos agentes emulsificantes (BAUMAN e LOCK, 2006; PALMQUIST e MATTOS, 2006).

Em ruminantes a bile é caracterizada por um excesso de ácidos biliares conjugados e taurina. Na maioria dos herbívoros, os ácidos biliares conjugados de glicina predominam, e nos ruminantes adultos os ácidos biliares conjugados de taurina excede os ácidos biliares de glicina na proporção de 3:1 (NOBLE, 1981 apud BAUMAN e LOCK, 2006). Isso se torna importante, pois sob condições ácidas no pequeno intestino dos ruminantes, os ácidos biliares conjugados de glicina permanecem em condições parcialmente ionizados e na fase micelar, onde são mais ativos para efeito de solubilização. De forma semelhante para pH 2,5, ácidos biliares conjugados de taurina permanecem solúveis e parcialmente ionizados, enquanto que sais biliares conjugados de glicina são insolúveis em menores condições ácidas (pH=4,5) e não são ativos para efeito de solubilização (BAUMAN e LOCK, 2006).

A digestibilidade de AG em ruminantes também possuem algumas particularidades. Segundo DOREAU e FERLAY (1994) a digestibilidade de ácidos graxos varia de 55 a 92%. Em geral, a capacidade de ruminantes absorverem AG é muito mais elevada em relação aos não-ruminantes. Em não-ruminantes a digestibilidade de AG insaturados diminui com aumento da cadeia e com o número de ligações duplas. Em particular os AG palmítico e esteárico são pouco absorvidos em não-ruminantes. De acordo com PALMQUIST e MATTOS, (2006) diferenças na absorção de ácidos graxos ocorrem em todos os animais, sendo que geralmente ácidos graxos poliinsaturados > monoinsaturados > palmítico > esteárico.

De acordo com o NRC (2001) o aumento no grau de insaturação de ácidos graxos fornecidos nas dietas podem aumentar a digestibilidade de ácidos graxos, porém

reduções no consumo de matéria seca, porcentagem de gordura do leite e digestibilidade da fibra são indicadores que a fermentação ruminal foi alterada pela suplementação de gordura. Segundo JENKINS (1993), algumas teorias foram propostas para tentar explicar os efeitos indesejáveis da suplementação de gordura sobre a fermentação ruminal: 1) “efeito antimicrobiano” ou seja, as gorduras têm efeito tóxico sobre os microrganismos ruminais; 2) lipídeos modificam a população microbiana impedindo a digestão da celulose, reduzindo o aproveitamento de cálcio necessários para a função microbiana e; 3) lipídeos formam uma camada protetora cobrindo as partículas dos alimentos causando um impedimento físico sobre a ação das enzimas microbianas, e impedindo a degradação da celulose. O processo de saturação de ácidos graxos pelos microrganismos ruminais, ou seja, a biohidrogenação tem como objetivo reduzir sua atividade e desse modo proteger a integridade das membranas lipoprotéicas microbianas (JENKINS, 1995).

Embora exista padrões parecidos entre ruminantes e não-ruminantes, existe relativa diferença na digestibilidade de ácidos graxos. Individualmente a digestibilidade de ácidos graxos pode ser moderada, sendo os valores de digestibilidade para C16:0, 18:0, 18:1, 18:2 e 18:3 de 75, 72, 80 e 78 e 77% (LOCK et al., 2005). No entanto, DOREAU e FERLEY (1994) observaram em revisão de literatura que as medidas de digestibilidade foram 77, 85, 83 e 76% para AG de 18 carbonos com, zero, uma, duas e três ligações, respectivamente. De acordo com o NRC (2001) a digestibilidade de ácidos graxos com e sem glicerol é de 86% para suplementos de gordura.

Portanto, as mudanças no perfil de ácidos graxos durante o metabolismo ruminal causa variações na absorção de ácidos graxos saturados e insaturados, o que é determinante para incorporação desses compostos nos tecidos corporais e no leite.

### **2.3 Fluxo intestinal de ácidos graxos**

De acordo com o tópico anterior já é de conhecimento dos pesquisadores em nutrição que os ácidos graxos provenientes da dieta podem passar por diversas alterações até chegarem ao intestino para serem absorvidos. Entre elas podem ser

citado às perdas esperadas com o metabolismo microbiano de ácidos graxos de cadeia longa e a insignificante absorção pelo epitélio ruminal (DOREAU e CHILLIARD, 1997).

Em alguns estudos foram observadas perdas de ácidos graxos no rúmen. Em uma revisão de literatura DOREAU e CHILLIARD (1997) avaliaram 113 estudos sobre balanço de ácidos graxos e suas perdas no rúmen. Estes autores observaram que do total de ácidos graxos consumidos chegaram somente 80,1% ao duodeno. Esse resultado pode ser atribuído ao desaparecimento do AG C18:3, n-3 e C18:2, n-6 no rúmen que pode ocorrer em média 93 e 85%, respectivamente (CHILLIARD et al., 2007). LUNDY et al., (2004) avaliaram a inclusão de óleo de soja e sais de cálcio de óleo de palma em 2,75% da matéria seca e a mistura das duas fontes de gordura em quatro vacas canuladas no rúmen e duodeno. Estes autores observaram aumento da biohidrogenação ruminal de C18:2 (n-6) que foram resultados coerentes já que houve maiores perdas dos ácidos graxos insaturados observada no duodeno. De acordo com DOREAU e CHILLIARD, (1997) em dados analisados de mais de 100 observações de estudos publicados avaliando a biohidrogenação e fluxo de ácidos graxos as perdas de C18:2 (n-6) e C18:3 (n-3) respectivamente são maiores quando se utiliza fontes de AG não complexados como óleos.

A maioria dos ácidos graxos que chegam ao duodeno são não esterificados. Eles são absorvidos no intestino e no enterócito sofrem ação da  $\Delta^9$  dessaturase, mas de maneira limitada. Esses ácidos são esterificados no enterócitos e exportados para os organismos na forma de quilomicrons e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). Ao comparar a proporção dos ácidos graxos essenciais e não-essenciais do sangue com o duodeno ocorre uma diferença, a concentração de C18:2n-6 e C18:3n-3 é mais alta no plasma (GLASSER et al., 2007). As características dos ácidos graxos C18:0 e C18:1 cis-9 são semelhantes (ENJALBERT et al., 1998) sendo enviados para a glândula mamária e sendo utilizados para a síntese de gordura do leite. Já os fosfolípidos e o colesterol não necessariamente serão utilizados pela glândula mamária (GAGLIOSTRO, et al., 1991) e são ricos em C18:2, e C18:3, que difere do encontrado no duodeno. KALSCHEUR et al., (1997a) avaliando o efeito de fontes de gordura sobre o fluxo de C18:1 trans-11 para o duodeno, e observaram que houve uma

incompleta biohidrogenação, representada pelo aumento do fluxo de C18:1 trans-11 para o duodeno, em vacas alimentadas com dietas suplementadas com óleo de girassol com alto conteúdo de ácido oléico e linoléico. No entanto, apesar do aumento de trans-C18:1 ser maior no leite de vacas com reduzido teor de gordura, o autor avaliou que não houve associação constante entre a quantidade total de trans-C18:1 no leite e diminuição no teor de gordura do leite. LOOR et al., (2004) avaliou o efeito de dietas de alto concentrado com e sem óleo de linhaça em vacas em lactação sobre o fluxo intestinal de isômeros cis e trans de C18:1 e C18:2. O autor observou redução no fluxo de ácidos graxos de cadeia média (C14, C15 e C16) nos animais que receberam dieta de alto concentrado e atribuiu tal resultado a baixa produção de acetato, isobutirato e isovalerato. Dessa forma pode concluir que houve menor síntese desses ácidos graxos no rúmen, confirmando que a suplementação com ácidos graxos insaturados leva a redução dos ácidos que irão para o duodeno.

Em dietas de alto concentrado (80:20) ocorre um importante efeito sobre a biohidrogenação ruminal devido as alterações na população microbiana do rúmen com efeito da mudanças dos valores de pH. A população de bactérias celulolíticas é reduzida quando comparada a população de bactérias amilolíticas (LATHAM et al., 1972). Com a diminuição da biohidrogenação, ocorre aumento nos níveis de ácido linoléico e assim aumenta a chance de isomeração desse ácido para a forma trans 10, cis12-18:2. Esse efeito pode ser visto pelo aumento desse isômero no leite de vacas que receberam dietas com altas quantidades de concentrado (PIPEROVA et al., 2002). No estudo de LOOR et al., 2004, ele não observou esse aumento que pode ser devido a rápida hidrogenação desse isômero para o trans 10-18:1 que teve um grande aumento no duodeno.

LOOR et al. (2004) confirma os estudos efeitos *in vitro*, da produção dos isômeros de C18:2 encontrados no duodeno. O primeiro AG a ser hidrogenado é o C18:3n-3, com a observação do C18:2n-6 resultado da isomeração. Os autores observaram também uma redução desses dois isômeros quando o óleo de linhaça foi adicionada na dieta, isso se deve pelo aumento de intermediários ruminais formados (trans9, cis12-18:2; cis9, trans13-18:2; trans9, trans12-18:2 e trans11, cis15-18:2).

GLASSER et al. (2008) em meta-análise sobre o fluxo duodenal de ácidos graxos C18 e C4 ao C16, concluiu que os óleos vegetais tem alta correlação no aumento de isômeros C18 no duodeno pela biohidrogenação ruminal. Os autores concluíram que existe relação positiva para a quantidade de isômeros C18 no duodeno com o C18 do leite. O C18 do leite tem um equilíbrio na proporção com os AG <C16 e tem um limite por mais que o fluxo duodenal seja intenso, isso não acarretará grande aumento no C18 do leite.

É preciso avaliar as relações entre o fluxo duodenal e a composição de ácidos graxos do leite. De acordo com GLASSER et al. (2008) o fluxo duodenal de C18 e a produção no leite são altamente correlacionados para dietas com baixa quantidade de lipídeos contendo 30g de AG/kg de MS a 35g de AG/kg de MS consumida. Para estes experimentos a produção de C18 é proporcionalmente relacionada ao consumo de MS e a produção de leite. Além da relação funcional já é bem conhecido entre a comunidade científica que a suplementação de lipídeos reduz a síntese de novo de ácidos graxos, particularmente por meio dos isômeros intermediários da biohidrogenação ruminal (BAUMAN e GRIINARI, 2001).

Assim como a biohidrogenação e o fluxo intestinal de ácidos graxos também muda de acordo com as fontes de ácidos graxos avaliadas. GLASSER et al., (2008) em compilação de dados em 4 experimentos verificaram que o consumo de de óleo de peixe entre 250 e 430 g/dia promoveu fluxo duodenal de C20 a C24 entre 9 a 18g/dia. CHILLIARD et al., (2003) verificaram que a suplementação de ácidos graxos insaturados reduziu a síntese de novo na glândula mamária. Neste contexto a alteração comumente observada no duodeno do fluxo de C18, limita as concentrações de ácidos graxos com número de carbonos variando de C4 a C16. Parece haver relação negativa entre as concentrações destes ácidos graxos e as concentrações de C18, pois com a redução das concentrações de C4 a C16 em 83 a 85% em vacas que tiveram o teor de gordura reduzido pela infusão de C18:2 trans-10 cis-12 houve aumento da concentração de C18:0 do leite (LOOR e HERBEIN, 2003).

No entanto é preciso enfatizar que a concentração de lipídeos da dieta pode influenciar diretamente a composição do leite pelas concentrações de C18. De acordo

com GLASSER et al., (2008) vacas que são alimentadas com dietas contendo limitadas concentrações de C18 reflete em baixas concentrações de AG no leite. Isso ocorre porque a produção de gordura do leite é uma resposta da suplementação de lipídeos que reflete no fluxo duodenal de C18 podendo resultar em dois fenômenos aditivos: redução quadrática da produção de C18 e redução linear nas concentrações de C4 a C16.

Portanto, mudanças na taxa de biohidrogenação aliada ao consumo e ao tipo de AG presente na dieta, podem influenciar de forma acentuada o fluxo intestinal de AG.

## **2.4 Consumo de Matéria Seca**

Os resultados referentes ao CMS em vacas leiteiras suplementadas com fontes de gordura nas rações tem sido inconsistentes em função de vários fatores que podem estar envolvidos na diminuição do consumo. De acordo com Allen (2000), a suplementação de gordura nas rações de vacas em lactação tem proporcionado redução da digestibilidade da matéria seca e conseqüente diminuição do CMS. No entanto, é preciso considerar que quando se avalia o CMS de vacas suplementadas com fontes de gordura, uma série de parâmetros estão envolvidos, sendo os principais a digestibilidade da fração fibrosa, o tipo de volumoso utilizado, a fonte e nível de gordura utilizado, e o estágio de lactação no qual se iniciou a suplementação de gordura (NRC, 2001; STAPLES et al., 2001; ONETTI e GRUMMER, 2004).

O NRC (2001) considera que mudanças no padrão de digestibilidade da fração fibrosa, alterações na fermentação ruminal e redução no teor de gordura no leite são fortes indicativos que a suplementação de gordura promoveu resposta fisiológica nos animais suplementados. Apesar de alguns estudos que utilizaram fontes adicionais de gordura para vacas leiteiras demonstrarem mudanças no padrão de fermentação ruminal, tais alterações nem sempre refletem em redução no consumo. Segundo ALLEN (2000), os mecanismos pelo qual a suplementação de gordura na ração afeta o CMS ainda não estão devidamente elucidados, mas há fortes evidências de que o efeito da gordura sobre a fermentação ruminal, motilidade intestinal, aceitabilidade da dieta



com suplemento, liberação de hormônios intestinais, mecanismos regulatórios que controlam a ingestão de alimentos e a capacidade limitada dos ruminantes de oxidar os ácidos graxos sejam as principais razões da inibição de consumo.

UEDA et al. (2003) avaliaram a suplementação de óleo de soja em 4 e 6% da matéria seca total, utilizando feno de gramínea na proporção volumoso concentrado de 65:45, e não observaram redução no consumo de matéria seca e consumo de matéria orgânica. ONETTI et al. (2001) também não observaram redução no consumo de matéria seca em vacas suplementadas com níveis de 4 e 6% de sebo e gordura branca na matéria seca total, utilizando silagem de milho na proporção volumoso:concentrado de 50:50. ZHENG et al. (2005) não observaram redução no CMS em vacas com média de 40 dias em lactação e recebendo cerca de 500g de óleo/dia (2% da matéria seca total), utilizando silagem de milho como maior parte do volumoso.

Dois principais pontos devem ser destacados quando se analisa alterações no CMS em vacas suplementadas com fontes de gordura: 1) aceitabilidade do suplemento de gordura, que está diretamente relacionado às alterações no consumo de matéria seca, pois quando o período de adaptação não é suficiente para os animais, as respostas à suplementação podem não representar a realidade; 2) tipo e nível de suplementação de gordura utilizado, pois respostas diferentes são observadas de acordo com as características químicas e físicas da gordura utilizada.

De acordo com NRC (2001), para dietas contendo de 5 a 6% de ácidos graxos na matéria seca, a adição de óleo de sementes e ácidos graxos parcialmente hidrogenados reduziram o CMS. DHIMAN et al. (2000) e CHILLIARD et al (2003), no entanto, verificaram que não houve diferença no CMS com a inclusão de 4 a 6% de óleo na MS.

A adição de sebo, gordura amarela e sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma também resultaram em efeito negativo com diminuição linear no CMS. GRUMMER et al. (1990) avaliaram a suplementação de fontes comerciais de gordura em três fazendas, perfazendo um total de 209 animais em lactação. Estes autores enfatizaram que a aceitabilidade aos suplementos pode explicar em parte as reduções



no CMS, que conseqüentemente reflete em baixo desempenho ou desempenho não esperado quando se realiza suplementação de gordura em animais em produção.

Entretanto, as respostas à suplementação em certos estágios de lactação podem representar maiores ou menores alterações no CMS, pois, independentemente da suplementação de gordura, reduções de consumo pode ser esperadas em fases críticas do ciclo produtivo, como o início de lactação. ONETTI e GRUMMER, (2004) compilaram dados de 41 experimentos e avaliaram a suplementação de sais de cálcio de ácidos graxos, sebo e ácidos graxos de sebo hidrogenados. Estes autores avaliaram estudos estabelecendo separações de resultados de acordo com a fase de lactação, e avaliaram a suplementação de gordura sobre o CMS no início e terço médio de lactação.

Nos estudos avaliados por ONETTI e GRUMMER (2004) as dietas continham média de 3,6% de extrato etéreo, e houve redução de consumo tanto no início como no terço médio de lactação, embora as vacas em início de lactação possam ser mais beneficiadas pelos suplementos do que vacas no terço médio. Isso ocorre porque vacas no início de lactação possuem condições fisiológicas onde ocorre maior balanço energético negativo, promovendo maior consumo de energia líquida. Vacas no terço médio de lactação estão em balanço energético positivo, onde estes animais não aproveitam de forma eficiente o benefício do aumento da densidade energética das rações.

## **2.5 Fermentação Ruminal**

Segundo JENKINS (1993), a variação dos efeitos das fontes de gordura sobre a fermentação ruminal pode ser atribuída às poucas diferenças entre as estruturas dos lipídios. Dentre esses fatores o grau de insaturação dos ácidos graxos pode ser considerada característica essencial das gorduras quando utilizadas como fonte de energia nas rações de ruminantes. Isso porque os ácidos graxos insaturados podem inibir a fermentação ruminal em relação a ácidos graxos saturados. Ainda, essa característica específica pode ser justificada pelo fato de que a mistura de ácidos

graxos saturados e insaturados pode melhorar a fermentação quando comparada com fontes simples de ácidos graxos (HAVARTINE e ALLEN, 2006a).

Assim, quando os lipídios são adicionados nas dietas de ruminantes a fermentação ruminal pode ser alterada causando redução da digestibilidade dos nutrientes da dieta. A digestão ruminal de carboidratos estruturais pode ser reduzida em 50% quando menos de 10% de gordura é adicionada nas rações. Esta redução na digestão é acompanhada pela redução na produção de metano, hidrogênio, e ácidos graxos voláteis, incluindo baixa razão acetato: propionato (JENKINS, 1993). Ácidos graxos parcialmente na forma não esterificada são tóxicos aos microrganismos ruminais e podem diminuir a degradação de fibra (PALMQUIST e JENKINS, 1980; CHALUPA et al., 1984; JENKINS, 1993).

De acordo com PALMQUIST (1988) o efeito dos ácidos graxos sobre a degradabilidade ruminal de nutrientes pode ser minimizado se a dieta conterem alta proporção de volumoso, isso podendo ser comprovado principalmente pela capacidade da forragem em manter o funcionamento normal do rúmen. Assim, os efeitos de ácidos graxos insaturados sobre a digestão ruminal podem ser variáveis, onde o tipo de volumoso utilizado durante a suplementação pode ser considerado fator preponderante para que isso ocorra (UEDA et al. 2003). ONETTI e GRUMMER (2004) enfatizam que a utilização de silagem de milho como volumoso pode causar mudanças na população bacteriana no rúmen, favorecendo organismos responsáveis pela formação de *trans*-10, *cis*-12 CLA, e isômeros *trans* de C18:1, ou seja, favorecendo o processo de biohidrogenação que causa a formação de CLA específico, reduzindo a síntese de gordura do leite (BAUMMAN e GRIMMARI 2001).

O fornecimento de dietas com alta proporção de silagem de milho como volumoso diminui no rúmen a proporção molar de acetato e reduz a de propionato quando comparadas a dietas ricas em silagem de alfafa, ou dietas com proporções iguais das duas forragens (BRODERICK, 1985; DHIMAN e SATTER, 1997; ONETTI et al., 2001). No entanto, é preciso enfatizar que além do volumoso utilizado em maior quantidade na dieta durante a suplementação de gordura, a fase na qual se iniciou a suplementação pode influenciar as mudanças do padrão de fermentação ruminal.

ONETTI e GRUMMER (2004) compilaram dados de 41 experimentos que avaliaram inclusão de sais cálcio de ácidos graxos, sebo e gordura branca hidrogenada e seus efeitos sobre os parâmetros de fermentação ruminal em diferentes fases de lactação. Estes autores verificaram que houve redução da relação acetato:propionato para os animais que estavam no terço médio de lactação em relação ao início de lactação. Este resultado, segundo estes autores, pode ser justificado em parte pelo aumento da taxa de passagem pelo aumento do CMS em vacas em início de lactação o que influencia a degradação da fibra, resultando em menor produção de ácidos graxos voláteis, especialmente o acetato.

Com relação ao uso de feno durante a suplementação de gordura, os efeitos desse volumoso não tem apresentado alterações no padrão de fermentação ruminal, sendo diferente em relação ao uso de silagem de milho. ELLIOT et al. (1993) e UEDA et al. (2003) avaliaram suplementação de gordura em vacas leiteiras no início de lactação e utilizaram feno de gramíneas como principal volumoso nas dietas, e observaram redução na proporção molar de acetato em relação à de propionato.

Certas fontes de gordura, especialmente na forma protegida da degradação ruminal, como os sais de cálcio de ácidos de cadeia longa, e fontes de gordura que possuem proteção natural, como sementes de oleaginosas inteiras ou parcialmente quebradas, possuem efeito inerte sobre a população microbiana, não apresentando toxicidade da gordura sobre os processos de degradação ruminal de nutrientes, especialmente da fibra (ALLEN, 2000; PALMQUIST e MATTOS, 2006).

## **2.6 Digestibilidade Aparente dos Nutrientes**

O efeito do uso de gordura sobre a digestibilidade dos nutrientes da dieta pode ser influenciado por uma série de fatores, especialmente pela característica inerente ao suplemento e sua forma de utilização, como o nível e tipo de suplemento utilizado, e o tipo de volumoso utilizado durante a suplementação.

A redução na digestibilidade da matéria seca total e da fibra pode reduzir a taxa de passagem e, conseqüentemente, o consumo de matéria seca e energia líquida.

Dados da literatura mostram que a interação entre a dieta basal e suplementação de lipídios sobre a digestibilidade total são inconsistentes. Óleos reduzem a digestibilidade aparente total de carboidratos quando se fornece silagem de milho como volumoso comparado com outros volumosos como o feno de gramíneas (BEM SALEM, et al., 1993). No entanto, BATEMAN e JENKINS (1998) demonstraram que grandes quantidades de óleo de soja em combinação com altas quantidades de forragem nas rações podem ser fornecidas sem prejuízo sobre a digestibilidade aparente no trato total.

UEDA et al. (2003) avaliaram a inclusão de 3% de óleo de soja na matéria seca em dietas de alta e baixa quantidade de feno de pastagem sobre a digestibilidade aparente total em quatro vacas canuladas no rúmen e duodeno. Estes autores observaram que a degradabilidade da FDN aumentou nas dietas com óleo e alta relação volumoso:concentrado em relação a dietas com baixo teor de volumoso. No entanto, houve redução na digestibilidade da matéria orgânica (MO) de 15,5%, FDN em 22,7% e FDA em 30,7% para as rações com óleo e baixo teor de volumoso nas dietas.

FAICHNEY et al. (2002) demonstraram que a digestibilidade aparente total foi compensada parcialmente pelos efeitos negativos na degradabilidade ruminal quando foi utilizada fontes gorduras insaturadas como fonte de energia. DOREAU et al. (1991) não observaram redução na digestibilidade de MO de vacas leiteiras suplementadas com 10% de óleo, utilizando feno como volumoso e dietas com a proporção volumoso:concentrado de 50:50. ELLIOT et al. (1993) avaliaram a inclusão de óleo de milho nas rações de vacas Holandesas em dietas com 5,2 % de extrato etéreo utilizando feno de alfafa como volumoso, e não verificaram alterações na digestibilidade aparente total dos nutrientes e degradabilidade da fibra.

Quando se avalia o efeito de fonte de gordura inertes no rúmen como sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa sobre a digestibilidade aparente total em relação a fontes de gordura, os resultados demonstram que pode haver benefícios na digestibilidade de nutrientes para este tipo de fonte de gordura. ONETTI E GRUMMER, (2004) avaliaram a digestibilidade aparente total da matéria seca e FDN em diversos estudos que utilizaram fontes de gordura. Estes autores observaram aumento de 2,1%

na digestibilidade da FDN em 13 comparações quando foi utilizado sais de cálcio de ácidos graxos em relação ao sebo e a gordura branca parcialmente hidrogenada. Observaram também que a inclusão média de 3,5% de gordura na dieta total, em todos os experimentos avaliados, resultou em redução de 2% na digestibilidade da matéria seca, enquanto que houve aumento de 1,7% para os experimentos que utilizaram sais de cálcio de ácidos graxos.

Portanto, o tipo e nível de volumoso basal, assim como o grau de saturação dos suplementos de gordura utilizados, podem interferir na digestibilidade aparente total de vacas suplementadas com fontes adicionais de gordura.

## **2.7 Produção e composição do leite**

O desempenho produtivo de vacas leiteiras suplementadas com fontes de gordura pode variar em função da dieta basal (especialmente o volumoso), estágio de lactação, balanço energético, composição e nível de inclusão da fonte de gordura utilizada (NRC, 2001).

A primeira razão para a ocorrência do aumento de produção é a melhor eficiência de utilização da gordura dietética, onde as perdas energéticas durante o metabolismo são menores em relação à utilização de grãos comumente utilizados em concentrados e em volumosos. Além disso, a adição de gordura para vacas em lactação aumenta a densidade energética dietética, permitindo que o consumo diário de energia seja aumentado (KLUSMEYER et al., 1991; STAPLES et al., 2001).

No entanto, é preciso enfatizar que as diferentes fases de lactação podem influenciar o aproveitamento de energia devido ao balanço energético em que o animal de encontra. Esse benefício foi confirmado por ONETTI e GRUMMER, (2004) onde observaram que vacas no início de lactação utilizaram de forma mais eficiente o aumento densidade energética das rações com gordura em relação a vacas no terço médio de lactação, atribuindo tal fato as diferenças na partição de nutrientes e possivelmente ao balanço energético dos animais suplementados.

Com relação à resposta produtiva CHILLIARD (1993) resumiu diversos estudos envolvendo a suplementação de gordura para vacas leiteiras, e observou também que, dependendo da fase de lactação em que se iniciou a suplementação, as respostas produtivas variaram de 0,31 a 0,72 kg de leite/dia/vaca. STAPLES et al. (2001) também citaram que a resposta produtiva da utilização de gordura dietética suplementar para vacas em lactação pode resultar em acréscimos na produção de leite de até 2,0 a 2,5 kg/vaca/dia, condicionando estes resultados a adaptação dos animais as dietas contendo gordura e ao tempo suficiente de avaliação para responderem as dietas ricas em energia.

Com relação a variações na composição do leite, o teor de gordura e proteína do leite são as frações que estão sujeitas as maiores alterações durante a suplementação com gordura nas deitas. O processo de biohidrogenação ruminal pode causar indiretamente variações no teor de gordura do leite. Estudos na literatura têm demonstrado efeitos da variação no perfil de ácidos graxos da gordura do leite com a suplementação de fontes de gordura nas rações de vacas leiteiras (WONSIL et al., 1994; DHIMAN et al., 2000; BAUMAN e GRIINARI, 2001).

Segundo ALLEN (2000), o processo de biohidrogenação é mais intenso, sendo maior que 90%, quando se fornece óleos nas rações. Esse processo pode ser realizado por rota alternativa, produzindo ácidos graxos específicos *cis-9*, *trans-11*- CLA e o *trans-10*, *cis-12* CLA (DHIMAN et al., 2000; BAUMAN e GRIINARI, 2001). Estudos recentes demonstraram que o isômero *trans-10*, *cis-12* CLA produzido durante o processo de biohidrogenação têm efeito inibidor sobre a síntese da gordura do leite na glândula mamária (CHOUINARD et al., 1999; BAUMAN e GRIINARI, 2001).

Embora tais fatores possam influenciar de forma ativa a variação no teor de gordura do leite, a intensidade de tal mudança é inerente ao tipo e nível de suplemento utilizado, e ao nível de fibra da dieta, especialmente advindas do volumoso utilizado em maior quantidade durante a suplementação. ONETTI e GRUMMER (2004) verificaram que sais de cálcio de ácidos graxos em dietas com média de 3,6% de extrato etéreo tem menor impacto sobre a população microbiana no rúmen e conseqüentemente, não são esperadas reduções na síntese de gordura do leite. Entretanto, o processo de

biohidrogenação ruminal é mais intenso com suplementos de gordura altamente insaturadas como óleos vegetais (GRUMMER, 1990; JENKINS, 1993).

O uso de fontes de gordura nas rações de vacas leiteiras pode também promover redução no teor de proteína do leite. Por outro lado, em alguns casos a redução no teor de proteína do leite pode ocorrer possivelmente pelo simples efeito de diluição devido ao aumento da produção de leite quando são fornecidas rações com adição de gordura (GARNSWORTHY, 2002), ou por variações nas concentrações das frações protéicas no leite, como a concentração de caseína, ou nas variações nas concentrações de alguns hormônios que podem promover mudanças fisiológicas que afetam a síntese de proteína do leite (WU e WUBER, 1993).

Essa variação no teor de proteína do leite em resposta a suplementação de gordura tem sido citada na literatura (WU e WUBER et al., 1993; WU e WUBER et al., 1994) e algumas hipóteses tem sido propostas procurando explicar a razão para este decréscimo.

A primeira teoria foi denominada de 'deficiência de glicose' onde, teoricamente, a substituição de carboidratos rapidamente fermentáveis no rúmen por suplementos de gordura resultaria em menores quantidades de precursores para a síntese de glicose. No entanto, CANALE et al. (1990) e CHOW et al. (1990) teorizam que a redução da síntese de proteína do leite ocorre devido à redução da produção de proteína microbiana, que pode representar consequência da suplementação de gordura, pois o *pool* de aminoácidos no animal seria reduzido devido ao aumento da utilização de aminoácidos disponíveis para a gliconeogênese. Esta redução poderia alterar a produção de proteína do leite de forma mais acentuada quando comparada ao suprimento de glicose.

Outra teoria descreve a resistência à insulina de alguns tecidos sobre a síntese de proteína do leite. PALMQUIST e MOSER, (1981) verificaram que a taxa de glicose em vacas leiteiras foi correlacionada negativamente com os aumentos das concentrações de insulina causada pela glicose. Estes autores verificaram que altas taxas de insulina foram observadas em vacas leiteiras que receberam altas quantidades de gordura nas rações, e assim esses altos níveis de gordura poderiam causar resistência à insulina a

qual pode reduzir o fluxo de aminoácidos para a glândula mamária para síntese de proteína do leite.

O aumento da eficiência energética para produção de leite representa mais uma teoria que tenta explicar a possível redução da proteína do leite em vacas suplementadas com gordura. Durante a suplementação de gordura a síntese de novo de ácidos graxos do leite é diminuída devido à incorporação de ácidos graxos da dieta ao leite. Essa diminuição pode reduzir as exigências de acetato e aumentar o aproveitamento de glicose para síntese de lactose, a qual é associada com o aumento da produção de leite ou eficiência de produção de leite, resultando em diminuição do fluxo sanguíneo mamário. Assim, a redução do fluxo sanguíneo mamário poderia reduzir o fornecimento de aminoácidos para a síntese de proteína do leite, levando a redução da concentração de proteína no leite.

Por último, CASPER e SCHINGOETHE (1989) sugerem que a relação da somatotropina da glândula pituitária pode ser reduzida pela elevada concentração de ácidos graxos não esterificados (AGNE) no plasma, e que sua deficiência poderia reduzir a absorção de aminoácidos do sangue para proteína do leite.

A hipótese mais aceita envolve o aumento no fornecimento de energia consiste no suprimento de aminoácidos, onde este último não consegue atender a demanda para síntese de proteína na mesma intensidade na qual ocorre aumento do consumo de energia (CANT et al., 1993). ONETTI e GRUMMER, (2004) utilizaram fontes de gordura e observaram baixa concentração de  $N-NH_3$  ruminal como consequência de dietas com alta quantidade de silagem de milho e presença de ácidos graxos insaturados, que pode reduzir o crescimento microbiano e conseqüentemente o aproveitamento de aminoácidos disponíveis para a glândula mamaria e para síntese de proteína.

SMITH et al. (1978) avaliaram a inclusão de suplemento de gordura contendo 40% de sebo e 60% farelo de soja tratado com formaldeído, perfazendo dieta total com 14,3% de extrato etéreo em vacas leiteiras no início de lactação. Estes autores verificaram redução no teor de proteína do leite para os animais suplementados com gordura. CANALE et al. (1990), também verificaram redução no teor de proteína do leite de vacas leiteiras suplementadas com sais de cálcio de ácidos graxos.



WU e HURBER (1993) revisaram dados de 49 experimentos, envolvendo 83 comparações entre rações com e sem adição de gordura em vacas leiteiras, e observaram que na maioria dos casos o teor de proteína foi reduzido pela adição de fontes de gordura nas rações. Estes autores concluíram que a redução do teor de proteína verificada nos estudos avaliados pode ser explicado em parte pelo aumento da produção de leite, sendo o grau de depressão dependente da fonte de gordura utilizada e resposta a suplementação.

## **2.8 Perfil de ácidos graxos do Leite**

O perfil de ácidos graxos no leite, pode ser alterado por modificações no padrão de fermentação ruminal, espécies de bactérias ruminais (KALSCHEUR et al., 1997a) e suplementação de CLA e trans-11 C18:1 na dieta (CHOUINARD et al., 1999; ROMERO et al., 2000).

Os ácidos graxos de cadeia curta e média (C4 ao C14) constituem aproximadamente 20% da quantidade geral de ácidos graxos do leite e são sintetizados pela própria glândula mamária, enquanto que os outros 80% são representados pelos ácidos graxos de cadeia longa C16 e C18 principalmente os ácidos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1) perfazendo 28,2, 13,3 e 29,8 % respectivamente.

A utilização de suplementação lipídica com altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados mostrou-se bastante eficaz no aumento da concentração de CLA e outros ácidos graxos insaturados na gordura do leite. As fontes vegetais como óleo de soja e óleo de linhaça, ricas em C18:2 e C18:3, são particularmente efetivas (CHOUINARD et al., 2001). O fornecimento de fontes de gordura com alta proporção de ácido linoléico pode efetivamente aumentar a concentração de produção de trans-C18:1 e cis-9, trans-11 C18:2 no leite (ABUGHAZALEH et al., 2003). PIPEROVA et al. (2000) analisando o CLA da gordura do leite de animais recebendo dieta com adição de óleo de soja, encontraram redução na concentração de cis-9, trans-11 C18:2 e um aumento nos isômeros trans-10, cis-12 C18:2 e trans-7, cis-9 C18:2. O isômero trans-10, cis-12

C18:2 é provavelmente produzido no rúmen pela ação de uma isomerase específica e então hidrogenado a trans-10 C18:1.

A concentração de ácidos graxos trans C18:1 é por vezes relacionada com redução na produção de gordura no leite. Vacas consumindo dietas suplementadas com gorduras contendo trans-C18:1 ou dietas que estimulem a produção de grandes quantidades de trans-C18:1 no rúmen, podem causar uma queda na concentração de gordura do leite de acordo com WONSIL et al. (1994).

O perfil de ácidos graxos na gordura do leite de vacas suplementadas com óleo de canola e óleo de linhaça apresentou aumento na concentração de trans-11 C18:1, havendo diminuição no conteúdo de gordura do leite (FOCANT et al., 1998).

O uso de óleos nas rações de vacas leiteiras tem potenciais efeitos sobre o metabolismo ruminal (BAUMAN e GRIINARI, 1999). Porém, é preciso considerar que alterações no padrão de fermentação ruminal com a inclusão de fontes de gordura altamente insaturadas pode promover além de reduções no consumo de matéria seca, diminuição na digestibilidade da fibra (NRC, 2001), embora sejam aumentados os teores dos isômeros de CLA na gordura do leite visando produtos mais desejáveis ao consumidor.

De acordo com GRIINARI et al. (2000) e CORL et al. (2001), apesar do CLA ser um intermediário da biohidrogenação ruminal do ácido linoléico, a maior fonte desse AG é a síntese endógena, o que envolve a ação da enzima  $\Delta$ -9 desaturase sobre o trans C18:1, outro intermediário da biohidrogenação ruminal. Isto é comprovado quando se verifica aumento na concentração de CLA na gordura do leite de vacas mantidas em pastagens ou suplementadas com óleo de peixe, fontes reconhecidamente pobres em ácido linoléico.

Segundo FREITAS JÚNIOR (2010), ao avaliar a concentração de vacênico (C18:1 trans) no leite dos animais com avaliação do contraste entre as dietas com óleo de soja e sais de cálcio esta última apresentou maior concentração deste ácido graxo indicando que ocorreu de certa forma maior biohidrogenação para a ração contendo essa fonte de gordura. Teoricamente aumentos na proporção de ácidos graxos insaturados nas rações, promoveria redução na proporção de ácidos graxos

insaturados/saturados C18, mas também promoveria aumentos na concentração de trans-C18:1 como resultados de biohidrogenação. Essa relação foi observada pelos autores com a utilização de óleo de soja. Entretanto de todas as rações experimentais a ração contendo sais de cálcio de ácidos graxos apresentou maior concentração de trans-C18:1 concluindo, que houve biohidrogenação deste suplemento.

De forma geral como consequência a grande mudança no perfil de ácidos graxos para as rações avaliadas foi à redução na secreção de ácidos graxos contendo menos que 16 carbonos (<16 C). Consequentemente, a composição da gordura do leite foi alterada promovendo aumento correspondente na porcentagem da maioria dos ácidos graxos (>16 C). Esses resultados também foram observados em diversos estudos (CHOUINARD et al., 1999a,b; BAUMGARD et al., 2000, 2001; PETERSON et al., 2002; LOOR e HERBEIN, 2003; MACKLE et al., 2003).

## **2.9 Parâmetros Sanguíneos**

Variações dos metabólicos sanguíneos em vacas leiteiras permitem estimar o processo de adaptação metabólica a novas situações fisiológicas ou de alimentação. Estudos citados na literatura apontam resultados inconsistentes com relação aos efeitos da suplementação de gordura nas rações sobre o metabolismo de ruminantes. De acordo com CHRISTENSEN et al. (1994) o metabolismo ruminal, absorção intestinal, transporte sistêmico, metabolismo sistêmico, secreção e deposição de gordura no organismo são aspectos diretamente ligados ao metabolismo de lipídeos e podem influenciar os parâmetros sanguíneos em animais recebendo gordura nas rações.

Entretanto, é preciso considerar que além da fase de lactação, o nível de produção também reflete mudanças no padrão do perfil metabólico em vacas em produção. GONZALES e ROCHA (1998) enfatizaram que vacas de alta produção apresentam níveis sanguíneos de colesterol, uréia e aspartato aminotransferase (AST) significativamente mais elevados, e níveis de cálcio e glicose mais baixos comparados com vacas de baixa produção.

No âmbito da avaliação dos parâmetros sanguíneos de vacas suplementadas com gordura, pode-se afirmar que durante o período de suplementação são esperados aumentos dos níveis de colesterol total, triglicerídeos, e colesterol nas frações HDL, LDL e VLDL, especialmente em função do aumento do nível de gordura circulante (BAUMAN e LOCK, 2006). INGRAHAM e KAPPEL (1988) enfatizaram que avaliar os níveis plasmáticos de colesterol seria parâmetro a ser utilizado para avaliar a capacidade da vaca em produzir mais leite, uma vez que tal concentração reflete a capacidade de mobilização de gordura corporal e ingestão de gordura da dieta para lactogênese.

ELLIOTT et al. (1993) e BREMMER et al. (1998) verificaram aumento da concentração de triglicerídeos e colesterol total em vacas no início de lactação com médias de produção de 40, 35 e 25 kg/dia. Quando se observa a concentração dos mesmos metabólitos sanguíneos em vacas no terço médio de lactação em resposta a suplementação de gordura, não há diferenças nos resultados, ou seja, o aumento do nível de gordura nas deitas promove aumento de tais compostos circulantes de maneira semelhante em vacas no início e terço médio da lactação (KRONFELD et al., 1980; DRACKLEY et al., 1992). SCHAUFF et al. (1992a) e ELLIOTT et al. (1993) enfatizaram que o aumento da concentração de colesterol total no sangue ocorre devido à elevação da demanda necessária para digestão, absorção e transporte de ácidos graxos de cadeia longa ingerida advinda das fontes de gordura.

Além dos metabólitos relacionados ao lipidograma, a determinação da concentração de nitrogênio e uréia circulante é importante para avaliação do balanço de nitrogênio da ração fornecida, pois reflete parte do metabolismo ruminal de proteínas, além de possibilitar avaliação do balanço de proteína/energia da dieta (GONZALES e ROCHA, 1998).

DRACKLEY et al. (1992) e ELLIOTT et al. (1993) avaliaram a suplementação de gordura em vacas Holandesas e não observaram mudanças nas concentrações de uréia no sangue dos animais. De acordo com SCHAUFF et al. (1992a), mudanças nas concentrações de uréia e nitrogênio plasmático poderiam ser atribuídas às baixas concentrações de nitrogênio amoniacal no rúmen.

ÁVILA et al. (2000), avaliaram a suplementação de sebo, gordura amarela e a mistura de ambos em rações experimentais contendo teor médio de extrato etéreo de 6,2 % da MS em vacas no terço médio de lactação. Estes autores verificaram que as concentrações de triglicérides foram significativamente aumentadas no sangue de vacas suplementadas com as rações contendo fontes de gordura, e observaram diminuição nas concentrações plasmáticas de glicose quando sebo foi fornecido nas rações. Estes autores ainda não verificaram alterações nas concentrações de nitrogênio uréico no plasma para as rações experimentais.

GONTHIER et al. (2005), observaram maiores concentrações de colesterol em vacas no terço final de lactação, suplementadas com sementes de linhaça com rações contendo cerca de 7,2% de ácidos graxos na MS. Entretanto, estes autores não verificaram alterações nas concentrações de glicose plasmática para vacas suplementadas com gordura.

PETIT et al. (2002), avaliaram a suplementação de sais de cálcio de ácidos graxos, sementes de linhaça e soja micronizada como fonte de gordura nas rações de vacas leiteiras no início de lactação com rações contendo cerca de 8,0% de EE. Estes autores observaram maior concentração de colesterol para as vacas suplementadas com sais de cálcio de ácidos graxos, e baixa concentração para sementes de linhaça.

### **2.9.1 Fontes de Ácidos Graxos da Dieta**

Ácidos graxos estão presentes em alimentos da dieta de ruminantes como triglicerídeos (Triacilglicerois) os quais são depósitos de lipídeos, fosfolipídeos os quais são localizados nas membranas das células, e galactolipídeos (glicolipídeos), específicos de lipídeos de forragens. Forragens e outros alimentos padrões de ruminantes como cereais contêm menos do que 4% de lipídeos. Em cereais a maioria destes lipídeos são AG enquanto que em forragens menos do que a metade são AG. Em países temperados as forragens podem conter 3% de AG durante o inverno e durante o verão em torno de 1%. (BAUCHART et al., 1984). Existem menos variações com espécies de forragens (DEWHURST et al., 2001). O conteúdo de AG quando não

alterado pelo processo de ensilagem, é geralmente reduzido pelo processo de oxidação, e para os menores níveis de AG. O principal AG de forragens frescas é o ácido linolênico (C18:3 n-3 ou cis-9 cis-12, cis15- C18:3) o qual representa cerca de 50% do total de AG. O ácido palmítico (C16:0) e o ácido linoléico (C18:2 n-6 ou C18:2 cis9-, cis 12) ocorre em uma média de 20 a 15% do total de AG, respectivamente. A composição de AG não é alterada pelo processo de ensilagem, mas a proporção de ácido linolênico é reduzida em cerca de 30%. O conteúdo de AG da silagem de milho gira em torno de 2% com média de 15,20; 45,0 e 5% de ácido palmítico, oléico (C18:1 n-9 ou C18:1 cis-9), e ácido linolênico respectivamente. Cereais contêm 2 a 3% de AG, dos quais em torno de 50% é ácido linoléico. Ruminantes podem comer sementes de oleaginosas, ricas em lipídeos e também pode consumir produtos marinhos, óleos de peixe, produtos de peixes e algas, dos quais os lipídeos são ricos em C20 e C22 n-3, principalmente o ácido graxo eicosapentanoico (EPA C20:5 n-3) e o descosapentanoico (DHA C22:6 n-3) mas sua composição de AG é extremamente variável. De acordo com as espécies de peixes, o principal AG pode também ser o EPA ou o DHA. Algumas espécies podem ser pobres em ambos EPA e DHA (MEDALE et al., 2009).

Os tratamentos de fontes de lipídeos também podem resultar em produtos industriais os quais são dados a ruminantes como suplementos. Sais de cálcio de AG são geralmente feitos de óleo de palma ou derivados de óleo de palma, mas alguns são baseados em outros óleos vegetais como o de soja. Óleos e sementes oleaginosas podem também ser tratadas com formaldeído para proteção da degradação no rúmen (visto a avaliação e proteção) A cristalização de gordura, e peletização também pode ser realizada de ácidos graxos monoinsaturados de fontes hidrogenadas.

#### **2.9.1.2 Óleo de soja**

Diferentes fontes de gordura têm sido utilizadas nas rações de vacas leiteiras, sendo que cada uma delas possuem características específicas que conferem diferentes efeitos sobre a fermentação ruminal, digestibilidade de nutrientes, consumo de matéria seca, e produção e composição do leite. ALLEN (2000) enfatiza que

respostas diferentes são esperadas com diferentes suplementos de gordura, pois os efeitos da suplementação são inerentes às características físicas e químicas específicas dos ácidos graxos suplementados.

O grau de saturação se apresenta como uma das principais características inerentes ao tipo de gordura suplementada que pode interferir diretamente no metabolismo ruminal podendo afetar o aproveitamento de nutrientes. Os produtos a base de soja possuem grande percentual de ácidos graxos insaturados, principalmente o óleo de soja, em média, com 75% de insaturação. Óleos vegetais nas rações de ruminantes apresentam efeitos desejáveis, como inibição da produção de metano, redução da concentração de  $\text{N-NH}_3$  ruminal, aumento na eficiência da síntese microbiana e aumento de ácido linoléico conjugado (CLA) (PALMQUIST e MATOS, 2006).

Por outro lado, a utilização de óleos vegetais como fonte de gordura para ruminantes, mais especificamente vacas leiteiras, pode causar efeitos indesejáveis, como a redução na digestibilidade da matéria seca, redução na relação acetato:propionato e conseqüente diminuição da gordura do leite (VARGAS et al., 2002).

Dietas de ruminantes normalmente contêm cerca de 2,5 a 3,0 % de extrato etéreo, portanto, a suplementação de gordura deve levar em consideração a quantidade e a fonte de lipídios a ser utilizada para que não haja mudanças no padrão de fermentação ruminal, já que gorduras insaturadas possuem efeitos inibitórios sobre microrganismos ruminais (PALMQUIST, 1991; JENKINS, 1993). UEDA et al. (2003) enfatizaram que se tem poucas informações sobre o uso de óleos na digestibilidade de vacas leiteiras lactantes, já que a inclusão de níveis de 2 a 3% de óleo na matéria seca total da dieta têm importância prática.

Óleos reduzem a digestibilidade aparente total de carboidratos quando se fornece silagem de milho como volumoso quando comparado com feno de gramíneas. Assim, os efeitos de ácidos graxos insaturados pode ser variável devido às diferenças na dieta basal (UEDA et al. 2003).

HUANG et al. (2008) avaliaram o efeito da suplementação de 5% óleo de soja na matéria seca total em 36 vacas da raça Holandesa no terço médio de lactação, sendo analisados os parâmetros fermentação ruminal e o perfil de ácidos graxos da gordura do leite. Foi utilizada a silagem de milho e feno de alfafa como volumoso. Estes autores verificaram que a suplementação de gordura teve pouco ou nenhum efeito sobre a fermentação ruminal, e enfatizou que para maximizar o conteúdo de CLA no leite, o ideal seria suplementar sementes ricas em ácido linoléico (C18:2), a combinação de óleos ricos em C18:2, e sais de cálcio com CLA, sendo do ponto de vista econômico, o óleo de soja a melhor opção. SANTOS et al. (2001) avaliaram a inclusão de óleo de soja (4,6% da matéria seca) como fonte de gordura sobre a produção de CLA no leite, e concluíram que a suplementação de óleo de soja aumentou significativamente o teor de CLA na gordura do leite.

#### **2.9.1.3 Grão de soja**

A soja destaca-se entre os alimentos protéicos de origem vegetal como fonte alternativa de proteína e energia, sendo considerada semente de oleaginosa mais rica e disponível no mundo, podendo ser usada na alimentação dos ruminantes na sua forma original (crua) ou processada (CORRÊA, 2007).

Entre as características nutritivas da soja integral na nutrição de ruminantes destaca-se a alta quantidade de proteína degradável no rúmen (PDR), que pode ser convertida em proteína não degradada no rúmen (PNDR) por meio de tratamento térmico, e ao seu alto teor de energia devido ao elevado teor de extrato etéreo. De acordo com o NRC (2001) e VALADARES FILHO et al. (2006), a soja crua possui cerca de 19,20 % de extrato etéreo e 39,20 % de proteína bruta na matéria seca.

Segundo BATEMAN e CLARK (2000), a utilização do grão de soja nas rações de vacas leiteiras pode proporcionar maiores aumentos na produção de leite maiores do que quando se utiliza quantidades semelhantes de farelo de soja na ração. O grão de soja integral (GSI) ainda destaca-se pela sua disponibilidade regional, pelo elevado teor



de ácidos graxos insaturados e pela grande aceitação pelos animais (PALMQUIST, 1978; PALMQUIST, 1991; RABELLO et al., 1996; PALMQUIST; MATTOS 2006).

Entre as vantagens de uso do grão de soja integral como fonte de gordura pode ser citada a lenta liberação de lipídios no rúmen, não superando a capacidade de hidrogenação dos microrganismos ruminais, impedindo possível perda de digestibilidade de fibra pelo efeito negativo que gorduras insaturadas prontamente disponíveis no rúmen podem causar nas bactérias fibrolíticas (COPPOCK e WILKS, 1991; PALMQUIST, 1991). Isso ocorre em sementes de oleaginosas porque a maioria dos lipídios encontra-se no germe e, portanto, há necessidade da degradação da parede celular para que a hidrólise se inicie. Após a liberação da matriz, os triacilgliceróis são rapidamente fermentados a ácidos graxos voláteis (PALMQUIST e MATTOS, 2006).

Apesar de alguns estudos terem avaliado o uso do GSI como fonte de gordura para vacas leiteiras e não terem verificado redução do consumo de matéria seca e desempenho dos animais suplementados, é preciso enfatizar que o período de adaptação e a aceitabilidade da fonte de gordura também têm influência direta sobre a redução no consumo de vacas leiteiras quando se usa o grão de soja como fonte de gordura (STAPLES et al., 2001).

DUARTE et al. (2005) avaliaram a suplementação de GSI como fonte de gordura e a silagem de milho e feno de alfafa como volumosos em vacas da raça Jersey no terço inicial de lactação, e avaliaram o consumo, produção e composição do leite. Estes autores observaram redução na produção de leite para as vacas que receberam o GSI como fonte de gordura, no entanto, não houve diferença na composição do leite, consumo de matéria seca e mudança de peso corporal das vacas suplementadas com GSI em relação às demais fontes de gordura utilizadas. CARVALHO e MUHLBACH (2002) avaliaram o efeito da inclusão de 16,77% de SGI em vacas da raça Holandesa com média de produção de 27,0 kg/dia e 76 dias de lactação. Estes autores verificaram menor produção de leite para as vacas que receberam grão de soja cru quando comparada com a soja tostada.

Entretanto, LOPEZ et al. (2007) avaliaram a inclusão do GSI na dieta de vacas Jersey com 38 dias de lactação, e não verificaram diferença entre as dietas experimentais sobre a produção e composição do leite. VARGAS et al. (2002) avaliaram vacas da raça Holandesa com 30 dias de lactação e com média de produção de 21kg/dia utilizando diferentes fontes de gordura, incluindo a suplementação de grão de soja em 23,5% da matéria seca total, sendo utilizado silagem de sorgo como volumoso. Estes autores não verificaram efeito do GSI sobre a produção e composição do leite em relação à dieta controle.

SANTOS et al. (2001) incluíram grão e soja moído em 23,5% da matéria seca total em vacas 7/8 Holandês-Zebu com trinta dias de lactação, e com média de produção de leite de 20 kg/dia, e também não verificaram efeito do grão de soja em relação à dieta controle. CORRÊA (2007) não observou diferença na produção e na composição do leite de vacas da raça Holandesa com média de produção de 30 kg/dia quando avaliaram a utilização do GSI, farelo de soja, soja grão tostada e farelo de soja com uréia.

#### **2.9.1.4 Sais de cálcio de ácidos graxos**

Diversos tipos de suplementos comerciais contendo lipídios inertes no rúmen estão disponíveis no mercado. O mais comum deles são os sais de cálcio de ácidos graxos, obtido a partir de ácidos graxos de cadeia longa. Esses ácidos graxos reagem com os sais de cálcio, unidos na forma de um sal do tipo  $R-COO-Ca$ , popularmente conhecido como sabão de cálcio.

Considerando que ocorra possíveis efeitos deletérios da suplementação de algumas fontes de gordura insaturadas sobre a fermentação ruminal, esses produtos comerciais teriam como principal vantagem fornecer ácidos graxos essenciais que iriam passar direto para o abomaso sem que ocorresse liberação de ácidos graxos no rúmen, e conseqüentemente, intensa biohidrogenação ruminal, não afetando diretamente a população microbiana. Para tal, a ligação entre o cálcio (Ca) e os ácidos graxos não deve ser rompida. Existem no mercado sais de cálcio de ácidos graxos formados a

partir de óleo de palma, colza e soja, sendo que os dois últimos são mais insaturados e mais dissociados e biohidrogenados no rúmen.

De acordo com PALMQUIST e MATTOS (2006), embora os sais de cálcio se dissociem no rúmen, não se observa aumento na concentração de ácidos graxos não esterificados em nível suficiente para prejudicar o metabolismo microbiano. Além disso, os sais de cálcio são considerados fontes de gordura muito digestíveis. KLUSMEYER et al. (1991) utilizaram sais de cálcio em 4% da dieta total em vacas fistuladas no rúmen e duodeno e, observaram biohidrogenação de 33%, concluindo que os ácidos graxos são somente parcialmente protegidos da degradação ruminal. Os sais de cálcio utilizados neste estudo foram de óleo de palma.

Os sais de cálcio de ácidos graxos saturados foram menos dissociados do que sais de cálcio de ácidos graxos insaturados devido aos valores de pH ruminal (SUKHIJA e PALMQUIST, 1990). Isso ocorre porque os SCAGI possuem uma barreira fisiológica podendo ser poupados da dissociação

Sais de cálcio são inertes no rúmen e minimizam os impactos sobre a fermentação, mas limitarão a BHB se o grupo carboxil for mantido evitando a hidrogenação (DOREAU e CHILLIARD, 1997). De acordo com FOTOUHI e JENKINS (1992) para valores de pH normais, o linoleato de cálcio entra em equilíbrio com pequenas quantidades destes ácidos graxos correspondendo a ácidos graxos livres e o AG linoléico. A fração do ácido linoléico disponível para a BHB porque esta com o grupo carboxil livre forçando a dissociação do linoleato de cálcio e mantendo o ácido linoléico agrupado com o cálcio em equilíbrio. Dessa forma os maiores produtos da biohidrogenação do ácido linoléico tal como o ácido esteárico entram em equilíbrio. O resultado final é que a maioria dos ácidos graxos ligados ao cálcio permanecem inertes e passam pelo rúmen, mas são convertidos de insaturados para saturados. Altas concentrações de AG insaturados no rúmen podem causar o acúmulo de C18:1 trans-11 pela inibição da conversão do Ag C18:1 para ácido esteárico C18:0, especialmente quando eles são apresentados como ácidos graxos livres (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1987).

Sempre que se descreve o uso de fonte alternativa de gordura nas rações de animais é preciso enfatizar que o período de adaptação e a aceitabilidade da fonte de gordura podem ser considerados fatores determinantes para que se tenha resposta de desempenho adequada dos animais. ALLEN (2000), em ampla revisão de literatura avaliou estudos que observaram o consumo de matéria seca de diferentes fontes de gordura comumente utilizadas nas rações de vacas leiteiras. Este autor observou que de 24 experimentos utilizando os sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma como fonte de gordura, 11 apresentaram redução do consumo de matéria seca. Esses resultados, segundo este autor, podem ser atribuídos à questão da aceitabilidade desta fonte de gordura, levando dessa forma ao baixo consumo encontrado.

Estudos têm avaliado possíveis efeitos desses suplementos sobre a fermentação ruminal. GRUMMER (1988) avaliou dois suplementos comerciais fornecidos para vacas leiteiras, sendo diferentes na composição de ácidos graxos, especialmente no teor de C18, e não observou efeitos dos suplementos sobre a fermentação ruminal. PALMQUIST (1989) comparou cinco suplementos comerciais de gordura fornecidos entre 2,85 e 5,70% da MS total em vacas Jersey, onde os suplementos diferiam na composição dos ácidos graxos e tecnologia de fabricação. Não houve diferença na digestibilidade de nutrientes, sendo que somente a fermentação ruminal foi levemente afetada quando foi utilizado os sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma.

PALMQUIST et al. (1993) observaram efeitos mínimos da suplementação de sais de cálcio de ácidos graxos juntamente com sebo sobre os parâmetros ruminais e digestibilidade de nutrientes em vacas canuladas no rúmen e íleo, aos 60 dias de lactação. PALMQUIST et al. (1991) não observaram alterações na digestibilidade, consumo de matéria seca, fermentação ruminal e produção e composição do leite de vacas Jersey recebendo entre 500 e 1000g/dia de dois tipos comerciais de sais de cálcio, tendo como volumoso feno moído e silagem de milho.

SCHAUFF e CLARK (1992a) avaliaram a suplementação de sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma com níveis de 0, 3, 6 e 9% da MS total em vacas Holandesas fistuladas no rúmen e no início de lactação, sendo utilizado como volumoso feno de alfafa moído e silagem de milho. Estes autores observaram que o consumo de

matéria seca reduziu linearmente com o aumento dos níveis de sais de cálcio na dieta, definindo como nível ótimo 6% da MS. A produção de leite também reduziu com o aumento dos níveis de sais de cálcio. De acordo com esses resultados estes autores concluíram que a aceitabilidade dos sais de cálcio pode ser problema quando fornecido acima de 6% da matéria seca da dieta.

Apesar de ocorrer redução no consumo de matéria seca em alguns estudos, JENKINS (1993) relata que normalmente o consumo de energia líquida não é reduzido, ou seja, o aumento na densidade energética das rações compensaria a redução no consumo, não afetando a produção de leite. ONETTI e GRUMMER (2004) comprovaram tal hipótese em revisão de literatura onde estes autores compilaram dados de 41 experimentos que avaliaram a suplementação de diferentes fontes e níveis de gordura nas rações de vacas em lactação. De um total de 23 experimentos analisados que usaram os sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma como fonte de gordura, foi observada significativa redução no consumo de matéria seca de 0,97 kg/dia. Entretanto, quando analisada a produção de leite de 21 destes estudos à média de produção de leite foi aumentada em 1,29 kg/dia. Dessa forma, pressupõem-se que o consumo de energia líquida não foi afetado pela redução do consumo de matéria seca.

ONETTI et al. (2001) observaram que não houve redução no consumo de energia líquida em animais submetidos às rações com níveis de inclusão de 4% na matéria seca de sebo e gordura branca, com estes animais apresentando redução no consumo de matéria seca quando comparada as rações controle e com níveis de 2% de inclusão destas fontes de gordura. FERGUSON et al. (1990) avaliaram o desempenho de dois rebanhos de vacas leiteiras com e sem a adição de sais de cálcio de ácidos graxos, perfazendo um total de 384 animais, onde estes autores concluíram que as respostas na produção apresentaram ser viáveis, no entanto, estes autores recomendam que a inclusão de quantidades acima de 5% da matéria seca da dieta pode vir a reduzir o desempenho dos animais.

Em relação à utilização de sais de cálcio diferentes respostas são esperadas de acordo com a fonte de volumoso utilizada. ONETTI e GRUMMER (2004) verificaram em estudos que avaliaram fontes de gorduras com diferentes proporções e tipos de

volumosos nas rações que a suplementação de sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma em dietas com quantidades iguais ou superiores a 60% de silagem de milho como volumoso na matéria seca total, proporcionaram aumento linear da produção de leite em 0,33kg/dia quando comparada a utilização de feno de alfafa em quantidade igual ou maior a 60% da MS, e também a mistura entre 59:41 e 41:59 alfafa silagem de milho no volumoso na matéria seca total.

Dessa forma, a utilização de gordura consideradas como protegidas da degradação ruminal tem como principal vantagem a redução do efeito tóxico sobre os microrganismos ruminais (JENKINS, 1993). No entanto, reduções no consumo de matéria seca em níveis consideráveis podem causar baixo desempenho animal por conseqüente consumo insuficiente de energia líquida para síntese de leite (ONETTI e GRUMMER, 2004).

Ainda, atualmente estão disponíveis no mercado fontes alternativas de sais de cálcio de ácidos graxos com diferenças marcantes no tipo de gordura utilizada. Como exemplo, citam-se os sais de cálcio de óleo de soja ou os sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, recentemente disponíveis no mercado e ainda sem a devida avaliação pela comunidade acadêmica.

#### 2.9.1.5 REFERÊNCIAS

ABUGHAZALEH, A.A.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEL, A.R. Milk conjugated linoleic acid response to fish oil supplementation of diets differing in fatty acid profiles. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.86, n.3, p.944–953, 2003.

AKRAIM, F.; NICOT, M. C. NICOT, P. WEILL, F. ENJALBERT: Effects of preconditioning and extrusion of linseed on the ruminal biohydrogenation of fatty acids. 1. *In vivo* studies. **Anim Research**. 55, 83–91, 2006.

ALLEN, M. S. Effects of Diet on Short-Term Regulation of Feed Intake by Lactating Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1598-1630, 2000.

AVILA, C. D.; DEPETERS, E. J.; PEREZ-MONTI, H.; TAYLOR, S. J.; ZINN, R. A. Influences of saturation ratio of supplemental dietary fat on digestion and milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p.1505–1519, 2000.

BATEMAN, H. G.; JENKINS, C. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to non lactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**. v. 81 n. 9, p. 2451-2458, 1998.

BATEMAN, H. G.; CLARK, J. H. Soybean based feeds for dairy cows, Illini Dairy Net, The online resource for the dairy industry. Disponível em: [www.livestocktrail.uiuc.edu/dairynet/](http://www.livestocktrail.uiuc.edu/dairynet/) 2000.

BAUCHART D. VERITE R.; REMOND B. et al., Long-chain fatty acids digestion in lactating cows fed fresh Grass from spring to autumn. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 64, 330-331. 1984.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutrititunonal manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v. 70, p. 15–29, 2001.

BAUMAN, D. E.; LOCK, A. L. **Concepts in lipid digestion and metabolism in dairy cows**. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 15., 2006, West Lafayette, Cornell University, **Proceedings...** 2006.14 p.

BAUMAN, D.; GRIINARI, J.M. Biosynthesis of CLA and its incorporation into meat and milk of ruminants. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.77, p.117-127, 1999.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Nutrition regulation of milk fat synthesis. **Annual Rev. Nutrition**, v.23, p203-227. 2003.

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

BAUMGARD, L. H.; SANGSTER, J. K.; BAUMAN, D. E. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). **Journal Nutrition**, v. 131, p. 1764-1769, 2001.

BEN SALEM, H.; KRZEMINSKI, R.; FERLAY, A. et al. Effect of lipid supply on in vivo digestion in cows: comparison of hayand corn-silage diets. **Canada journal Animal Science**, v. 73, p. 547–557, 1993.



BICKERSTAFFE, A. N.; WARNER, R. G. Influence of varying temperature on central cooling and warming and on regulation of voluntary feed intake in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 51, p. 1481–1489, 1968.

BREMMER, D. R.; RUPPERT, L. D.; CLARK, J. H. Effects of chain length and instauration of fatty acid mixtures infused into the abomasum of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p. 176-188, 1998.

BRODERICK, G. A. Alfalfa silage or hay versus corn silage as the sole forage for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 3262-3271, 1985.

BYERS, F.M.; SCHELLING, G.T. **Los lípidos en la nutrición de los rumiantes**. In: CHURCH, C. D. (Ed). El ruminante: fisiología digestiva y nutrición. Zaragoza: Acribia, 1993. p.339-356.

CANALE, C. J.; BURGESS, P. L.; MULLER, L. D. et al. Calcium salts of fatty acids in diets that differ in neutral detergent fiber: Effect on lactation performance and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 1031-1038, 1990.

CANT, J. P.; DEPETERS, E. J.; BALDWIN, R. L. Mammary Amino Acid Utilization in Dairy Cows Fed Fat and Its Relationship to Milk Protein Depression. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 762-774, 1993.

CARVALHO, N. M.; MUHBACH, P. R. F. Desempenho de vacas em lactação recebendo grãos de soja crus ou tostados, na composição da dieta. IN: **REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA**, 39., 2002, RECIFE ANAIS... RECIFE: SBZ. 1 CD-ROM.

CARVALHO, N. M.; MULHLBACH, P. R. F. Desempenho de vacas em lactação, recebendo grãos de soja crus ou tostados, na composição da dieta. **Anais...** 39º REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 39., 2002 Recife.[**Anais...**] 2002. 5 p. CD-Rom.

CASPER, D. P.; SCHINGOETHE, D. J. Model to describe and alleviate milk protein depression in early lactation dairy cows fed a high fat diet. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 3327-3335, 1989.

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



CHELIKANI P.K.; GLIMM D.R.; KEISLER DH et al., Effects of feed- ing or abomasal infusion of canola oil in Holstein cows: 2. Gene ex- pression and plasma concentrations of cholecystokinin and leptin. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.288–296, 2004.

CHILLIARD, Y. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 3897-3931, 1993.

CHILLIARD, Y., D. BAUCHART, G. GAGLIOSTRO, A.L. et al. Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 1. Intestinal apparent digestibility of fatty acids and lipids. **Journal of Dairy Science**. 74:490–498, 1991a.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G. Review of Nutritional and Physiological Factors Affecting Goat Milk Lipid Synthesis and Lipolysis, **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1751–1770, 2003b.

CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A. et al. Dieta, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. **Europe Journal Science Technology**, v. 109, p. 828-825, 2007.

CHOUINARD P.Y., CORNEAU L., BUTLER W.R. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. **Journal of Dairy Science**., 84, 680–690, 2001.

CHOUINARD, P. Y.; CORNEAU, L.; BARBANO, D. M. et al. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. **Journal Nutrition**, v. 129, p. 1579-1584, 1999a.

CHOUINARD, Y.; CORNEAU, L.; BARBANO, D.M. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. **Journal of Nutrition**, Savoy, v. 129, n. 8,p.1579-1584, 1999b.

CHOW, J. M.; DEPETERS, E. J.; BALDWIN, R. L. Effect of rumen- protected methionine and lysine on casein in milk when diets high in fat or concentrate are fed. **Journal of Dairy Science**, v.73, p. 1051-1061, 1990.

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

COPPOCK, C. E.; WILKS, D. L. Milk yield, and composition supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: effects on intake, digestion. **Journal Animal Science**, v. 69, p. 3826-3837, 1991.

CORL, B.A.; BAUMGARD, L.H.; DWYER, D.A. The role of D<sup>9</sup> - desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. **Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v.12, n.11, p.622– 630, 2001.

CORRÊA, A. M. V. **Utilização da soja em diferentes formas na alimentação de vacas leiteiras**. 2007, 128 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

CZERKAWSKI, J. W. Microbial fermentation in the rumen. **Proceedings Nutrition Society**, v. 43, p. 101-180, 1984.

DAVIS, C.L.; R.E. BROWN. Low-fat Milk Syndrome. In: A.T. PHILLIPSON (Eds.) **Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant**, Oriel Press Limited, Newcastle upon Tyne, UK, p.545- 565. 1970.

DEVILLARD, E. MCINTOSH F. M., NEWBOLD et al. Rumen ciliate protozoa contain high concentration of conjugated linoleic acids and VA, yet do not hydrogenate linoleic acid desaturase stearic acid. **British Journal of Nutrition**, v. 96, p. 697-704 2006.

DEWHURST R. J.; SCOLLAN N. D.; YUELL et al. Influence of Species cutting date and cutting interval on the fatty acid composition of grasses. **Grass and Forage Science**, v. 56, p. 68-74, 2001

DHIMAN, T. R.; SATTER, L. D. Yield response of dairy cows fed different proportions of alfalfa silage and corn silage. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2069-2087, 1997.

DHIMAN, T. R.; SATTER, L. D.; PARIZA, M. W. et al. Conjugated linoleic acid (cla) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p.1016–1027, 2000.

DOREAU, Biohidrogenação Ruminal de Ácidos Graxos, IN: **SIMPOSIO INTERNACIONAL AVANCOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES**, P 46-58, 2011

DOREAU, M., AND Y. CHILLIARD. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal Nutrition**. 78:S15–S35, 1997.

DOREAU, M.; FERLAY, A. Digestion and utilization of fatty acids by ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, v. 45, p. 379-396 379, 1994.

DOREAU, M.; LEGAY, F.; BAUCHART, D. Effect of source and level of supplemental fat on total and ruminal organic matter and nitrogen digestion in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, pd 2233-2242, 1991.

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier, **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2259-2273, 2000.

DRACKLEY, J. K.; KLUSMEYER, T. H.; TRUSK, A. M. et al. Infusion of Long-chain Fatty Acids Varying in Saturation and Chain Length into the Abomasum of Lactating Dairy Cows, **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1517-1526, 1992.

DUARTE, L. M. A.; STUMPF JÚNIOR, W.; V. FISCHER. et al. Efeito de diferentes fontes de gordura na dieta de vacas Jersey sobre o consumo, a produção e a composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2020-2028, 2005.

ELLIOTT, J. P.; DRACKLEY, J. K.; SCHAUFF, D. J. et al. Diets Containing High Oil Corn and Tallow for Dairy Cows During Early Lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 775-789, 1993.

ENJALBERT, F.; M. C. NICOT, C. BAYOURTHE. et al. Duodenal infusions of palmitic, stearic or oleic acids differently affect mammary gland metabolism of fatty acids in lactating dairy cows. **Journal of Nutrition**, 128, 1525–1532, 1998.

FAICHNEY, G. J.; GORDON, G. L. R.; WELCH, R. J. et al. Effect of dietary free lipid on anaerobic fungi and digestion in the rumen of sheep. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 53, p. 519–527, 2002.

FERGUSON, J.D.; SKLAN, D.; CHALUPA et al. Effect 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.

FOCANT, M., E. MIGNOLET, M. MARIQUE, et al. The effect of vitamin E supplementation of cowdiets containing rapeseed and linseed on the prevention of milk fat oxidation. **Journal of Dairy Science**.v. 81, p.1095–1101. 1998.

FOTOUH, J.; JENKINS, T. C.; JENNY, B. F. Nutrient digestion and lactation performance of dairy cows fed combinations of prilled fat and canola oil. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 3, p. 796-803, 1992.

FREITAS JUNIOR, J. E.; GANDRA, J. R.; RENNÓ, L. N. et al. Effects of fat sources of long chain fatty acids on productive performance, digestive metabolism and milk fatty acids profile of dairy cows fed with corn silage, **Animal**, 2012 (submitted).

FUENTES, C.; CALSAMIGLIA, S.; CARDOZO, W. et al. Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture, **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 4456–4466, 2009.

GAGLIOSTRO, G.; Y. CHILLIARD, M. J. DAVICCO: Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 3. Plasma hormones and mammary apparent uptake of metabolites. **Journal of Dairy Science**, 74, 1893–903, 1991.

GARNSWORTHY, P. C. Fat in dairy cow diets. In: WISEMAN, J.; GARNSWORTHY, P. C. **Recent developments in ruminant nutrition 4**. Nottingham: University Press, 2002. 600 p.

GLASSER, F. M.; DOREAU, A.; FERLAY, J. J.; LOOR, Y.; CHILLIARD: Milk fatty acids: Mammary synthesis could limit transfer from duodenum in cows. **Europe Journal Lipid Science Technoogy**. 2007.

GLASSER, F.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. Oilseed Lipid Supplements and Fatty Acid Composition of Cow Milk: A Meta-Analysis, **Journal of Dairy Science**. V.91, p. 4687-4703, 2008.

GONTHIER, C.; MUSTAFA, A.; BERTHIAUME, F. R. et al. Effects of feeding micronized and extruded flaxseed on ruminal fermentation and nutrient utilization by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1854-1863, 2005.

GONZALES, F. H. D.; ROCHA, J. A. R. Metabolic profile variations and reproduction Performance in Holstein cows of different Milk yields in southern Brasil. **Arquivo da Faculdade Veterinária**, UFRGS, v. 26, n. 1, p. 53-64, 1998.

GRIINARI, J.M.; CORL, B.A.; LACY, S.H. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by D9-desaturase. **Journal of Nutrition**, Savoy, v.130, n.12, p.2285-2291, 2000.

GRUMMER, R. R. Gordura da dieta: Fonte energética e/ou regulador metabólico? In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 8, 2004, Uberlândia. Anais... Uberlândia:CONAPEC Jr-UNESP-BOTUCATU, p.83-108, 2004.

GRUMMER, R. R. Influence of prilled fat and calcium salt of palm oil fatty acids on ruminal fermentation and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.1, p.117-123, 1988.

GRUMMER, R. R.; HATFIELD, M. L.; DENTINE, M. R. Acceptability of fat supplements in four dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 3, p. 852-857, 1990.

HARFOOT, C. G.; HAZLEWOOD, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London, UK: Chapman & Hall, 1997. p. 382-426.

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of Fatty Acid Supplements on Milk Yield and Energy Balance of Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p.1081–1091, 2006a.

HINO, T; S. FUKUDA: Biohydrogenation of linoleic and linolenic acids, and production of their conjugated isomers by *Butyrivibrio fibrisolvens*. In: *4th Euro Fed Lipid Congress "Oils, Fats and Lipids for a Healthier Future"*. **Europe Feding Lipid**, Frankfurt (Germany) 2006, p 551.

HUANG, Y.; SCHOONMAKER, J. P.; BRADFORD, B. J. et al. Response of Milk Fatty Acid Composition to Dietary Supplementation of Soy Oil, Conjugated Linoleic Acid, or Both, **Journal of Dairy Science**, V. 91, p. 260–270, 2008.

INGRAHAM, R. H.; KAPPEL, L. C. Metabolic profile testing. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal**, v. 4, p. 391-411, 1988.

JENKINS, T. C. Butylsoyamide protects soybean oil from ruminal biohydrogenation: effects of butylsoyamide on plasma fatty acids and nutrient digestion in sheep. **Journal Animal Science**, v. 73, p. 818-823, 1995.

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

JENKINS, T. C.; JENNY, B. F. Nutrient digestion and lactation performance of dairy cows fed combinations of prilled fat and canola oil. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 3, p. 796-803, 1992.

JENKINS, T.C.; BRIDGES W.C. Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle. **Europe Journal Lipid Science technology**, v 109, p.778-789, 2007.

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

KALSCHEUR, K.F.; TETER, B.B.; PIPEROVA, L.S. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of *trans*-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.80, n.9, p.2104-2114, 1997a.

KEENEY M.: **Lipid metabolism in the rumen**. In: *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. Ed. A. T. Phillipson, Oriel Press, Newcastle upon Tyne (UK) 1970, pp. 489– 503.

KEMP, P.; LANOER . D. J. Hydrogenation in vitro of  $\alpha$ -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. **Journal of General Microbiol**, v. 130, p. 527-533, 1984.

KEPLER, C. R.; TUCKE, W. P.; TOVE, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. IV. Substrate specificity and inhibition of linoleic  $\delta$ -12-*cis*,  $\delta$ -11-*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, p. 3612–3820, 1970.

KLUSMEYER, I. H.; LYNCH, G. L.; CLARK, J. H. et al. Effects of Calcium Salts of Fatty Acids and Protein Source on Ruminal Fermentation and Nutrient Flow to Duodenum of Cows, **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 2206-2219, 1991.

KRONFELD, D. S.; DONOGHUE, S.; NAYLOR, J.M. ET AL. Metabolic effects of feeding protected tallow to dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.63, n.4, p.545-552, 1980.

LATHAM, G. V., EWING, M., PRESS, F. et al. APOLLO 16 PRELIMINARY SCIENCE REPORT, NASA SP-315, 9., 1972.

LEE, M. R. F.; WINTERS A. L.; SCOLLAN N.D. et al., Plant mediated lipolysis and proteolysis in red clover with different polyphenol oxidase activities, **Journal Of Science of Food and Agriculture**, V 84, P. 1639-1645, 2004

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 3. ed. Barcelona: Saevier, 2005.

LOCK, A. L.; BAUMAN, D. E.; GARNSWORTHY, P. C. Short communication: effect of production variables on the *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid content of cows' milk. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2714-2717, 2005.

LOOR, J. J. UEDA, K. FERLAY, A. et al. Biohydrogenation, Duodenal Flow, and Intestinal Digestibility of Trans Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acids in Response to Dietary Forage:Concentrate Ratio and Linseed Oil in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.2472-2485, 2004.

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

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

LÓPEZ, S.; LÓPEZ, J.; STUMPF JUNIOR, W. Produção e composição do leite e eficiência alimentar de vacas da raça Jersey suplementadas com fontes lipídicas. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 15, n. 1, p. 1022-1301, 2007.

LOURENÇO, M.; RAMOS-MORALES, E. WALLACE, R. J. et al, The role microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation, **Animal**, V. 4, P. 1008-1023, 2010.

LUNDY, F. P.; BLOCK, E.; BRIDGES, W. C.; BERTRAND, JR., J. A.; JENKINS, T. C. Ruminant Biohydrogenation in Holstein Cows Fed Soybean Fatty Acids as Amides or Calcium Salts **Journal of Dairy Science**, v.87, p. 1038-1046, 2004.

MACKLE, T. R.; KAY, J. K.; AULDIST, M. J. et al. Effects of abomasal infusion of conjugated linoleic acid on milk fat concentration and yield from pasture-fed dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 644- 652, 2003.



MEDALE F. Teneur en lipides et composition en acides grâs de La chair de poissons issus de La peche et de l'elevage. **Cahiers de Nutrion et de Dietetique**, v. 44, 173-181, 2009.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washinton, D.C.: National Academic Press, 2001. 381 p.

ONETTI S, G.; GRUMMER, R. R. Response of lactating cows to three supplemental fat sources as affected by forage in the diet and stage of lactation: A meta-analysis of literature. **Animal Feed Science and Technology**, v. 115, p. 65–82, 2004.

ONETTI, S. G.; SHAVER, R. D.; MCGUIRE, M. A.; GRUMMER, R. R. Effect of type and level of dietary fat on rumen fermentation and performance of dairy cows fed corn silage-based diets. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2751-2759 2001.

PALMQUIST, D. Biohydrogenation then and now, **Europe Journal Science Technology**, v. 109, p. 737-739, 2007.

PALMQUIST, D. L. Influence of source and amount of dietary fat on digestibility in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 1354-1360, 1991.

PALMQUIST, D. L. The feeding value of fats. In: ORSKOV, E. R. (Ed.). **World animal science**. B. Disciplinary approach. 4. Feed Science. Amsterdam: Elsevier, 1988. p. 293–311.

PALMQUIST, D. L., A. D. BEAULIEU, D. M. BARBANO. Feed and Animal factors influencing milk fat composition. **Journal of Dairy Science**. 76, 1753–1771, 1993.

PALMQUIST, D. L.; CONRAD, H. R. High fat rations for dairy cows. Effects on feed intake, milk and fat production, and plasma metabolites. **Journal of Dairy Science**, v. 61, n. 7, p. 890-901, 1978.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: Review. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 1-14, 1980.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. **Metabolismo de Lipídeos**. In: BERCHIELI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.) *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 287-310.

PALMQUIST, D. L.; MOSER, E.A. Dietary fat effects on blood insulin, glucose utilization, and milk protein content of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.64, n.8, p.1664-1670, 1981.



PALMQUIST, D.L. Influence of source and amount of dietary fat on digestibility in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.4, p.1354-1360, 1991.

PALMQUIST, D.L. Suplementação de lipídios para vacas em lactação. IN: **SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE RUMINANTES**, 6, 1989, PIRACICABA. **Anais...PIRACICABA: FEALQ**. P.11-25, 1989.

PENNINGTON, J. A.; DAVIS, C. L. Effects of Intraruminal and Intra-Abomasal Additions of Cod-Liver Oil on Milk Fat Production in the Cow. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p.49-55, 1975.

PETERSON, S., DAHL, T. M., SCOTT, C.L. Lipid biomarkers and trophic linkages between ctenophores and copepods in svalbard waters. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 227, p. 187-194, 2002.

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

PIPEROVA L.S.; SAMPUGNA J.; TETER B.B. et al. Duodenal and milk trans octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that postabsorptive synthesis is the predominant source of cis-9-containing CLA in lactating dairy cows. **Journal Nutrition**, v.132, p.1235–41, 2002.

PROELL, J. M.; E. E. MOSLEY, G. L. POWELL. et al Isomerization of stable isotopically labeled elaidic acid to cis and *trans* monoenes by ruminal microbes. **Journal Lipid Reseach**. 43, 2072–2076, 2002.

RABELLO, T. M.; VALADARES FILHO, S. C.; COELHO DA SILVA, J. F. Grão de soja moído na alimentação de vacas em lactação. consumos, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 25, n. 2, p. 345-356, 1996.

ROMERO, P.; RIZVI, S.H.; KELLY, M.L. Concentration of conjugated linoleic acid from milkfat with a continuous supercritical fluid processing system. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.83, n.1, p.20-22, 2000.

SANTOS, F. L.; LANA, R. P., SILVA, M. T. C. et al. Produção e composição do leite de vacas submetidas a dietas contendo diferentes níveis e formas de suplementação de lipídios. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 30, n. 4, p. 1376-1380, 2001.

SCHAUFF, D. J.; ELLIOIT, J. P.; CLARK, J. H. et al. Effects of feeding lactating dairy cows diets containing whole soybeans and tallow. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1923-1935, 1992a.

SCHINGOETHE, D. J. Model to describe and alleviate milk protein depression in early lactation dairy cows fed a high fat diet. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.12, p. 3327-3335, 1989.

SMITH, N. E.; DUNKLEY, W. L.; FRANKE, A. A. Effects of feeding protected tallow to dairy cows in: early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p.747, 1978.

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

STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R. Fat supplementation strategies for lactating dairy cow diets. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE BOVINOCULTURA DE LEITE, 2., 2001, Lavras. **Anais...** Lavras:UFLA, 2001. p. 161-178.

SUKHIJA, P. S.; D. L. PALMQUIST. Dissociation of calcium soaps of long chain fatty acids in the rumen fluid. **Journal of Dairy Science**., 1990.

UEDA, K.; FERLAY, A.; CHABROT, J. et al. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3999-4007, 2003.

VALADARES FILHO, S. C.; MAGALHÃES, K. A.; ROCHA JÚNIOR,V. R. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. Viçosa: UFV, 2006. 329 p.

VAN RANST, G.; FIEVEZ, V.; VENDEWALLE, M. et al., In Vitro study of red clover polyphenol oxidase activity , activation and effects on mensuared lípase activity and lipolysis. **Journal of Agricultural nad food Chemistry**, v. 57, 6611-6617, 2009.

VARGAS L. H.; LANA, R. P.; JHAM, G. N. et al. Adição de lipídios na ração de vacas leiteiras: parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 522-529, 2002.

WAŚOWSKA, I., M.; MAIA, R. G.; NIEDŹWIEDZKA, K. M. et al.. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. **Britch Journal Nutrition**. V.95, p.1199-1211, 2006.

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

WU, J.T.; HUBER, S.C.; CHAN, J.M. et al. Effect of source and amount of supplemental fat on lactation and digestion in cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, n.6, p.1644-1651, 1994.

WU, Z.; HUBER, J.T. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. **Livestock Production Science**, v.39, n.2, p.141-155, 1993.

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

ZHENG, H. C.; LIU, J. X.; YAO, J. H. et al. Effects of dietary sources of vegetable oils on performance of high-yielding lactating cows and conjugated linoleic acids in milk. **Journal of Dairy Science**, 84, 350 – 370, 2005.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local, Instalações e Animais

Este estudo foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em Pirassununga.

Foram utilizadas 8 vacas da raça Holandesa ( $80 \pm 20$  dias em lactação; média  $\pm$  DP) peso corporal ( $580 \pm 25$  kg; média  $\pm$  DP) e produção média de 25 kg leite/vaca/dia, canuladas no rúmen e no abomaso distribuídas em dois quadrados latinos 4x4 balanceados contemporâneos. Foram fornecidas 4 dietas experimentais sendo uma dieta controle e três dietas contendo suplementos de gordura conforme a Tabela 1. As vacas foram preparadas cirurgicamente 30 dias após a data do parto. Todos os procedimentos experimentais aplicados neste trabalho incluindo o procedimento cirúrgico seguiram os "Princípios Éticos na Experimentação Animal" recomendados pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Antes do início do experimento foi determinado o peso de corpo vazio das vacas removendo todo o conteúdo ruminal sendo o peso de  $516 \pm 33$  kg (HAVARTINE e ALLEN, 2006a).

As vacas foram alojadas em sistema tipo free-stall sendo alimentadas as 8 h e as 13 h 30. Foi realizado o consumo das dietas experimentais com o controle individual do fornecimento diário de matéria seca. Após os procedimentos de ordenha os animais permaneciam cerca de 1 hora em curral de descanso, de forma que fosse avaliada a ocorrência de estro, e ao mesmo tempo, permitisse que as vacas se exercitassem.

Os animais selecionados apresentaram características semelhantes entre si, para melhor distribuição nos tratamentos avaliados. As variáveis obtidas como critério para a seleção dos animais foram: produção de leite na lactação anterior; peso corporal; ordem de partos e escore de condição corporal.

### 3.2 Dietas Experimentais e Análise de Alimentos

Os animais foram alimentados com quatro dietas durante o período experimental, formuladas para serem isonitrogenadas, de forma a atenderem as exigências nutricionais de vacas em lactação com aproximadamente 580 kg de peso corporal, conforme recomendações do NRC (2001).

As vacas foram distribuídas aleatoriamente para receber as seguintes dietas experimentais: 1) Controle (C), composto por uma dieta basal a base de farelo de soja e milho; 2) Óleo de soja (OS); 3) Grão de soja (GS); e 4) Sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (SCAG) (MEGALAC-E®) (Química Geral do Nordeste e Arm & Hammer, Inc.) (MG). As respectivas dietas, água foram fornecidos a vontade durante todo período experimental. O volumoso utilizado durante o experimento foi à silagem de milho.

Diariamente foram feitas pesagens das quantidades do volumoso e dos concentrados fornecidos e das sobras de cada tratamento, para estimativa do consumo. Os animais foram arraçoados de acordo com o consumo de matéria seca no dia anterior, mantendo-se o percentual de sobras diárias das dietas, entre 5 e 10% do fornecido para não haver limitação de consumo. O volumoso e o concentrado foram misturados, e fornecidos na forma dieta total no cocho. Após o preparo da mistura no cocho, as amostras dos alimentos fornecidos foram coletadas e armazenadas a -20 °C. Posteriormente foram realizadas análises químico-bromatológicas. A coleta das amostras foi realizada ao final de cada período experimental, após o período de adaptação às dietas por meio da formação do pool dos ingredientes, e silagem utilizados. A proporção dos ingredientes no concentrado e dieta total, assim como a respectiva composição bromatológica dos ingredientes, concentrados, dietas e perfil de ácidos graxos dos ingredientes utilizados nas dietas encontram-se nas Tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1 – Composição química, nutrientes digestíveis totais (NDT); energia líquida de lactação (EL<sub>L</sub>), e energia bruta (EB), obtidos para os ingredientes

| Itens                                  | Silagem de milho | Farelo de soja | Milho Moído | Grão de soja | Sais de cálcio | Óleo de soja |
|----------------------------------------|------------------|----------------|-------------|--------------|----------------|--------------|
| Matéria seca                           | 36,70            | 89,46          | 87,57       | 91,85        | 97,23          | 99,88        |
| Matéria orgânica                       | 92,57            | 93,13          | 98,65       | 94,73        | 75,24          | -            |
| Matéria mineral                        | 7,43             | 6,87           | 1,35        | 5,27         | 24,76          | -            |
| Proteína Bruta                         | 8,02             | 52,0           | 8,40        | 39,0         | -              | -            |
| NIDN <sup>1</sup>                      | 15,68            | 4,88           | 9,53        | 17,27        | -              | -            |
| NIDA <sup>2</sup>                      | 7,85             | 2,75           | 3,84        | 6,46         | -              | -            |
| Extrato Etéreo                         | 3,16             | 1,32           | 4,07        | 20,00        | 85,77          | 99,88        |
| Carboidratos Totais                    | 81,39            | 39,81          | 86,18       | 35,73        | -              | -            |
| FDN <sup>3</sup>                       | 47,70            | 20,93          | 12,07       | 25,96        | -              | -            |
| FDN <sub>cp</sub> <sup>4</sup>         | 37,20            | 16,33          | 9,41        | 20,25        | -              | -            |
| CNF <sup>5</sup>                       | 36,85            | 20,20          | 78,18       | 29,77        | -              | -            |
| FDA <sup>6</sup>                       | 25,08            | 10,97          | 7,05        | 24,15        | -              | -            |
| FDNi                                   | 17,31            | 2,00           | 1,08        | 1,06         | -              | -            |
| Lignina                                | 2,51             | 0,50           | 1,10        | 2,70         | -              | -            |
| NDT <sup>7</sup>                       | 69,04            | 74,62          | 89,29       | 97,67        | 165,97         | 183,92       |
| EL <sub>L</sub> <sup>8</sup> (Mcal/kg) | 1,40             | 2,50           | 2,10        | 3,20         | 5,30           | 6,15         |
| EB <sup>9</sup> (cal/g de MS)          | 4259,90          | 4814,00        | 4476,80     | 5847,30      | 8695,80        | 9365,2       |

<sup>1</sup> nitrogênio insolúvel em detergente neutro (% do NT); <sup>2</sup> nitrogênio insolúvel em detergente ácido (% do NT); <sup>3</sup> fibra em detergente neutro; <sup>4</sup> fibra em detergente neutro livre de cinzas e proteína; <sup>5</sup> carboidratos não fibrosos; <sup>6</sup> fibra em detergente ácido; <sup>7</sup> nutrientes digestíveis totais; <sup>8</sup> energia líquida de lactação calculado de acordo com o NRC (2001); <sup>9</sup> energia bruta.

Tabela 2 - Composição química bromatológica dos concentrados experimentais

| Nutrientes                                | C <sup>1</sup> | OS <sup>2</sup> | GS <sup>3</sup> | SCAG <sup>4</sup> |
|-------------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
|                                           | % MS           |                 |                 |                   |
| Milho moído                               | 62,78          | 55,64           | 50,00           | 56,96             |
| Farelo de soja                            | 30,04          | 31,20           | 11,64           | 31,20             |
| Óleo de soja                              | -              | 6,00            | -               | -                 |
| Grão de soja                              | -              | -               | 32,00           | -                 |
| Sais de cálcio                            | -              | -               | -               | 6,00              |
| Uréia                                     | 1,36           | 1,36            | 0,52            | 1,36              |
| Sulfato de amônia                         | 0,20           | 0,20            | 0,20            | 0,20              |
| Bicarbonato de sódio                      | 1,84           | 1,84            | 1,84            | 1,84              |
| Óxido de Magnésio                         | 0,28           | 0,28            | 0,28            | 0,28              |
| Fosfato bicálcico                         | 1,16           | 1,16            | 1,16            | 1,16              |
| Calcáreo                                  | 1,36           | 1,36            | 1,36            | -                 |
| Mineral <sup>5</sup>                      | 0,42           | 0,42            | 0,42            | 0,42              |
| Sal comum                                 | 0,58           | 0,58            | 0,58            | 0,58              |
| Composição química                        |                |                 |                 |                   |
| Matéria seca <sup>6</sup>                 | 89,05          | 89,83           | 89,95           | 89,47             |
| Matéria orgânica                          | 89,91          | 83,95           | 90,48           | 85,25             |
| Proteína bruta                            | 24,70          | 24,71           | 24,19           | 24,82             |
| Extrato etéreo                            | 2,95           | 8,67            | 8,59            | 7,88              |
| Carboidratos totais <sup>7</sup>          | 66,06          | 60,37           | 59,16           | 61,51             |
| Fibra em detergente neutro                | 13,86          | 13,25           | 16,78           | 13,41             |
| Carboidratos não fibrosos <sup>8</sup>    | 55,15          | 49,80           | 50,97           | 50,83             |
| Fibra em detergente ácido                 | 7,72           | 7,35            | 4,80            | 7,44              |
| Lignina                                   | 0,84           | 0,77            | 0,62            | 0,78              |
| Matéria mineral                           | 10,11          | 10,09           | 9,52            | 10,24             |
| NDT <sup>9</sup>                          | 78,47          | 84,00           | 84,59           | 84,10             |
| EL <sub>L</sub> <sup>9</sup> (Mcal/kg MS) | 2,07           | 2,32            | 2,37            | 2,29              |

<sup>1</sup> Controle; <sup>2</sup> óleo de soja; <sup>3</sup> grão de soja; <sup>4</sup> sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac-E®).

<sup>5</sup> Contém em 1 kg do produto: 125 mg de cobalto, 5625 mg de cobre, 9 mg de enxofre, 312 mg de iodo, 5000 de ferro, 18125 mg de Mn, 144 mg de Se, 23750 mg de Zn, 2000 UI de Vit A, 500 UI de Vit D, 12500 UI de Vit E;

<sup>6</sup> % material natural;

<sup>7</sup> calculados segundo SNIFFEN et al. (1992).

<sup>8</sup> estimados segundo HALL (1998).

<sup>9</sup> estimado pelas equações do NRC (2001);

Tabela 3 – Composição química bromatológica e composição de ácidos graxos das dietas experimentais

|                                           | C <sup>1</sup> | OS <sup>2</sup> | GS <sup>3</sup> | SCAG <sup>4</sup> |
|-------------------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Ingredientes                              | % MS           |                 |                 |                   |
| Silagem de Milho                          | 50,00          | 50,00           | 50,00           | 50,00             |
| Milho moído                               | 31,39          | 27,80           | 21,86           | 28,48             |
| Farelo de soja                            | 15,01          | 15,60           | 5,82            | 15,60             |
| Óleo de soja                              | -              | 3,00            | -               | -                 |
| Grão de soja                              | -              | -               | 16,00           | -                 |
| Sais de cálcio de ácidos graxos           | -              | -               | -               | 3,00              |
| Uréia                                     | 0,68           | 0,68            | 0,24            | 0,68              |
| Sulfato de amônia                         | 0,10           | 0,10            | 0,10            | 0,10              |
| Bicarbonato de sódio                      | 0,92           | 0,92            | 0,92            | 0,92              |
| Óxido de Magnésio                         | 0,14           | 0,14            | 0,14            | 0,14              |
| Fosfato bicálcico                         | 0,58           | 0,58            | 0,58            | 0,58              |
| Calcáreo                                  | 0,68           | 0,68            | 0,68            | -                 |
| Mineral <sup>5</sup>                      | 0,21           | 0,21            | 0,21            | 0,21              |
| Nutrientes                                |                |                 |                 |                   |
| Matéria seca                              | 59,27          | 59,65           | 57,40           | 60,16             |
| Matéria orgânica                          | 91,23          | 88,24           | 88,43           | 91,17             |
| Proteína bruta                            | 16,36          | 16,36           | 17,02           | 16,42             |
| Extrato etéreo                            | 3,06           | 5,91            | 5,75            | 5,52              |
| Carboidratos totais                       | 73,72          | 70,86           | 67,57           | 71,45             |
| Fibra em detergente neutro                | 30,78          | 30,47           | 31,86           | 30,55             |
| Carboidratos não fibrosos <sup>6</sup>    | 46,00          | 43,31           | 41,45           | 43,84             |
| FDNi <sup>8</sup>                         | 1,28           | 1,22            | 1,11            | 1,24              |
| Fibra em detergente ácido                 | 16,40          | 13,97           | 18,58           | 16,26             |
| Lignina                                   | 1,68           | 1,64            | 1,96            | 1,65              |
| Matéria mineral                           | 8,77           | 8,76            | 8,85            | 8,83              |
| NDT <sup>9</sup>                          | 73,75          | 76,50           | 74,01           | 76,57             |
| EL <sub>L</sub> <sup>9</sup> (Mcal/kg MS) | 1,73           | 1,86            | 1,82            | 1,85              |
| Energia Bruta (Mcal/kg MS)                | 4,18           | 4,33            | 4,30            | 4,34              |
| Ácido graxos                              | g/100g de AG   |                 |                 |                   |
| C14:0                                     | 0,35           | 0,35            | 0,37            | 0,38              |
| C16:0                                     | 15,31          | 15,31           | 14,47           | 15,43             |
| C18:0                                     | 3,23           | 3,25            | 3,06            | 3,24              |
| C18:1 <i>cis</i>                          | 12,91          | 13,17           | 13,80           | 13,30             |
| C18:2                                     | 32,04          | 32,27           | 31,51           | 32,56             |
| C18:3                                     | 2,79           | 2,73            | 2,70            | 2,73              |
| Outros                                    | 2,47           | 2,46            | 2,46            | 2,50              |
| Total ácidos graxos                       | 69,10          | 69,54           | 68,37           | 70,14             |
| Total AG Insaturados                      | 47,74          | 48,17           | 48,01           | 48,60             |

<sup>1</sup> Controle; <sup>2</sup> óleo de soja; <sup>3</sup> grão de soja; <sup>4</sup> sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac-E®).

<sup>5</sup> Contem em 1kg do produto: 125 mg de cobalto, 5625 mg de cobre, 9 mg de enxofre, 312 mg de iodo, 5000 de ferro, 18125 mg de Mn, 144 mg de Se, 23750 mg de Zn, 2000 UI de Vit A, 500 UI de Vit D, 12500 UI de Vit E;

<sup>6</sup>% estimados segundo HALL (1998); <sup>8</sup>% fibra em detergente neutro indigestível; <sup>9</sup> estimado pelo NRC (2001).



Tabela 4 – Composição de ácidos graxos dos ingredientes (g/100g de ácidos graxos)

| Item             | Ingredientes |                   |              |       |                  |                |
|------------------|--------------|-------------------|--------------|-------|------------------|----------------|
|                  | Óleo de Soja | SCAG <sup>1</sup> | Grão de Soja | Milho | Silagem de Milho | Farelo de Soja |
| C14:0            | 0,55         | 0,14              | 0,25         | 0,07  | 0,30             | 0,85           |
| C16:0            | 18,17        | 11,55             | 17,34        | 10,22 | 11,57            | 11,81          |
| C18:0            | 3,24         | 3,24              | 3,96         | 3,77  | 3,12             | 2,77           |
| C18:1 <i>cis</i> | 12,47        | 13,35             | 16,53        | 21,67 | 23,04            | 22,89          |
| C18:2            | 48,89        | 42,81             | 50,04        | 48,90 | 50,93            | 48,94          |
| C18:3            | -            | 6,60              | 4,79         | 4,87  | 6,11             | 3,64           |
| Outros           | 4,58         | 0,42              | 0,31         | -     | 0,39             | 1,19           |

<sup>1</sup>Sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac-E®)

As amostras de silagem, sobras, digestas de abomaso e rúmen foram moídas em moinho (MARCONI® - MOD - 0.48) com nitrogênio líquido a -192°C em peneira de crivo de 5 mm para evitar oxidação dos ácidos graxos (Havartine e Allen, 2006a). Em seguida as amostras foram liofilizadas (MARCONI®) e moídas em moinho com peneira de crivo de 1 mm para posterior análises. Todas as amostras foram analisadas quanto aos teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) e lignina de acordo com as metodologias descritas por SILVA e QUEIROZ (2002). O teor de proteína bruta (PB) foi obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25.

Os carboidratos totais (CT) foram calculados segundo SNIFFEN et al. (1992), em que:  $CT = 100 - (\%PB + \%EE + \%MM)$ . Os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF) foram estimados segundo HALL (1998) onde:  $CNF = 100 - [(\%PB - \%PB \text{ Uréia} + \%Uréia) + \%EE + \%MM + \%FDN]$ . Os nutrientes digestíveis totais foram calculados conforme equações do NRC (2001), em que:  $NDT = CNFD + \text{Proteína Digestível} + (AGD * 2,25) + FDND - 7$ , onde Proteína digestível, CNFD, FDND e AGD representam o total destes nutrientes digestíveis. Os nutrientes digestíveis totais observados  $NDT = PBd + FDNd + (EEd * 2,25) + CNFd$  foram calculados de acordo com WEISS et al. (1992).

Os teores de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente neutro livre de cinza

e proteína (FDNcp), e fibra detergente ácido (FDA) foram obtidos conforme método descrito por VAN SOEST et al. (1991), utilizando-se  $\alpha$ -amilase sem adição de sulfito de sódio na determinação do FDN, em Sistema Ankon.

### 3.3 Digestibilidade Aparente Total

A digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes foi determinada por meio da utilização do indicador óxido crômico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ). Do dia 8 ao 15º dia do período experimental foram inseridos pela cânula ruminal 15 g de óxido crômico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) sendo 5 g/vez nos horários 7, 15 e 23 h. As amostras de fezes (500 g) foram coletadas a cada 9 horas nos dias 13º, 14º e 15º do período de coleta totalizando 8 amostras de fezes para cada vaca/ período. O objetivo foi à formação do *pool* representativo de intervalo 3 horas de um período de 24 horas para retirar a variação diurna. Para estimativa da digestibilidade aparente total as amostras de fezes foram digeridas com ácido fosfórico (WILLIAMS et al., 1962) e o cromo foi quantificado por meio de reação colorimétrica. Para determinação da excreção fecal total foi utilizada a seguinte fórmula:  $\text{ETF} = \text{óxido crômico via cânula ruminal 15 g} / \text{concentração de óxido crômico nas fezes}$ . As concentrações de óxido crômico nas fezes foram determinadas através de leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 500 nm.

### 3.4 Fermentação Ruminal

As amostras de líquido ruminal foram coletadas no 17º dia do período experimental, sendo uma coleta realizada antes da alimentação (0 h), e seis coletas com intervalos de 2 horas após a alimentação (2, 4, 6, 8, 10 e 12 h). Logo após a coleta foram determinados os valores de pH ruminal utilizando potenciômetro. As amostras foram armazenadas em caixa térmica e encaminhadas ao Laboratório de Bromatologia e Fisiologia Animal da FMVZ-USP.

As amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 15 minutos, 1 mL do sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio e adicionando-se 0,2 mL de ácido fórmico

P.A., arrolhado, identificado e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Da mesma amostra 2 mL do sobrenadante foi pipetado e armazenado em tubos de ensaio contendo 1 mL de ácido sulfúrico a 1 N, para posterior determinação da concentração de nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ).

A metodologia utilizada para análise de ácidos graxos de cadeia curta foi preconizada por ERWIN et al. (1961), sendo utilizado cromatógrafo a gás (Modelo 9001 Gas Chromatograph, Marca Finnigan) equipado com coluna de vidro de 02 metros de comprimento x 1/4", empacotada com 80/120 Carbopack B-DA/4% Carbowax 20 M. Os gases utilizados foram o nitrogênio como gás de arraste na vazão de 25 ml/minuto, oxigênio como gás comburente na vazão de 175 ml/minuto, e hidrogênio como gás combustível na vazão de 15 mL/minuto. As temperaturas utilizadas do vaporizador foram de  $220^{\circ}\text{C}$ , do detector de ionização de chamas de  $250^{\circ}\text{C}$  e da coluna de separação de  $195^{\circ}\text{C}$  por 03 minutos, aumentando  $10^{\circ}\text{C/minuto}$  até  $200^{\circ}\text{C}$ .

Soluções padrões a 0,1 N de ácido acético, propiônico e butírico foram preparadas e padronizadas com hidróxido de potássio (KOH) 0,1 Normal, a fim de produzir solução padrão de ácidos graxos voláteis de concentração conhecida.

As determinações foram realizadas injetando-se 1  $\mu\text{L}$  de amostra em cromatógrafo integrado a computador, que processava os cálculos de quantificação, utilizando-se do software BORWIN versão 1.21 para cromatografia.

O nitrogênio amoniacal ( $\text{N-NH}_3$ ) foi determinado pelo método de ácido salicílico. Foram adicionados a microplacas contendo amostras de líquido ruminal e ácido sulfúrico a 1 Normal 0,250  $\mu\text{L}$  de tungstato de sódio a 10%, e posteriormente as amostras foram centrifugadas a  $1200 \times g$  durante 15 minutos. Em seguida foram pipetados 5  $\mu\text{L}$  do sobrenadante a uma microplaca e nesta adicionados 100  $\mu\text{L}$  do reagente tamponante (fenol) e 100  $\mu\text{L}$  de hipoclorito.

As microplacas foram agitadas para homogeneização das amostras e colocados em banho maria a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos adquirindo coloração verde. Após resfriamento as amostras foram analisadas em leitora de microplacas ASYS quanto a sua absorbância e os resultados obtidos foram utilizados em equação de regressão

para calcular a concentração em mg/dL, em que: Concentração de N-NH<sub>3</sub> (mg/dL) = Absorbância – (a)/b; b= r<sup>2</sup> da equação elaborada a partir do padrão.

### 3.5 Síntese de proteína microbiana

As análises para determinação da síntese de proteína microbiana foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do VNP-FMVZ-USP. As amostras utilizadas para análise de alantoína no leite foram coletadas dois dias alternados, sendo provenientes das duas ordenhas diárias. Uma alíquota de 10 mL de leite foi diluída com 5 mL de ácido tricloroacético a 25%, sendo filtrada em papel-filtro de 50 µ e congelada para posterior determinação dos níveis de uréia e alantoína no leite desproteinizado. Alíquotas de 50 mL de urina (amostra *spot*) foram obtidas de todas as vacas no 16º dia do período experimental, aproximadamente 4 horas após a alimentação, durante micção estimulada por massagem na vulva. A urina foi filtrada e alíquotas de 10 mL foram diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico. Uma amostra de urina pura foi armazenada para determinação dos compostos nitrogenados totais, de uréia e creatinina.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Laborlab®), utilizando reação enzimática colorimétrica cinética em aparelho SBA-200 CELM®. O volume urinário total diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina das amostras spot, segundo OLIVEIRA et al. (2001).

A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da excreção média diária, estabelecida de 24,05 mg<sup>-1</sup> de peso vivo para vacas leiteiras (CHIZZOTTI, 2004). Dessa forma, com a excreção média diária de creatinina e a concentração de creatinina (mg/dL) na amostra spot de urina, foi estimado o volume total diário de urina, em litros por vaca/dia. As concentrações de alantoína na urina e os de ácido úrico na urina e alantoína do leite foram determinados pelo método colorimétrico, conforme metodologia de FUJIHARA et al. (1987), descrita por CHEN e GOMES (1992).

A excreção total de derivados de purinas foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretadas na urina e da quantidade de alantoína excretada no leite, expressas em mmol/dia. As purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de derivados de purinas (DP, mmol/dia), por meio da equação  $Pabs = (DP - 0,236 \cdot PV^{0,75}) / 0,84$ , em que 0,84 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purina e  $0,236 \cdot PV^{0,75}$ , a excreção endógena de derivados de purina (ORELLANA-BOERO; e BALCELLS e MARTÍN-ORÚE, 2001).

Foram avaliadas também as purinas absorvidas, considerando-se a excreção endógena de  $0,512 \cdot PV^{0,75}$  e a recuperação de 0,70 encontradas por GONZÁLEZ-RONQUILLO, BALCELLS e GUADA (2003). A síntese ruminal de compostos nitrogenados (Nmic, gN/dia) foi calculada com base nas purinas absorvidas (Pabs, mmol/dia), utilizando-se a equação (CHEN e GOMES, 1992):  $Nmic = (70 \cdot Pabs) / (0,83 \cdot 0,134 \cdot 1.000)$ , em que 70 é o conteúdo de N nas purinas (mgN/mol); 0,134, a relação N purina: N total nas bactérias (VALADARES FILHO, 1999); e 0,83, a digestibilidade intestinal das purinas microbianas.

### 3.6 Produção e Composição do Leite

As vacas foram ordenhadas em sistema mecanizado (Maestro Delaval ®) duas vezes ao dia, as 6 e 30 h e as 15 e 30 h, sendo a produção de leite registrada diariamente durante todo o período experimental. A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura (PLC) segundo fórmula de SKLAN et al. (1992), onde  $PLC = (0,432 + 0,1625 \cdot \text{teor de gordura do leite}) \cdot \text{Kg de leite}$ .

As amostras utilizadas para análise da composição do leite foram obtidas no 16º de cada período experimental, sendo cada amostra proveniente das duas ordenhas diárias. Foram determinados também os teores de gordura, proteína e lactose. Para a determinação da gordura no leite foram utilizadas amostras à fresco, segundo a metodologia descrita por Gerber (COELHO e ROCHA, 1977) no Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal do VNP-FMVZ-USP. Também foram

realizadas as análises no leite de nitrogênio total (NT) e lactose utilizando o equipamento LACTOSCAN no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP. Para determinação da uréia e nitrogênio uréico no leite, as amostras de leite foram desproteinizadas da mesma forma que as amostras utilizadas na análise da alantoína. As análises da concentração de uréia no leite desproteinado foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, por meio de kits comerciais (Laborlab® e CELM®). A concentração de nitrogênio uréico no leite foi determinada indiretamente por meio da seguinte fórmula: Nitrogênio uréico = uréia (mg/dL)/2,14

### **3.7 Taxa de passagem de líquido e Dinâmica ruminal**

A taxa de renovação ruminal do FDNi no rúmen foi calculada dividindo-se o consumo de FDN/h pelo tamanho do compartimento (massa ruminal de FDN). A taxa de passagem do FDN pelo rúmen (kp) foi calculada dividindo o tamanho do compartimento ruminal de FDNi pelo consumo de FDNi, baseado no modelo de dois compartimentos para digestão de celulose proposto por (WALDO et al. 1972). A taxa de digestão ruminal em FDN (kd) foi calculada pela diferença entre a taxa de remoção total de FDN do rúmen e sua taxa de passagem (ALLEN e MERTENS, 1988):  $Kd = \text{consumo/h de FDN digestível} - kp / \text{Tamanho do compartimento ruminal de FDN digestível}$ . A digestibilidade ruminal aparente do FDN como porcentagem do FDN foi calculada como: Digestibilidade ruminal do FDN =  $kd / (kd + kp)$ .

A taxa de renovação ruminal, taxa de passagem pelo rúmen, e a taxa de digestão ruminal de cada componente foi calculada de acordo com OBA e ALLEN (2003). Durante a retirada do conteúdo ruminal, alíquotas de 10% da digesta foram separadas para permitir amostragem acurada. As alíquotas foram filtradas em peneira de náilon com 1,0 mm de porosidade para separação do conteúdo sólido do líquido para determinação do tamanho médio de partícula. As frações de amostras do conteúdo ruminal, e abomaso nas fases sólida e líquida, foram pré-secados e corrigidos para

matéria seca original, e acondicionadas em congelador à -20 °C, até a realização das análises (HAVERTINE e ALLEN, 2006c).

A determinação do volume líquido e da taxa de passagem de líquidos pelo rúmen foi realizada com a utilização do marcador polietilenoglicol (PEG) de peso molecular 4.000 (PEG 4.000). As 8 h do 18º dia foram introduzidas, através da cânula ruminal, 100 g de PEG (carbowax 4.000, marca Synth) previamente diluídos em 400 ml de água, misturando-se em seguida o indicador com conteúdo ruminal manualmente. Amostras de conteúdo para determinação das concentrações de PEG foram tomadas as zero horas antes da alimentação e as 0, 1, 2, 8, e 24 horas após a alimentação. A amostra referente ao tempo zero foi coletada antes da introdução do PEG, sendo a água e a refeição da manhã fornecidas imediatamente após a coleta da 1ª hora, ou seja, as 8 h. O líquido ruminal foi centrifugado por 10 minutos a 2000 x g e o sobrenadante armazenado sob refrigeração até a realização das análises. A determinação da concentração de PEG foi realizada segundo o método preconizado por HYDEN (1956). A taxa de passagem de líquido ou taxa eferente de fluxo, em porcentagem por hora, foi calculada por intermédio da regressão linear do logaritmo natural da concentração do PEG 4.000, em função do tempo.

### **3.8 Balanços de Energia e de Nitrogênio**

Para obtenção do consumo de energia bruta e realização do cálculo da eficiência do uso de energia consumida, as amostras de silagem e alimentos foram analisadas quanto ao seu teor de energia bruta em bomba calorimétrica, de acordo com HARVATINE e ALLEN (2006a). O consumo de energia digestível (CED) foi obtido por meio do coeficiente de digestibilidade das dietas experimentais e do consumo de energia bruta, de acordo com os valores de energia obtidos para os ingredientes e a silagem de milho (HARVATINE e ALLEN, 2006a).

O consumo de energia líquida (CEL), os valores de energia líquida de produção (EL<sub>P</sub>), energia líquida de ganho (EL<sub>G</sub>), e mudança de peso de corpo vazio (MPCV) foram calculados de acordo com as equações do NRC (2001), a seguir: CEL (Mcal/dia)

$= 0,703 \times \text{EM (consumo)} - 0,19 + \{[(0,097 \times \text{EM (consumo)} + 0,19)/97] \times [\text{EE} - 3]\}$ ;  $\text{EM (consumo)} = 1,01 \times (\text{ED (consumo)} - 0,45) + 0,0046 \times (\text{EE} - 3)$  onde: EM=energia metabolizável; EE= extrato etéreo; ED= energia digestível.

Os valores de energia metabolizável (EM) foram obtidos pela seguinte fórmula:  $\text{EM (Mcal/kg)} = [1,01 \times \{(\% \text{CNF}/100) \times 4,2 + (\% \text{FDN}/100) \times 4,2 + (\% \text{PB}/100) \times 5,6 + (\% \text{AG}/100) \times 9,4 - 0,3\} - 0,45] + 0,0046 \times (\text{EE} - 3,0)$ .

Para o cálculo de energia digestível (ED) dos suplementos de gordura com e sem glicerol foram utilizadas as seguintes fórmulas: Com glicerol  $\text{ED (Mcal/dia)} = [9,4 \times \text{DAG} \times 0,9 \times (\text{EE}/100)] + (4,3 \times 0,1 \times (\text{EE}/100))$ ; Sem glicerol  $\text{ED (Mcal/dia)} = 9,4 \times \text{DAG} \times (\text{EE}/100)$ , onde: DAG = digestibilidade dos ácidos graxos.

Os valores de energia líquida de produção ( $\text{EL}_p$ ) foram calculados segundo a fórmula:  $\text{EL}_p \text{ (Mcal/dia)} = \text{produção de leite (kg)} \times (0,0929 \times \text{G}\% + 0,0563 \times \text{pv}\% + 0,0395 \times \text{lactose}\%)$  onde: G%=teor de gordura no leite; pv=teor de proteína verdadeira do leite.

A mudança de peso de corpo vazio (MPCV) foi calculada a partir do peso corporal (PC) onde:  $\text{PCV} = 0,817 \times \text{PV}$ . A energia líquida de ganho foi calculada através da fórmula:  $\text{EL}_g = 1,42 \text{ EM} - 0,174 \times \text{EM} + 0,0122 \times \text{EM} \times 1,65$ .

A eficiência de utilização de energia foi calculada de acordo com HARVATINE e ALLEN (2006a) da seguinte forma:  $\text{Eficiência da produção de leite} = \text{EL manutenção} = \text{EL (consumo)} - \text{EL (ganho PV)} - \text{EL (leite)}$ ;  $\text{Eficiência lactação} = \text{EL produção de leite} + \text{EL ganho de PV} / \text{Consumo de ED}$ .

Para o cálculo de balanço de nitrogênio foi realizada a determinação da concentração de creatinina na urina de acordo com metodologia descrita por VALADARES FILHO et al. (1999) e RENNÓ (2003).

As amostras *spot* de urina foram obtidas de todas as vacas no 16º dia de cada período experimental, quatro horas após a alimentação matinal, durante micção estimulada por massagem na vulva. A urina foi filtrada e alíquotas foram armazenadas a  $-15^\circ\text{C}$  para posteriores análises de nitrogênio total e creatinina.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Laborlab®), utilizando reação enzimática calorimétrica cinética em aparelho SBA-200



CELM. Para a realização dessa análise, 100 µL de urina foram diluídos em 4900 µL de água deionizada. Os resultados obtidos foram calculados pela seguinte fórmula: Creatinina (mg/dL)= creatinina (mg/dl)\*0,020\*50 (BIGGS e COPPER, 1961).

O volume urinário diário total foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina das amostras *spot*, segundo OLIVEIRA et al. (2001). A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da proposição de 24,05 mg/kg de peso vivo (PV) (CHIZZOTTI, 2004).

Dessa forma, com a excreção média diária de creatinina e a concentração de creatinina (mg/dL) na amostra *spot* de urina, foi estimado o volume total diário de urina, em litros por vaca/dia, para o cálculo do balanço de nitrogênio.

O consumo de nitrogênio foi determinado por meio do consumo de proteína bruta retirando-se o valor de conversão de nitrogênio 6,25, obtendo-se a quantidade em gramas de nitrogênio consumida. O mesmo cálculo foi realizado com os valores de proteína bruta das fezes obtendo-se a excreção total de nitrogênio em g/kg MS.

O nitrogênio total das amostras de urina e leite foram determinados de acordo com as metodologias descritas por SILVA e QUEIROZ (2002), onde a quantidade em gramas de nitrogênio para cada 100 ml de urina ou leite foi obtido dividindo-se o valor de proteína bruta das amostras pelo fator 6,25 para as amostras de urina e do fator 6,38 para as amostras de leite.

O balanço de nitrogênio foi obtido subtraindo do total de nitrogênio em gramas consumido os valores de nitrogênio na urina, fezes e leite, obtendo-se os valores de nitrogênio retido em gramas e em porcentagem do nitrogênio total.

### **3.9.1 Biohidrogenação Ruminal e Fluxo Abomasal de Ácidos Graxos**

Amostras da digesta no abomaso (1000 g), e líquido ruminal (100 mL) foram coletadas com intervalo de 9 h do 12º a 14º dia de cada período experimental perfazendo um total de 8 amostras por vaca por período, representando um intervalo de 3 horas em um período de 24 horas para retirar a variação diurna.

A fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) foi usada como indicador para a fase sólida para o cálculo do fluxo abomasal. A fibra em detergente neutro potencialmente digestível (FDNpd) foi calculada pela diferença ( $1,0 - \text{FDNi}$ ). O conteúdo ruminal foi evacuado manualmente através da cânula ruminal as 12 h 30 (4.5 horas após a alimentação) no 20º do período experimental e as 5 h 30 (2.5 horas antes da alimentação) no 21º do período experimental) (HAVERTINE e ALLEN, 2006a). O conteúdo total do rúmen foi mensurado quanto ao volume e o peso. Durante o esvaziamento uma alíquota de 10% do total evacuado foi retirada de forma representar uma amostra do esvaziamento. As amostras foram pesadas e encaminhadas para separação das fases sólida e líquida em uma malha de 1 mm sendo as subamostras novamente pesadas e re combinadas de acordo com a razão original da MS. Cerca de 500g das fases sólida e líquida foram retiradas e armazenadas a -20 °C para posterior análises.

As amostras de silagem e sobras foram moídas em moinho (MARCONI ®) com nitrogênio líquido a -192,0° C em peneira de crivo de 5 mm, e as subamostras em forma de cristal de gelo encaminhadas para serem liofilizadas (MARCONI ®) para análise da concentração de matéria seca (MS). As amostras de silagem, sobras, foram novamente moídas em moinho com peneira de crivo de 1 mm. O suplemento de gordura sais de cálcio de ácidos graxos (MEGALAC-E) foi moído também com utilização de nitrogênio líquido em peneira de crivo de 1 mm para evitar aquecimento e oxidação dos ácidos graxos. Os demais ingredientes farelo de soja, grão de soja e milho foram moídos em moinho com peneira de crivo de 1 mm.

As amostras das fases sólida e líquida do rúmen foram liofilizadas e moídas em moinho com peneira de crivo de 1 mm e re combinadas de acordo com a razão original da MS. As amostras do abomaso foram combinadas para formação do “pool” formado a partir das 8 amostras/vaca/período. O pool foi filtrado em peneira de náilon de 1 mm para separação das fases sólida e líquida e para minimizar erros de amostragem devido a segregação de amostras das fases sólida e líquida. Ambas as fases foram pesadas e as subamostras foram colhidas para cada fase. As subamostras das fases líquida e sólida, foram liofilizadas e moídas em peneira de 1 mm e re combinadas pela razão

original da MS. As amostras foram armazenadas em sacos plásticos com nitrogênio gasoso para análise de ácidos graxos.

A concentração de todos os nutrientes foi expressa em porcentagem da MS após serem secas em estufa de 105°C. A fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) foi determinada após incubação no rúmen de animais Nelores por 288 horas adaptados com dieta de relação volumoso:concentrado 50:50 utilizando-se a silagem de milho como volumoso (HAVERTINE e ALLEN 2006b) na proporção de 25 mg/cm<sup>2</sup> em sacos de tecido TNT com malha de 50 µ (NOCEK, 1988). O pool ruminal (kg) de nutrientes foi determinado multiplicando a concentração de cada componente da digesta ruminal pela massa ruminal de MS em kg.

As taxas de biohidrogenação foram calculadas por meio de dois modelos presentes na literatura: (1) O modelo A leva em consideração a taxa de passagem do rúmen calculada de acordo com o modelo de transferência de ácidos graxos (OBA e ALLEN, 2003). Este modelo assume que os ácidos graxos insaturados (AGI) não são oxidados, mas são hidrogenados e aparecem em menor quantidade de AG saturados no pool ruminal, e que o tamanho do pool é representativo em condições estáticas do rúmen e que a biohidrogenação ocorre pela cinética de primeira ordem. A taxa de turnover (%/h), taxa de passagem fracional (kp), e a taxa de biohidrogenação (Kb) para cada ácido graxo inicial (AG) (AGi) foram calculadas usando as equações abaixo:

1 - Taxa de renovação no rúmen (%/h) = [fluxo de AGi no pool a partir do consumo e da biohidrogenação (g/h)] / [pool AGi ruminal] \* 100

2- Taxa de passagem fracional no rúmen (%/h) = fluxo de AGi no duodeno (g/h)/ pool de AGi ruminal (g) \* 100

3- Taxa de desaparecimento fracional no rúmen (%/h) = [taxa de renovação AGi ruminal (g/h)/ pool de AGi no rúmen (g)] \* 100

4 – Taxa de biohidrogenação no rúmen (%/h) = taxa de desaparecimento fracional de AGi no rumen (%/h)- taxa de passagem fracional de AGi no rúmen

5 – Extensão da biohidrogenação (% biohidrogenado) = taxa de biohidrogenação de AGi fracional (%/h) / [taxa de biohidrogenação de AGi fracional (%/h) + taxa de passagem AGi fracional (%/h)]

6- Extensão da biohidrogenação ruminal (% biohidrogenado) = taxa de biohidrogenação AGi (%/h)/[taxa de biohidrogenação fracional AGi (%/h) + AGi taxa de passagem (%/h)].

A equação para extensão da biohidrogenação ruminal é análoga à usada para o cálculo de extensão da digestão de carboidratos e frações de proteína (FIRKINS et al. 1998).

O modelo B (Jenkins e Doreau, 2007) leva em consideração somente o desaparecimento dos ácidos graxos consumidos e que aparecem no fluxo abomasal calculado de acordo com a seguinte fórmula: Biohidrogenação de ácidos graxos poliinsaturados (BAGPI) =  $100 * (AGPI_{\text{inicial}} - AGPI_{\text{final}}) / AGPI_{\text{inicial}}$  sendo: Ácidos graxos poliinsaturados no início do processo ( $AGPI_{\text{inicial}}$ ) = Consumo de AGPI (g) no início da incubação; e Ácidos graxos poliinsaturados no final do processo  $AGPI_{\text{final}}$  = fluxo duodenal ou abomasal de AGPI (g).

### 3.9.2 Perfil de ácidos graxos

As amostras de leite utilizadas para avaliar o perfil de ácidos graxos foram obtidas no 16º dia de cada período experimental, cada uma das amostras proveniente de duas ordenhas diárias. Para o processo de extração, as amostras foram centrifugadas a 17.800 x g por 30 minutos a 4 °C e próximo a 19.300 x g por 20 minutos a 4 °C, de acordo com FENG, (2004). A gordura separada (300-400 mg) foi metilada e os ésteres metílicos foram formados de acordo com KRAMER, e DUGAN (1997). Dois padrões internos C18:0 e C19:0 foram utilizados para corrigir as perdas durante o processo de metilação.

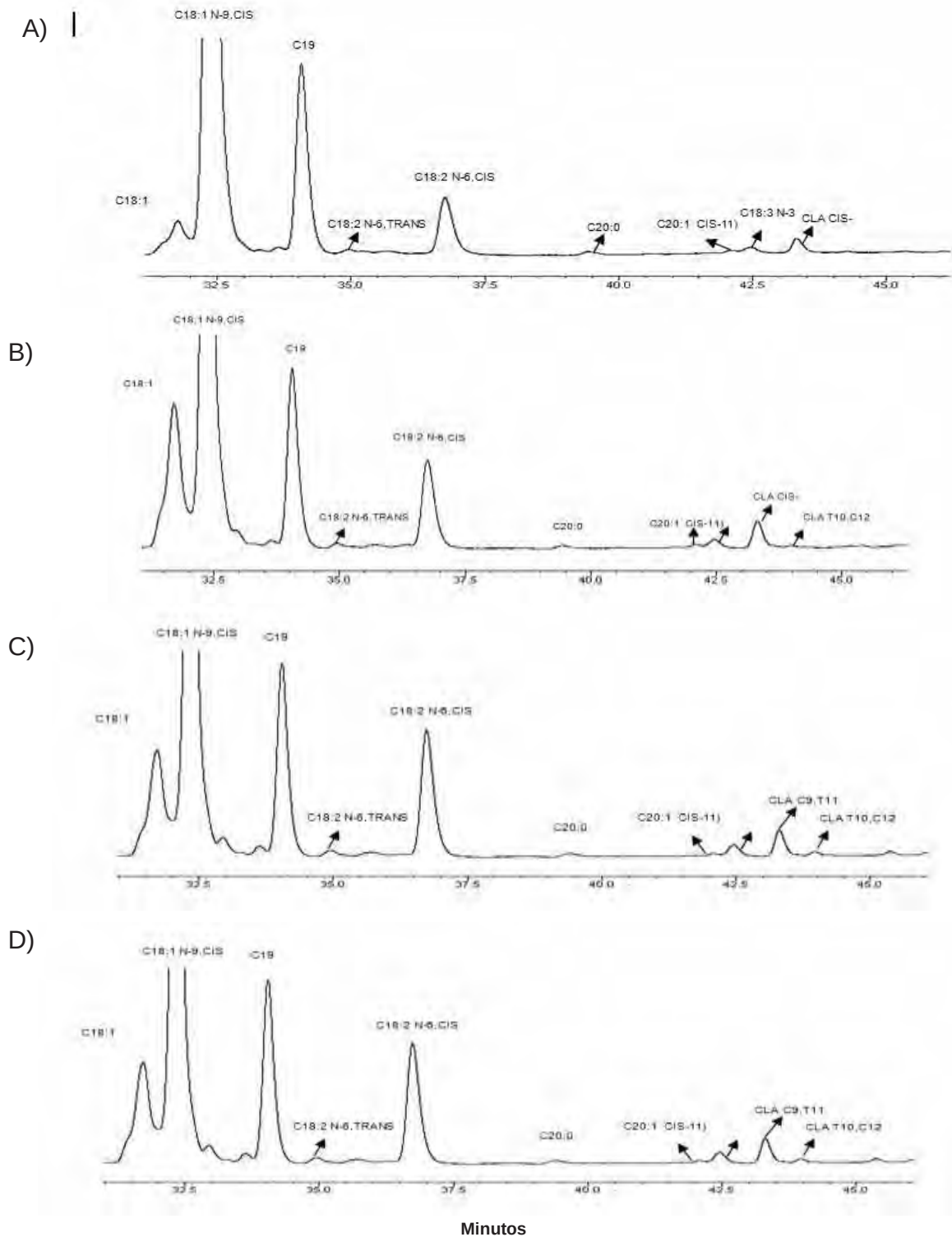


Figura 3 - Cromatogramas das análises referentes as amostras de leite ilustrando a separação do ácido vacênico, ácido linoleico conjugado (CLA) C18:2 cis-9, trans-11, e CLA C18:2 trans-10, cis-12, para as vacas submetidas as dietas controle (A) óleo de soja (B), grão de soja, (C) e sais de cálcio de ácidos graxos (D).

Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (GC Shimatzu modelo 20-10, com injeção automática), usando coluna capilar SP-2560 (100 m × 0,25 mm de diâmetro com 0,02 mm de espessura, Supelco, Bellefonte, PA). A temperatura inicial foi de 70 °C por 4 minutos (13° C/minuto) até chegar a 175 °C, mantendo por 27 minutos. Depois, um novo aumento de 4 °C/minuto, foi iniciado até 215 °C, mantendo durante 31 minutos. Hidrogênio (H<sub>2</sub>) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 40 cm/s. Durante o processo de identificação foram utilizados quatro padrões: standard C4-C24 de ácidos graxos (Supelco ® TM 37), ácido vacênico C18:1 trans-11 (V038-1G, Sigma®), C18 CLA:2 trans-10, cis-12 (UC-61M 100mg), CLA e C18:2 cis-9, trans-11 (UC-60M 100mg), (NU-CHEK-PREP EUA ®) para identificação dos ácidos graxos que são formados durante a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados (Figura 3).

### **3.9.3 Avaliação do Escore de Condição Corporal e Peso Corporal**

O escore de condição corporal (ECC) e o peso corporal foram avaliados no sétimo dia de adaptação e no final de cada período experimental, para avaliação da variação de peso.

O peso dos animais foi correspondente à média de duas pesagens sucessivas, feitas antes do fornecimento das alimentações e após as ordenhas durante dois dias. Para o cálculo da variação de ECC e de peso corporal, foram considerados os pesos do sétimo dia de adaptação e do final de cada período experimental. As mensurações do ECC foram realizadas segundo metodologia proposta por WILDMAN et al. (1982) e desenvolvida por EDMONSON et al. (1989).

### **3.9.4 Metabólitos Sanguíneos**

As coletas de sangue foram realizadas no 14 ° dia do período experimental por punção da veia e/ou artéria coccígea, anteriormente ao fornecimento das rações no período da manhã. As amostras foram coletadas em tubos vacuolizados (vacutainer) de 10 ml para dosagem dos parâmetros sanguíneos glicose (GL), β-hidroxibutirato (BHA),

colesterol total (CT), colesterol de alta densidade (C-HDL) (CHDL), proteínas totais (PT), albumina, uréia e nitrogênio uréico no soro (NUS), e as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT).

Imediatamente após coleta as amostras foram refrigeradas e centrifugadas a 2000 x g durante 15 minutos, para a separação do soro. O centrifugado obtido foi transferido para tubetes plásticos, identificados e armazenados a -20 °C, até o procedimento das análises laboratoriais. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do VNP-FMVZ-USP.

As análises das concentrações dos parâmetros sanguíneos glicose,  $\beta$ -hidroxibutirato, CT, C-HDL, PT, albumina, uréia, NUS, AST, e GGT, foram realizadas por meio de kits comerciais (Laborlab®, CELM®, Randox®) que utilizam método enzimático colorimétrico de ponto final, ou cinético. A leitura foi realizada em analisador automático de bioquímica sanguínea (Sistema de Bioquímica Automático SBA-200 - CELM®).

A concentração de C-HDL foi determinada em duas etapas, sendo a primeira envolvendo preparação previa das amostras, e a segunda a análise propriamente dita. Para a realização da análise da concentração de C-HDL, 200 $\mu$ L da amostra foram pipetados em tubos Ependorff de 2,5 mL, juntamente com 100 $\mu$ L do reativo único precipitante (CELM®-1763) na proporção de 2:1 e misturados manualmente por inversão suave durante 20 segundos. Em seguida as amostras foram deixadas em repouso por 10 minutos. Posteriormente, as amostras preparadas foram centrifugadas durante 15 minutos a 2700 x g. Nos volumes centrifugados (sobrenadante) restaram as moléculas de CHDL ligadas ao colesterol sendo estas analisadas por Sistema Bioquímico Automático (SBA-200).

### 3.9.5 Análises Estatísticas

Os dados foram analisados usando o procedimento PROC MIXED (Versão 9.2, SAS Institute, Cary, NC 2010) de acordo com o modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = \mu + A_j + P_y + T_k + e_{ijk}$$

Onde:  $Y_{ijk}$  = variável dependente,  $\mu$  = média geral, ( $i = 1$  a 8),  $A_j$  = efeito animal ( $i = 1$  a 8),  $P_y$  = efeito fixo de período ( $j = 1$  a 4),  $T_k$  = efeito fixo de tratamento ( $k = 1$  a 4),  $A_j \times P_y = e$  e  $e_{ijk}$  = erro.

Para avaliação dos efeitos de tratamentos foram considerados os contrastes ortogonais: C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos insaturados). O objetivo foi comparar a dieta controle com as fontes de gordura independente da fonte de ácidos graxos; C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; esse contraste foi montado para comparar uma fonte de ácidos graxos não complexados (óleo de soja) com as duas formas de ácidos graxos complexados; C3= grão de soja versus sais de cálcio. O objetivo do contraste três foi comparar as duas formas de proteção dos ácidos graxos insaturados.

Foi utilizado o efeito aleatório animal dentro de dietas. O método de Kenward-Rogers foi usado para calcular os graus de liberdade do denominador do teste F. De acordo com WOLFINGER (1993) um dos procedimentos para seleção da estrutura de covariância usada foi o critério de informação de Akaike, nos quais os altos valores sugerem a melhor estrutura. Para as análises ao longo do tempo como as concentrações dos parâmetros de fermentação ruminal, todas as dietas foram confrontadas dentro de cada tempo através da opção PDIF (Perceptual Diff) com as médias obtidas por meio do LSMEANS (Least Squares Means). Todos os dados obtidos foram submetidos à análise de variância adotando-se o nível de significância de 5%.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes

Os resultados referentes ao consumo diário de nutrientes, de acordo com as dietas podem ser observados na Tabela 5. Não houve diferença para os consumos de matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, carboidratos totais e carboidratos não fibrosos entre as dietas ( $P>0,05$ ). No entanto, os animais submetidos às dietas com fontes adicionais de gordura apresentaram maior consumo de extrato etéreo ( $P<0,05$ ). Esse resultado ocorreu de forma coerente já que os teores de extrato etéreo nas dietas com fontes de gordura são maiores em relação à dieta controle (Tabela 3). Além disso como o resultado de consumo consiste basicamente em uma combinação da concentração do nutriente da dieta pela quantidade de matéria seca consumida esse resultado também pode ser atribuído a ausência de diferença no consumo de matéria seca entre as dietas experimentais.

As vacas alimentadas com a dieta contendo grão de soja apresentaram maior consumo de fibra em detergente neutro quando comparada aos animais submetidos à dieta com sais de cálcio de ácidos graxos ( $P<0,05$ ). Esse resultado também pode ser justificado devido à maior concentração deste nutriente na dieta com grão de soja (Tabela 3). De forma semelhante não houve diferença para o consumo de matéria seca e fibra em detergente neutro em porcentagem do peso vivo ( $P>0,05$ ). De acordo com MERTENS et al., (2002) o consumo de FDN em porcentagem do peso corporal para animais confinados se apresenta em torno 1,2% do peso vivo. As dietas utilizadas neste estudo apresentaram menores concentrações de FDN, pois a relação volumoso concentrado foi de 50:50 reduzindo assim a quantidade de volumoso fornecida e simultaneamente a quantidade de FDN da dieta.

Como se trata de um produto não padronizado o grão de soja utilizado neste estudo apresentou concentração adequada de extrato etéreo (Tabela 1) e fibra quando comparada com a relatada na literatura (VALADARES FILHO et al., 2006). Em muitos

casos a composição bromatológica pode estar relacionada à variedade de soja utilizada, bem como o período de armazenamento da semente desta oleaginosa.

Tabela 5 – Efeitos das dietas sobre o consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes

| Item                                      | Dietas experimentais <sup>1</sup> |       |       |       | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |       |       |
|-------------------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|------------------|------------|-------|-------|
|                                           | C                                 | OS    | GS    | SCAG  |                  | C1         | C2    | C3    |
| Consumo kg/dia                            |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Matéria seca                              | 17,78                             | 18,47 | 18,08 | 18,56 | 0,48             | 0,358      | 0,825 | 0,537 |
| Matéria orgânica                          | 16,21                             | 16,85 | 16,57 | 16,93 | 0,44             | 0,324      | 0,871 | 0,614 |
| Proteína bruta                            | 2,85                              | 2,94  | 2,80  | 3,01  | 0,08             | 0,518      | 0,777 | 0,139 |
| Extrato etéreo                            | 0,44                              | 0,90  | 0,95  | 0,93  | 0,04             | <0,001     | 0,363 | 0,625 |
| Carboidratos totais                       | 11,12                             | 13,05 | 12,82 | 12,98 | 0,50             | 0,095      | 0,892 | 0,897 |
| Fibra em detergente neutro                | 4,78                              | 4,99  | 5,25  | 4,65  | 0,16             | 0,423      | 0,868 | 0,040 |
| Carboidratos não fibrosos                 | 9,31                              | 9,26  | 8,80  | 9,32  | 0,25             | 0,568      | 0,543 | 0,189 |
| Nutrientes digestíveis totais             | 12,70                             | 13,15 | 12,88 | 13,28 | 0,34             | 0,370      | 0,882 | 0,452 |
| Digestibilidade Aparente no trato total % |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Matéria seca                              | 69,08                             | 73,14 | 71,34 | 74,78 | 0,84             | 0,123      | 0,628 | 0,574 |
| Matéria orgânica                          | 70,88                             | 73,84 | 72,81 | 74,35 | 0,85             | 0,200      | 0,908 | 0,556 |
| Proteína bruta                            | 72,12                             | 76,31 | 74,91 | 77,83 | 1,02             | 0,334      | 0,979 | 0,302 |
| Extrato etéreo                            | 78,95                             | 90,27 | 90,78 | 90,82 | 1,24             | <0,001     | 0,828 | 0,988 |
| Carboidratos totais                       | 69,80                             | 72,71 | 70,94 | 72,27 | 0,91             | 0,328      | 0,637 | 0,621 |
| Fibra em detergente neutro                | 48,37                             | 54,36 | 53,12 | 51,83 | 1,55             | 0,092      | 0,512 | 0,697 |
| Carboidrato não fibroso                   | 77,70                             | 78,71 | 77,26 | 79,32 | 1,00             | 0,774      | 0,874 | 0,507 |
| NDT <sub>OBS</sub> <sup>3</sup>           | 66,74                             | 72,83 | 72,19 | 73,01 | 1,07             | 0,036      | 0,936 | 0,802 |
| Digestibilidade Aparente total kg/dia     |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Matéria seca                              | 12,28                             | 13,51 | 12,90 | 13,88 | 0,65             | 0,190      | 0,296 | 0,828 |
| Matéria orgânica                          | 11,49                             | 12,44 | 12,06 | 12,59 | 0,59             | 0,197      | 0,331 | 0,881 |
| Proteína bruta                            | 2,06                              | 2,24  | 2,10  | 2,34  | 0,06             | 0,314      | 0,203 | 0,807 |
| Extrato etéreo                            | 0,35                              | 0,82  | 0,86  | 0,85  | 0,05             | <0,001     | 0,535 | 0,759 |
| Carboidratos totais                       | 7,76                              | 9,49  | 9,09  | 9,38  | 0,72             | 0,171      | 0,983 | 0,915 |
| Fibra em detergente neutro                | 2,31                              | 2,71  | 2,79  | 2,41  | 0,19             | 0,059      | 0,614 | 0,314 |
| Carboidrato não fibroso                   | 7,23                              | 7,29  | 6,80  | 7,39  | 0,39             | 0,636      | 0,263 | 0,981 |
| Consumo em % PC <sup>4</sup>              |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Fibra em detergente neutro                | 0,83                              | 0,86  | 0,93  | 0,88  | 0,03             | 0,140      | 0,351 | 0,295 |
| Matéria seca                              | 3,09                              | 3,20  | 3,20  | 3,38  | 0,09             | 0,210      | 0,523 | 0,346 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®). C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio. <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>nutrientes digestíveis totais observados; <sup>4</sup> peso corporal.

Diferentemente os resultados deste estudo a utilização de sais de cálcio de ácidos graxos de acordo com ALLEN, (2000) em compilação de dados de vários experimentos,

reduziu o consumo de matéria seca em relação a outras fontes de gordura, como óleos, sementes de oleaginosas e gordura animal (MOALLEM et al. 2007). Segundo o NRC (2001), de uma forma geral, a adição de sais de cálcio de ácidos graxos nas dietas de vacas leiteiras resulta em diminuição linear no consumo de matéria seca.

Entretanto, quando se avalia respostas de consumo com a suplementação com diferentes fontes de gordura, alguns estudos não observaram redução do consumo e, em alguns casos, foram observados até o aumento do consumo de matéria seca, sendo esses resultados atribuídos ao baixo incremento calórico da gordura em períodos de estresse calórico, ou pela redução na produção de propionato quando a fonte de gordura substituiu grãos nas rações (NRC, 2001).

Estas diferenças observadas na literatura quando foram avaliadas diferentes fontes de gordura nas dietas de vacas leiteiras, podem ser atribuídas ao tipo e nível de inclusão do suplemento de gordura na ração. Para as dietas contendo de 5 a 6% de extrato etéreo na matéria seca, segundo o NRC (2001), a adição de óleo de sementes e ácidos graxos parcialmente hidrogenados reduz o consumo. A adição de sebo, gordura amarela e sais de cálcio de ácidos graxos também resultam em efeito negativo com diminuição linear desta variável. Ainda, variações no consumo, seguida de diminuição no teor de gordura do leite e redução da digestão ruminal de fibra, são indicadores de que houve alteração da fermentação ruminal e do consumo com a adição da gordura na ração.

O consumo de nutrientes digestíveis totais foi semelhante ( $P>0,05$ ) entre as dietas controle e as que utilizaram fontes de gordura. Embora existam estudos sobre o uso de gordura na dieta de vacas em lactação, os mecanismos pelo qual esta suplementação influencia o consumo ainda não estão devidamente elucidados, mas há fortes evidências de que o efeito da gordura sobre a fermentação ruminal, motilidade intestinal, aceitabilidade da dieta com suplemento, liberação de hormônios intestinais, mecanismos regulatórios que controlam a ingestão de alimentos e a capacidade limitada dos ruminantes de oxidar os ácidos graxos sejam as principais razões da inibição de consumo (ALLEN, 2000). Neste estudo, um dos principais fatores estudados

dentre os citados foi os mecanismos regulatórios que controlam a ingestão de alimentos, como a dinâmica ruminal e a taxa de passagem e digestão.

Os resultados de digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes podem ser observados na Tabela 5. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) na digestibilidade aparente total da matéria seca, proteína bruta, carboidratos totais, fibra em detergente neutro ( $P>0,05$ ). Entretanto, os valores de nutrientes digestíveis totais observados para as dietas com fontes adicionais de gordura foram maiores quando comparados com a dieta controle (Tabela 3;  $P<0,05$ ).

Os resultados desse estudo contrariam a hipótese de que fontes de gordura com ácidos graxos livres altamente insaturadas como óleos vegetais e sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, reduzem a digestibilidade de nutrientes. Os resultados deste estudo mostram comportamento contrario à esta hipótese pois, apesar de não ter ocorrido diferença para digestibilidade da FDN, houve tendência ( $P<0,09$ ) para o aumento da sua digestibilidade para os animais que consumiram as dietas com fontes de gordura em relação aos animais que consumiram a dieta controle (48,37; 54,36, 53,12 e 51,83, para as dietas C, OS, GS e SC respectivamente).

Quando se avalia estes resultados corrigidos para quilos por dia o valor se torna mais importante ainda demonstrando que realmente as fontes de gordura tem impacto indireto sobre a digestibilidade da fibra em relação à dieta controle. De acordo com JENKINS (1993), nos primeiros estudos com utilização de gordura, foram levantadas hipóteses das primeiras teorias sobre o efeito dos lipídeos em dietas de ruminantes no que diz respeito à redução da digestibilidade da fibra. A primeira delas envolve a formação de um filme que recobre a partícula de alimento, impedindo a adesão microbiana ou por efeito tóxico direto sobre as bactérias celulolíticas. No entanto, ainda hoje os nutricionistas têm observado redução na digestibilidade da fibra quando fontes lipídicas são adicionadas às rações, e a magnitude de redução está relacionada não só à quantidade, mas principalmente ao tipo de ácido graxo presente no suplemento, sendo que lipídios ricos em ácidos graxos insaturados tendem a provocar maior depressão na digestibilidade (DOREAU e CHILLIARD, 1997; LEITE, 2006). COSTA, (2007) avaliou a inclusão de óleo soja (2,6 % MS), sais de cálcio de ácidos graxos (2,7

% MS) e grão de soja tratado com formaldeído (11,7% MS) nas dietas de vacas leiteiras, e observou que o óleo de soja apresentou os menores valores de digestibilidade para a FDN.

#### 4.2 Fermentação ruminal

Os resultados referentes à fermentação ruminal são apresentados na Tabela 6. Os animais alimentados com a dieta contendo óleo de soja apresentaram maior valor de pH ruminal em relação aos animais submetidos às dietas contendo grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos ( $P < 0,05$ ). Não houve diferença para os valores de pH ruminal entre a dieta controle e as com fontes de gordura, e entre a dieta contendo grão de soja e a dieta com sais de cálcio de ácidos graxos ( $P > 0,05$ ). Esse resultado ocorreu devido à fonte de ácido graxo utilizada neste estudo. Quando são fornecidas fontes de gordura com ácidos graxos livres no rúmen como o óleo de soja, existem altas concentrações de C18:2 e assim o processo de biohidrogenação ruminal é otimizado promovendo dessa forma maior eficiência de aproveitamento de hidrogênio livre ( $H^+$ ) no rúmen para hidrogenação de ácidos graxos resultando em maiores valores de pH ruminal (JENKINS, 2007; CHILLIARD et al., 2007).

Houve efeito dos horários de coleta após alimentação, sobre os valores de pH ruminal (Figura 4;  $P < 0,001$ ). Esse comportamento já é esperado visto que quando ocorre o aumento do consumo de alimentos após o tempo zero de coleta, ocorre simultaneamente o aumento da fermentação ruminal pela maior disponibilidade de substrato usado para a fermentação ruminal, causando dessa forma redução dos valores de pH devido a maior concentração de hidrogênio oriundo do metabolismo (Tabela 6;  $P < 0,001$ ).

As dietas contendo fontes de gordura promoveram menores concentrações de nitrogênio amoniacal ( $N-NH_3$ ) em relação à dieta controle (Tabela 6;  $P < 0,05$ ). Na literatura têm sido relatados potenciais efeitos inibidores sobre a fermentação ruminal relacionado à produção de amônia quando são utilizadas fontes de ácidos graxos em dietas de ruminantes. A inibição no acúmulo de amônia pelas fontes de gordura, esta

relacionada ao efeito depressor dos lipídios insaturados sobre a população de bactérias gram positivas fermentadoras obrigatórias de aminoácidos, para suprir suas necessidades energéticas e protéicas (CHEN e RUSSELL, 1989). Esse resultado pode ser observado de forma nítida para as concentrações de N-NH<sub>3</sub> neste estudo, de forma que a dieta controle promoveu uma concentração de N-NH<sub>3</sub> cerca de 17,55% maior em relação a média das três dietas contendo fontes de gordura (43,17; 36,47; 36,96; e 33,35 mg/dl, para as dietas C, OS, GS e SCAG respectivamente). Alguns autores também verificaram resultados semelhantes aos obtidos neste estudo com a utilização do óleo de soja como fonte lipídica (VARGAS et al., 2002; CHRISTENSEN et al., 1994; HAVERTINE e ALLEN, 2006b).

Houve efeito dos horários de coleta após alimentação sobre as concentrações de N-NH<sub>3</sub> (Figura 5; P<0,05). O aumento das concentrações de N-NH<sub>3</sub> à medida que se aumenta as horas após alimentação principalmente do tempo 2 h comparada com o tempo 10 h se deu pelo consumo de proteína bruta em relação ao tempo zero e consequentemente pela maior disponibilidade de nitrogênio advindo da dieta.

Tabela 6 – Efeito das dietas sobre os parâmetros de fermentação ruminal

| Item                    | Dietas experimentais <sup>1</sup> |        |        |        | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |        |        |        |       |       |
|-------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|------------------|------------|--------|--------|--------|-------|-------|
|                         | C                                 | OS     | GS     | SCAG   |                  | Trat       | Tempo  | Inter* | C1     | C2    | C3    |
| pH                      | 5,76                              | 5,87   | 5,78   | 5,76   | 0,03             | 0,043      | 0,003  | 0,996  | 0,224  | 0,010 | 0,698 |
| N-NH <sub>3</sub> mg/dl | 43,17                             | 36,47  | 36,96  | 33,35  | 1,06             | <0,001     | <0,001 | 0,968  | <0,001 | 0,531 | 0,138 |
| mMol                    |                                   |        |        |        |                  |            |        |        |        |       |       |
| Total AGCC <sup>3</sup> | 124,32                            | 119,44 | 123,33 | 125,98 | 1,54             | 0,475      | <0,001 | 0,931  | 0,305  | 0,261 | 0,669 |
| Acetato                 | 78,96                             | 76,17  | 78,73  | 78,80  | 0,92             | 0,469      | <0,001 | 0,987  | 0,525  | 0,145 | 0,971 |
| Propionato              | 28,45                             | 28,49  | 29,25  | 27,90  | 0,48             | 0,537      | <0,001 | 0,708  | 0,896  | 0,919 | 0,143 |
| Butirato                | 16,89                             | 14,76  | 15,35  | 15,22  | 0,27             | 0,011      | <0,001 | 0,998  | 0,001  | 0,368 | 0,825 |
| Total AGCC, %           |                                   |        |        |        |                  |            |        |        |        |       |       |
| Acetato                 | 63,78                             | 64,14  | 63,91  | 64,82  | 0,18             | 0,005      | <0,001 | 0,630  | 0,049  | 0,413 | 0,043 |
| Propionato              | 22,57                             | 23,63  | 23,68  | 22,74  | 0,19             | <0,001     | <0,001 | 0,993  | 0,019  | 0,223 | 0,020 |
| Butirato                | 13,63                             | 12,22  | 12,40  | 12,42  | 0,14             | <0,001     | <0,001 | 1,000  | <0,001 | 0,542 | 0,946 |
| C2:C3                   | 2,87                              | 2,78   | 2,75   | 2,88   | 0,02             | 0,046      | <0,001 | 0,964  | 0,153  | 0,529 | 0,018 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®). C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio. <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>ácidos graxos de cadeia curta.

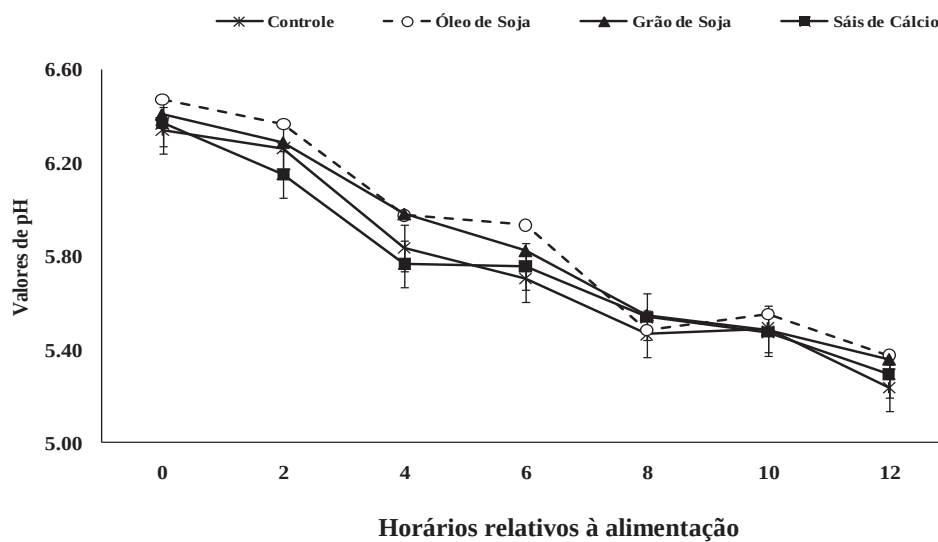


Figura 4- Valores de pH a partir da alimentação de acordo com as dietas experimentais.

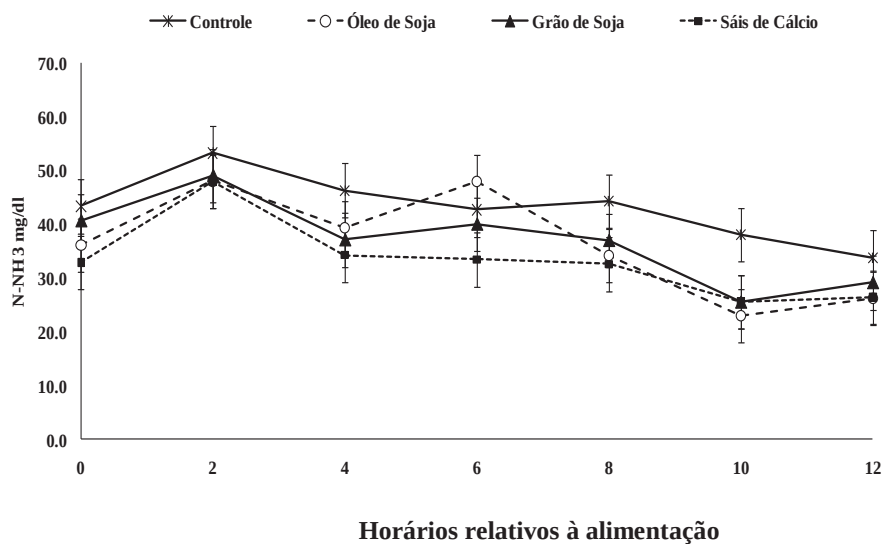


Figura 5- Concentrações de nitrogênio amoniacal (N-NH<sub>3</sub>) a partir da alimentação de acordo com as dietas experimentais.

Não houve efeito ( $P>0,05$ ) das fontes de gordura nas dietas sobre as concentrações dos ácidos graxos de cadeia curta totais, acetato, propionato, em proporção molar (Tabela 6;  $P>0,05$ ). Porém houve efeito de tempo para esses parâmetros avaliados ( $P<0,001$ ). Quando se analisa o contraste 1, os animais submetidos às dietas contendo fontes de gordura apresentaram maiores concentrações de acetato e propionato quando comparado aos animais submetidos à dieta controle ( $P<0,05$ ; Tabela 6). Entretanto, houve redução para as concentrações do ácido butírico para as vacas alimentadas com fontes de gordura em relação aos animais alimentados com a dieta controle. Quando se analisa o contraste 3, houve aumento das concentrações de acetato em porcentagem do total de ácidos graxos de cadeia curta para as vacas alimentadas com a dieta contendo sais de cálcio de ácidos graxos, em relação à dieta com grão de soja. Entretanto, as concentrações de ácido propiônico foram reduzidas para as vacas alimentadas com a dieta com sais de cálcio de ácidos graxos em relação à dieta com grão de soja. Como consequência e de forma coerente, houve aumento da relação acetato:propionato ( $C2/C3$ ) para os animais submetidos a dieta com sais de cálcio de ácidos graxos em relação a dieta com grão de soja.

De acordo com FUENTES et al., (2009) o efeito de mudanças da fermentação ruminal como resposta da suplementação de gordura em dietas de vacas leiteiras pode ser explicada por alteração na digestibilidade da matéria orgânica e consequentemente por mudanças nos valores de pH ruminal. HAVERTINE e ALLEN, (2006b) avaliaram a suplementação de fontes de gordura saturada, insaturada e a mistura das duas fontes em dietas de vacas leiteiras canuladas no rumen e duodeno proximal. Esses autores verificaram resultados diferentes dos observados neste estudo, de forma que a inclusão das fontes de gordura causou redução da produção de ácidos graxos de cadeia curta e de acetato independente do grau de saturação. Esse resultado foi atribuído a redução na digestibilidade da fibra e pelas mudanças na população de bactérias fibrolíticas mais sensíveis a quedas de pH abaixo de 5,6 (FUENTES et al., 2009). De forma coerente neste estudo houve tendência para o aumento na digestibilidade da FDN (Tabela 5) o que foi acompanhada pelo aumento das concentrações de acetato (Tabela 6).



Quando se analisaram em conjunto os dados de digestibilidade aparente total dos nutrientes e fermentação ruminal obtidos neste estudo, verifica-se que sempre que for avaliado o efeito das fontes de gordura na alimentação de vacas leiteiras devem ser caracterizadas adequadamente as condições de fornecimento, sob forma de interpretação equivocadas em determinadas situações. Assim, dependendo da fonte de gordura utilizada e das condições de fornecimento, os resultados obtidos em avaliações de digestão e fermentação ruminal podem ser diferentes mesmo com fontes de gorduras semelhantes (D'ANGELO, 2009).

#### **4.3 Síntese de Proteína Microbiana**

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) nas excreções diárias em mmol/L e mmol/dia de alantoína na urina e no leite, ácido úrico na urina excreção de urina em L/dia, purinas totais, derivados de purinas, purinas absorvíveis em Mmol/dia, produção de nitrogênio microbiano, proteína bruta microbiana, em g/dia, e eficiência da síntese de proteína microbiana entre as dietas experimentais (Tabela 7).

A suplementação de fontes de gordura reduz a quantidade de carboidratos rapidamente fermentáveis, podendo diminuir a quantidade de substrato disponível para a síntese de proteína microbiana (PALMQUIST e MATOS, 2006). Entretanto, alguns estudos encontrados na literatura não demonstraram tais resultados. FREITAS JÚNIOR et al. (2010) avaliaram a excreção dos derivados de purina, nitrogênio microbiano total e proteína microbiana em dietas com a inclusão de 3% de sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, óleo de soja e 16% de grão de soja cru na matéria seca das dietas e não observaram diferença entre as dietas avaliadas, sendo os valores semelhantes aos encontrados no presente estudo. VASCONCELOS et al. (2010) trabalhando com vacas leiteiras de alta produção alimentadas com grão de soja crua encontraram médias de purinas totais e absorvíveis de (462,13 e 393,37 Mmol/dia) e nitrogênio microbiano de 283,55 g/dia, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo. Os autores não observaram diferenças entre o grão de soja e seus subprodutos sobre a síntese de proteína microbiana, o que fortalece o potencial de utilização de grão de soja cru na

alimentação de vacas leiteiras. GOZHO et al. (2008) avaliaram a excreção dos derivados de purina e nitrogênio microbiano total com a suplementação de sementes de canola e de linhaça como fontes de gordura em dietas com média de 5,2% de extrato etéreo em vacas Holandesas, e também não observaram efeito das fontes de gordura sobre a excreção dos derivados de purina e nitrogênio microbiano total.

Tabela 7– Síntese de proteína microbiana de acordo com as dietas experimentais

| Item                        | Dietas experimentais <sup>1</sup> |         |         |         | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |       |       |
|-----------------------------|-----------------------------------|---------|---------|---------|------------------|------------|-------|-------|
|                             | C                                 | OS      | GS      | SCAG    |                  | C1         | C2    | C3    |
|                             | mmol/L                            |         |         |         |                  |            |       |       |
| Al-Leite                    | 0,068                             | 0,067   | 0,073   | 0,069   | 0,01             | 0,774      | 0,432 | 0,620 |
| Al-Urina                    | 16,61                             | 16,35   | 16,88   | 16,36   | 0,97             | 0,968      | 0,892 | 0,824 |
| Ác-Úrico                    | 1,53                              | 1,44    | 1,65    | 1,77    | 0,10             | 0,667      | 0,244 | 0,640 |
|                             | Mmol/dia                          |         |         |         |                  |            |       |       |
| Alantoina                   | 230,40                            | 250,79  | 227,74  | 224,03  | 9,95             | 0,862      | 0,291 | 0,890 |
| Acido Úrico                 | 21,56                             | 22,56   | 21,53   | 24,73   | 1,32             | 0,615      | 0,843 | 0,347 |
| ALAL <sup>3</sup>           | 1,47                              | 1,50    | 1,70    | 1,63    | 0,09             | 0,425      | 0,350 | 0,629 |
| DP <sup>4</sup>             | 252,16                            | 273,56  | 249,44  | 248,99  | 11,03            | 0,830      | 0,347 | 0,987 |
| Pabs <sup>5</sup>           | 276,13                            | 301,79  | 272,58  | 273,00  | 13,14            | 0,825      | 0,347 | 0,990 |
| ALA: DP <sup>6</sup> (%)    | 91,38                             | 91,85   | 91,23   | 90,25   | 0,31             | 0,715      | 0,177 | 0,292 |
| ETU <sup>7</sup> (L/dia)    | 14,30                             | 16,16   | 14,63   | 15,35   | 0,91             | 0,599      | 0,593 | 0,777 |
| Nmic <sup>8</sup> (g/dia)   | 173,79                            | 189,94  | 171,56  | 171,84  | 8,24             | 0,825      | 0,347 | 0,990 |
| PB mic <sup>9</sup> (g/dia) | 1086,19                           | 1187,13 | 1072,25 | 1074,00 | 8,24             | 0,825      | 0,347 | 0,990 |
| Eficiência <sup>10</sup>    | 108,63                            | 118,73  | 107,24  | 107,39  | 5,15             | 0,825      | 0,345 | 0,991 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®). C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio. <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>alantoína no leite; <sup>4</sup>derivados de purinas; <sup>5</sup>purinas absorvíveis; <sup>6</sup>relação alantoina/DP; <sup>7</sup>excreção total de urina; <sup>8</sup>nitrogênio microbiano; <sup>9</sup> proteína bruta microbiana; <sup>10</sup> gramas de PBmicro/kg de NDT consumido

Em 12 estudos que avaliaram a suplementação de gordura e seus efeitos sobre a SPM as fontes de gordura não reduziram a eficiência microbiana e em alguns casos promoveu o seu aumento, sendo cinco destes estudos utilizando gordura insaturada (DOREAU et al. 1993; DOREAU et al. 1997; KLUSMEYER et al. 1991). No entanto tais estudos ainda não são suficientes para se concluir os efeitos das gorduras sobre a síntese de proteína microbiana (SPM), pois há evidências que em dietas com baixa

quantidade de volumoso há diminuição do número de protozoários e conseqüentemente redução da renovação de proteína microbiana devido à alterações na defaunação o que leva a aumento a eficiência da SPM (JOUANY et al. 1988, USHIDA et al. 1990).

#### 4.4 Produção e composição do leite

Não houve efeito ( $P>0,05$ ) das fontes de gordura nas dietas sobre a produção de leite, produção de leite corrigida, nas produções de gordura e proteína e nos teores gordura, proteína e lactose concentrações de uréia e NU no leite (Tabela 8).

O peso corporal e o escore de condição corporal, não foram influenciados ( $P>0,05$ ) pelas dietas experimentais (Tabela 8). Isso indica que as dietas atenderam as exigências nutricionais dos animais durante o período experimental, principalmente para as dietas contendo fontes de gordura.

Tabela 8 – Produção e composição do leite de acordo com as dietas experimentais

| Item                    | Dietas experimentais <sup>1</sup> |        |        |        | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |       |       |
|-------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|------------------|------------|-------|-------|
|                         | C                                 | OS     | GS     | SCAG   |                  | C1         | C2    | C3    |
| Produção kg/dia         |                                   |        |        |        |                  |            |       |       |
| Leite                   | 22,93                             | 22,15  | 23,50  | 22,98  | 0,69             | 0,956      | 0,337 | 0,693 |
| PLC <sup>3</sup> , 3,5% | 20,74                             | 22,48  | 20,92  | 21,61  | 0,71             | 0,413      | 0,451 | 0,855 |
| Gordura                 | 0,665                             | 0,791  | 0,645  | 0,717  | 0,03             | 0,348      | 0,154 | 0,523 |
| Proteína                | 0,693                             | 0,663  | 0,685  | 0,690  | 0,02             | 0,688      | 0,547 | 0,901 |
| Composição do Leite, %  |                                   |        |        |        |                  |            |       |       |
| Gordura                 | 3,00                              | 3,55   | 3,07   | 3,19   | 0,12             | 0,334      | 0,173 | 0,717 |
| Proteína                | 3,07                              | 3,00   | 3,12   | 3,06   | 0,02             | 0,935      | 0,201 | 0,459 |
| Lactose                 | 4,61                              | 4,50   | 4,71   | 4,57   | 0,04             | 0,863      | 0,213 | 0,280 |
| Uréia leite (mg/dl)     | 19,12                             | 12,87  | 21,25  | 19,50  | 3,46             | 0,307      | 0,652 | 0,182 |
| NUL (mg/dl)             | 8,91                              | 9,27   | 9,91   | 9,10   | 1,60             | 0,287      | 0,649 | 0,176 |
| Peso Corporal (kg)      | 585,29                            | 580,25 | 595,07 | 564,84 | 9,67             | 0,705      | 0,984 | 0,086 |
| ECC                     | 2,57                              | 2,53   | 2,62   | 2,60   | 0,04             | 0,830      | 0,324 | 0,841 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®). C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio. <sup>2</sup>Erro padrão da média. <sup>3</sup> produção de leite corrigida.

Os estudos conduzidos na década de 90 desmostraram que fontes de gordura contendo ácidos graxos livres como óleos de sementes, promovem maiores concentrações do ácido linoléico conjugado (CLA) C18:2, trans-10, cis-12 no leite o que causa redução no teor de gordura do leite dos animais suplementados. Essa resposta pode ser considerada típica quando se trabalha com níveis de extrato etéreo em torno de 5,5% na matéria seca total em dietas de vacas em lactação. (D'ANGELO, et al., 2009; SANTOS et al., 2001). No entanto neste estudo não foram observadas tais resultados visto que a dieta contendo óleo de soja não reduziu o teor de gordura do leite de forma acentuada de acordo com BAUMAN e GRIINARI, (2001). ANDERSEN et al. (2008) avaliaram a utilização de um suplemento comercial de ácidos graxos em dieta com 8,0% de EE na matéria seca total em 29 vacas Holandesas com média de produção de leite de 35 kg/vaca/dia utilizando a silagem de milho como maior parte do volumoso. Estes autores não observaram efeito das dietas sobre a produção de leite e a produção de leite corrigida e o teor e a produção de gordura do leite. FREITAS JUNIOR et al. (2009) avaliaram a inclusão de óleo de soja, sais de cálcio e grão de soja em dietas com 5,5 % de EE na matéria seca total em vacas no terço médio de lactação com média de produção de 25kg/vaca/dia. Estes autores observaram que os animais que consumiram a dieta com sais de cálcio de ácidos graxos apresentaram menor teor de gordura no leite em relação às demais dietas experimentais e atribuíram este resultado a formação de ácidos graxos intermediários da biohidrogenação no rúmen já que não houve redução da digestibilidade de fibra ou alterações no padrão de fermentação no rúmen.

Os animais que receberam as rações contendo sais de cálcio de ácidos graxos apresentaram menor ( $P < 0,05$ ) concentração de uréia no leite (URL) e nitrogênio uréico no leite (NUL). Essa redução pode ser resultado do menor consumo de matéria o que possivelmente causou maior eficiência de utilização de nitrogênio em nível de rúmen, reduzindo a concentração de nitrogênio no sangue e leite.

#### 4.5 Perfil dos ácidos graxos do leite

A composição dos ácidos graxos do leite de acordo com as dietas são apresentados na Tabela 9. Não houve efeito das fontes de gordura nas dietas sobre as concentrações dos ácidos graxos variando o número de carbonos de 6 a 18 no total de ácidos graxos menores que 16 carbonos, maiores que 16 carbonos, total de saturados C18, total insaturados C18, e total de saturados, e insaturados ( $P>0,05$ ; Tabela 9). As concentrações dos isômeros C18:1 trans-11 (ácido vacênico), CLA cis-9, trans-11 e CLA trans-10, cis-12 não foram alterados pelas dietas experimentais (Tabela 9).

Poderia se esperar maiores concentrações dos ácidos C18:1 trans-11 (ácido vacênico), CLA cis-9, trans-11 e CLA trans-10, cis-12 no leite das vacas suplementadas com óleo e sais de cálcio de ácidos graxos (FREITAS JUNIOR, et al., 2009).

Segundo DOREAU, (2011) ácidos graxos livres são mais rapidamente e mais intensamente biohidrogenados no rúmen. À rápida ação das lipases ocorre separando o glicerol dos ácidos graxos tornando os disponíveis para adição de hidrogênio gerando tais isômeros acima (Figura 2) (CHILLIARD et al., 2007). Assim, os resultados esperados seriam maiores concentrações dos intermediários do processo de biohidrogenação devido à grande quantidade de gordura disponível no rúmen, ainda que com algum tipo de proteção. No entanto, as concentrações principalmente de ácido vacênico não foi verificada. Pode-se concluir o possível poder de proteção contra a biohidrogenação ruminal do grão de soja integral, e dos sais de cálcio de ácidos graxos. Na dinâmica ruminal (Tabela 19) podemos verificar as concentrações dos intermediários do processo de biohidrogenação.

Tabela 9 – Perfil de ácidos do leite de acordo com as dietas experimentais

| Item                       | Dietas experimentais <sup>1</sup> |       |       |       | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |       |       |
|----------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|------------------|------------|-------|-------|
|                            | C                                 | OS    | GS    | SCAG  |                  | C1         | C2    | C3    |
| AG,g/100g Total AG         |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| C <sub>4:0</sub>           | 1,05                              | 0,93  | 0,94  | 1,18  | 0,04             | 0,746      | 0,185 | 0,037 |
| C <sub>6:0</sub>           | 1,38                              | 1,17  | 1,24  | 1,49  | 0,04             | 0,433      | 0,081 | 0,061 |
| C <sub>8:0</sub>           | 1,02                              | 0,85  | 0,92  | 1,02  | 0,03             | 0,341      | 0,273 | 0,414 |
| C <sub>10:0</sub>          | 2,58                              | 2,11  | 2,35  | 2,45  | 0,11             | 0,347      | 0,407 | 0,878 |
| C <sub>11:0</sub>          | 0,31                              | 0,26  | 0,30  | 0,26  | 0,01             | 0,444      | 0,702 | 0,458 |
| C <sub>12:0</sub>          | 3,27                              | 2,72  | 3,12  | 2,93  | 0,13             | 0,369      | 0,455 | 0,671 |
| C <sub>14:0</sub>          | 10,71                             | 9,79  | 10,50 | 10,30 | 0,23             | 0,429      | 0,374 | 0,792 |
| C <sub>14:1</sub>          | 0,31                              | 0,27  | 0,34  | 0,23  | 0,02             | 0,591      | 0,878 | 0,118 |
| C <sub>15:0</sub>          | 0,22                              | 0,32  | 0,19  | 0,23  | 0,02             | 0,461      | 0,014 | 0,431 |
| C <sub>16:0</sub>          | 33,73                             | 30,79 | 30,50 | 31,69 | 0,70             | 0,101      | 0,858 | 0,553 |
| C <sub>16:1 cis</sub>      | 1,51                              | 1,48  | 1,42  | 1,26  | 0,06             | 0,462      | 0,420 | 0,444 |
| C <sub>17:0</sub>          | 0,32                              | 0,31  | 0,29  | 0,31  | 0,01             | 0,696      | 0,621 | 0,512 |
| C <sub>17:1</sub>          | 0,09                              | 0,11  | 0,08  | 0,09  | 0,01             | 0,957      | 0,179 | 0,746 |
| C <sub>18:0</sub>          | 12,59                             | 12,59 | 12,86 | 14,03 | 0,56             | 0,696      | 0,583 | 0,514 |
| C <sub>18:1 trans 11</sub> | 0,32                              | 0,34  | 0,55  | 0,40  | 0,05             | 0,375      | 0,298 | 0,339 |
| C <sub>18:2 n-6, cis</sub> | 2,90                              | 2,61  | 2,63  | 2,50  | 0,13             | 0,332      | 0,907 | 0,751 |
| C <sub>18:1cis 9</sub>     | 24,28                             | 26,81 | 25,58 | 23,97 | 0,65             | 0,451      | 0,224 | 0,397 |
| C <sub>18:3</sub>          | 0,14                              | 0,14  | 0,14  | 0,16  | 0,01             | 0,706      | 0,503 | 0,497 |
| C <sub>20:0</sub>          | 0,46                              | 0,10  | 0,11  | 0,13  | 0,08             | 0,104      | 0,934 | 0,909 |
| cis-9,trans-11 CLA         | 0,47                              | 0,44  | 0,51  | 0,47  | 0,04             | 0,956      | 0,722 | 0,782 |
| trans-10,cis-12 CLA        | 0,04                              | 0,04  | 0,04  | 0,03  | 0,01             | 0,799      | 0,782 | 0,774 |
| Total                      |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| <C16                       | 18,75                             | 18,59 | 20,10 | 20,17 | 0,84             | 0,686      | 0,500 | 0,978 |
| C16                        | 38,76                             | 45,55 | 42,86 | 42,18 | 1,24             | 0,136      | 0,716 | 0,835 |
| >C16                       | 33,77                             | 30,79 | 30,50 | 31,69 | 0,70             | 0,101      | 0,858 | 0,553 |
| C18                        |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Insaturado C18             | 28,18                             | 30,39 | 29,47 | 27,56 | 0,73             | 0,583      | 0,320 | 0,377 |
| Saturado C18               | 11,57                             | 12,59 | 12,86 | 14,03 | 0,58             | 0,292      | 0,588 | 0,519 |
| Insat/Sat C18              | 2,77                              | 2,52  | 2,37  | 2,03  | 0,13             | 0,153      | 0,343 | 0,374 |
| Total                      |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Saturados                  | 64,49                             | 60,64 | 62,10 | 64,86 | 0,76             | 0,249      | 0,119 | 0,187 |
| Insaturados                | 30,09                             | 32,26 | 31,32 | 29,15 | 0,73             | 0,639      | 0,279 | 0,315 |
| Insat/Sat                  | 2,20                              | 1,91  | 2,04  | 2,27  | 0,07             | 0,463      | 0,192 | 0,279 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®). C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio. <sup>2</sup> Erro padrão da média.

Quando se avalia o processo de inclusão e digestão de gordura em ruminantes, a maioria dos ácidos graxos é modificada por meio do metabolismo ruminal, dessa forma a biohidrogenação normalmente não é completa, resultando em ampla variedade

de ácidos graxos (BYERS e SCHEHING, 1993). Assim, quando ocorre biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados, aumenta o fluxo duodenal de ácidos graxos C18:1 trans e ácido linoléico conjugado CLA cis-9, trans-11 e CLA trans-10, cis-12, apresentando o último comprovado efeito inibidor sobre a síntese de gordura do leite (BAUMAN e GRIINARI, 2003; PETERSON et al., 2003).

#### 4.6 Perfil de ácidos graxos do plasma

A composição dos ácidos presentes no plasma de acordo com as dietas experimentais é apresentado na Tabela 10. Não houve efeito das fontes de gordura sobre as concentrações dos ácidos graxos no plasma. Essa ausência de efeito das dietas sobre as concentrações dos ácidos graxos no plasma pode ser atribuída à grande variação entre vacas para este parâmetro, reduzindo o efeito dos tratamentos (HUANG et al., 2008). Esse mesmo autor e colaboradores avaliaram a suplementação de óleo de soja em 2,5% da matéria seca da dieta de vacas leiteiras e observaram concentrações semelhantes dos ácidos graxos C14; C16:0, C18:1, e C18:2 apresentados neste estudo.

Tabela 10 – Perfil de ácidos graxos do plasma de acordo com as dietas experimentais

| Item              | Dietas experimentais <sup>1</sup> |       |       |       | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |       |       |
|-------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|------------------|------------|-------|-------|
|                   | C                                 | OS    | GS    | SCAG  |                  | C1         | C2    | C3    |
|                   | mg/100 mL                         |       |       |       |                  |            |       |       |
| C <sub>14:0</sub> | 4,96                              | 4,07  | 4,56  | 5,20  | 0,26             | 0,590      | 0,242 | 0,418 |
| C <sub>16:0</sub> | 27,07                             | 25,52 | 26,93 | 27,44 | 0,60             | 0,776      | 0,315 | 0,784 |
| C <sub>16:1</sub> | 1,04                              | 1,17  | 1,13  | 1,07  | 0,12             | 0,738      | 0,784 | 0,847 |
| C <sub>18:0</sub> | 20,94                             | 23,47 | 20,90 | 21,49 | 0,63             | 0,547      | 0,210 | 0,774 |
| C <sub>18:1</sub> | 25,44                             | 26,83 | 26,49 | 24,86 | 0,74             | 0,699      | 0,502 | 0,414 |
| C <sub>18:2</sub> | 20,50                             | 15,87 | 19,88 | 19,67 | 1,28             | 0,503      | 0,231 | 0,955 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®). C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio. <sup>2</sup> Erro padrão da média.

HIPPEN et al. (1996) também observaram resultados semelhantes em vacas alimentadas com gordura altamente insaturadas. O aumento das concentrações de ácidos graxos saturados (C16:0 e C18:0) no plasma dos estudos da literatura pode ser justificado pela absorção de ácidos graxos insaturados que facilita a absorção de ácidos graxos saturados (OCKNER et al., 1972). Nos dados da literatura a suplementação de ácidos graxos insaturados favorece a biohidrogenação ruminal, e pode aumentar as concentrações de AG saturados no plasma. Esse resultado foi observado neste estudo, pois, a dieta com óleo de soja promoveu aumento das concentrações de C18:0 no plasma em 10,6% em relação as dietas com grão de soja e SCAG, indicando maior biohidrogenação (Tabela 10).

Quando ocorre aumento das concentrações, dos AG C18:1, C18:2, e C18:3 no plasma significa que a suplementação de ácidos graxos insaturados resulta em grande quantidade destes no rúmen superando a capacidade de biohidrogenação, apresentando assim maiores quantidades de C18:1, C18:2, e C18:3 que chega ao intestino para serem absorvidos. Na Tabela 10 é possível verificar que a dieta com óleo de soja promoveu no sangue dos animais suplementados uma redução na concentração de C18:2 de 19,31% em relação a dieta com sais de cálcio de ácidos graxos em 20,17% em relação a dieta com grão de soja. Comcomitantemente houve aumento das concentrações de C18:0 para a dieta com óleo de soja em 10,77% em relação a dieta com grão de soja.

De forma alternativa, a suplementação de gordura altamente rica em AGPI pode levar a uma grande relação de C18:2 dos tecidos para o sangue ou uma redução do fluxo de AG dos tecidos pela ação lipoproteína lipase (GRUMMER E CARROLL, 1991). Isso quer dizer que o ácido graxo C18:2 pode chegar ao intestino dependendo do processo digestivo. O efeito do grau de saturação da gordura da dieta sobre essa partição envolve a mobilização de reservas corporais ou produção de leite (FIRKINS e EASTRIDGE, 1994).



#### 4.7 Balanço de nitrogênio

A média para os consumos de compostos nitrogenados totais (NT), a excreção de compostos nitrogenados totais nas fezes (N-fecal), na urina (N-urina) e no leite (N-leite), o balanço de nitrogênio (BN) e a eficiência de utilização de nitrogênio obtido para as dietas são apresentados na Tabela 11.

O consumo de nitrogênio total, excreção de compostos nitrogenados totais nas fezes, urina e no leite, o balanço de nitrogênio (BN) em gramas de NT por dia e em porcentagem por dia, assim como a eficiência de utilização de nitrogênio não foram influenciadas ( $P>0,05$ ) pelas dietas.

SPANGHERO e KOWALSKI (1997) realizaram compilação de dados utilizando o modelo de meta-análise, e avaliaram 35 experimentos e 135 dietas diferentes, com média de consumo de matéria seca de 17,6 kg/dia, e produção média de leite de 26,1 kg/dia. Estes autores avaliaram o balanço de nitrogênio em vacas leiteiras e verificaram valores médios de balanço de nitrogênio de 39 g/dia. No presente estudo, a média de balanço de nitrogênio foi de 43 g/dia.

GOZHO e MUTSVANGWA (2008) avaliaram a suplementação de 8,3% de óleo de canola na matéria seca total nas dietas de vacas Holandesas no início de lactação, utilizando dietas com 5,2% de extrato etéreo na matéria seca. Estes autores não verificaram efeito do óleo sobre o balanço de nitrogênio dos animais suplementados. ELLIOTT et al. (1993) avaliaram a suplementação de sebo e óleo de milho em 2,5 e 5,0 % na matéria seca total vacas leiteiras canuladas no rúmen, e não verificaram alterações na utilização de nitrogênio.

Tabela 11 – Balanço de nitrogênio de acordo com as dietas experimentais

| Tabela 11 Balanço de Nitrogênio de acordo com as dietas experimentais |                                   |        |        |        |                  |            |       |       |
|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|------------------|------------|-------|-------|
| Item                                                                  | Dietas experimentais <sup>1</sup> |        |        |        | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |       |       |
|                                                                       | C                                 | OS     | GS     | SCAG   |                  | C1         | C2    | C3    |
| g de N/dia                                                            |                                   |        |        |        |                  |            |       |       |
| Consumo                                                               | 456,07                            | 471,25 | 449,39 | 482,32 | 13,23            | 0,515      | 0,774 | 0,142 |
| Fezes                                                                 | 114,18                            | 109,01 | 112,02 | 104,01 | 4,47             | 0,472      | 0,906 | 0,421 |
| Urina                                                                 | 139,09                            | 165,01 | 129,83 | 144,64 | 6,39             | 0,555      | 0,050 | 0,339 |
| Leite                                                                 | 92,24                             | 98,68  | 96,92  | 101,47 | 2,72             | 0,129      | 0,910 | 0,396 |
| Balanço                                                               | 110,54                            | 98,54  | 110,62 | 116,84 | 11,98            | 0,935      | 0,538 | 0,826 |
| % N total                                                             |                                   |        |        |        |                  |            |       |       |
| Fezes                                                                 | 25,87                             | 23,68  | 25,08  | 22,74  | 1,02             | 0,370      | 0,924 | 0,399 |
| Urina                                                                 | 31,22                             | 35,87  | 29,49  | 31,55  | 1,45             | 0,696      | 0,081 | 0,546 |
| Leite                                                                 | 20,59                             | 21,21  | 21,64  | 21,57  | 0,55             | 0,355      | 0,694 | 0,951 |
| Balanço                                                               | 22,30                             | 19,21  | 23,76  | 24,12  | 2,19             | 0,989      | 0,336 | 0,949 |
| Eficiência <sup>3</sup>                                               | 0,205                             | 0,212  | 0,216  | 0,215  | 0,01             | 0,352      | 0,691 | 0,948 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®). C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio. <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>kg de N no leite/kg N ingerido.

PETIT et al. (2002) avaliaram a suplementação de sais de cálcio de ácidos graxos, sementes de linhaça e soja micronizada como fonte de gordura nas rações de vacas no início de lactação em rações contendo cerca de 8,0% de extrato etéreo. Estes autores não observaram diferenças no balanço de nitrogênio entre as fontes de gordura utilizadas, sendo os valores verificados por estes autores (9,5% do nitrogênio total consumido) menores que os valores observados neste estudo (23,48% do nitrogênio total consumido).

Como não houve efeito das dietas sobre o balanço de nitrogênio este resultado se justifica pelos dados de consumo de nitrogênio (g/dia) e digestibilidade de forma que também não foram observadas alterações entre as dietas experimentais (Tabela 5), as concentrações de nitrogênio uréico no leite (Tabela 8) e no soro (Tabela 13). Isso justifica a ausência de diferenças entre os consumos e a excreção de nitrogênio, já que as rações utilizadas neste estudo foram isoprotéicas.

#### 4.8 Balanço de energia

Os dados de balanço de energia são apresentados na Tabela 12. Não houve efeito das dietas com fontes de gordura sobre os consumos de EB, ED e ELL ( $P>0,05$ ). A dieta com sais de cálcio de ácidos graxos promoveu aumento de 4.3% para o consumo de ELL em relação a grão de soja. Esse resultado pode ser observado por FREITAS JUNIOR et al., (2009) e SANTOS et al., (2009). De forma semelhante não houve efeito das dietas experimentais sobre os valores de energia líquida de lactação (ELL) MPCV, energia líquido de ganho (ELg), MECC, balanço de energia, e a eficiência ( $EL_L$  leite/CED) e a eficiência ( $EL_L$  produção/CED).

Tabela 12– Balanço de energia de acordo com as dietas experimentais

| Item                                        | Dietas experimentais <sup>1</sup> |       |       |       | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |       |       |
|---------------------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|------------------|------------|-------|-------|
|                                             | C                                 | OS    | GS    | SCAG  |                  | C1         | C2    | C3    |
| Consumo                                     |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| EB <sup>3</sup> Mcal/d                      | 77,89                             | 79,97 | 77,77 | 81,27 | 1,95             | 0,527      | 0,867 | 0,265 |
| ED <sup>4</sup> Mcal/d                      | 55,48                             | 58,78 | 55,58 | 59,63 | 1,57             | 0,262      | 0,631 | 0,143 |
| EL <sub>L</sub> <sup>5</sup> Mcal/d         | 29,50                             | 31,06 | 29,76 | 30,93 | 0,76             | 0,273      | 0,488 | 0,331 |
| Produção                                    |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Leite EL <sub>L</sub> <sup>6</sup> Mcal/dia | 12,63                             | 14,33 | 12,85 | 13,97 | 0,45             | 0,097      | 0,108 | 0,076 |
| MPCV <sup>7</sup> , (kg/dia)                | 0,05                              | 0,07  | 0,60  | 0,84  | 0,04             | 0,157      | 0,044 | 0,575 |
| EL <sub>g</sub> , <sup>8</sup> (Mcal/dia)   | 6,88                              | 6,61  | 7,78  | 7,81  | 0,54             | 0,651      | 0,302 | 0,983 |
| MECC <sup>9</sup> (22 dias)                 | 0,03                              | 0,03  | 0,02  | 0,04  | 0,03             | 0,632      | 0,182 | 1,000 |
| Balanço                                     |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| EL <sub>L</sub> <sup>10</sup> , (Mcal/dia)  | 9,39                              | 9,30  | 9,29  | 9,13  | 0,10             | 0,134      | 0,411 | 0,201 |
| Eficiência                                  |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| EL <sub>L</sub> leite/CED                   | 0,22                              | 0,25  | 0,23  | 0,24  | 0,01             | 0,368      | 0,365 | 0,540 |
| EL <sub>L</sub> produção <sup>11</sup> /CED | 0,37                              | 0,35  | 0,36  | 0,37  | 0,08             | 0,202      | 0,209 | 0,780 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®). C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio. <sup>2</sup>Erro padrão da média.

<sup>3</sup>Consumo de Energia bruta (CEB).

<sup>4</sup>Consumo de Energia Digestível (CED).

<sup>5</sup>EL<sub>L</sub> (consumo) =  $0.703 \times \text{EM (Consumo)} - 0.19 + \{[(0.097 \times \text{EM (Consumo)} + 0.19)/97] \times [\text{EE} - 3]\}$ ; EM (Consumo) =  $1.01 \times (\text{ED (consumo)} - 0.45) + 0.0046 \times (\text{EE} - 3)$  (NRC, 2001).

<sup>6</sup>EL para produção de leite (Mcal/dia) = Produção de leite (kg)  $\times (0.0929 \times \text{G\%} + 0.0563 \times \text{proteína verdadeira \%} + 0.0395 \times \text{lactose\%})$  (NRC, 2001).

<sup>7</sup>Mudança de peso de corpo vazio (NRC, 2001);

<sup>8</sup>Energia líquida de ganho (ELg) (Variação de peso corporal) calculado pelas fórmulas do NRC (2001).

<sup>9</sup>MECC=mudança de escore de condição corporal;

<sup>10</sup>EL = EL (consumo) – EL (ganho PV) – EL (leite).

<sup>11</sup>EL de produção (EL produção de leite + EL ganho de PV).

Não houve diferença ( $P>0,05$ ) na energia líquida de ganho e mudança de escore de condição corporal entre as dietas utilizadas. Entretanto, é preciso considerar que a composição do ganho em peso corporal não foi determinada, dessa forma, possivelmente o cálculo de ganho de energia líquida de peso corporal pode superestimar a energia líquida retida. Embora isso tenha ocorrido, o balanço de energia pode ser estimado pelo cálculo de conservação de energia, onde não houve diferença ( $P>0,05$ ) na eficiência de utilização de energia para manutenção entre as rações experimentais (Tabela 12).

Esse modelo de cálculo foi escolhido por ser o mais utilizado para o balanço de energia, e por eliminar os erros de aumento de ganho de peso vivo que podem superestimar o aumento nas exigências de manutenção (HARVATINE e ALLEN, 2006a). O peso metabólico pode ser usado para prever as exigências de energia de manutenção entre animais diferindo no peso vivo, mas não estimar as mudanças nas exigências de energia líquida de manutenção com ganho de peso, pois há variações na composição corporal dos animais estudados (NRC, 2001).

No entanto, as diferentes fases de lactação podem influenciar o aproveitamento de energia devido ao balanço de energia em que o animal se encontra. Estas respostas podem ser parcialmente comprovadas justamente pelas características específicas inerentes ao tipo e nível de suplemento de gordura utilizado nas dietas experimentais durante este estudo. As dietas experimentais não causaram variação na digestibilidade da matéria seca (Tabela 7). A utilização de energia líquida pode ser alterada pelos suplementos de gordura, possivelmente devido às diferenças na digestibilidade de ácidos graxos específicos presentes nos suplementos utilizados.

#### **4.9 Metabolitos Sanguíneos**

As concentrações plasmáticas de glicose, NUS, proteínas totais e Beta-hidroxibutirato não foram influenciadas ( $P>0,05$ ) pelas fontes de gordura adicionadas nas dietas (Tabela 13). No entanto, as concentrações no soro de albumina, aspartato aminotransferase (AST), gama glutamil transferase (GGT) e colesterol HDL, colesterol total, uréia, e nitrogênio ureico no soro, foram maiores para os animais submetidos a

dietas contendo fontes de gordura quando comparada a dieta controle ( $P < 0,05$ ; Tabela 13).

O aumento da concentração dos componentes, colesterol-HDL e colesterol total no soro pode ser justificado devido ao maior consumo de ácidos graxos nas dietas, que proporcionou aumento das respectivas frações relativas ao metabolismo de lipídios transportadas no sangue (ELLIOTT et al., 1993; SCHAUFF et al., 1992; CHRISTENSEN et al. 1994).

A concentração de glicose plasmática não foi influenciada pelas dietas, sendo este resultado semelhante aos estudos de ELLIOTT et al. (1993), BREMMER et al. (1998) e DRACKEY et al. (1992), que verificaram variação na concentração de glicose plasmática em vacas suplementadas com diferentes fontes de gordura. A manutenção da concentração de glicose plasmática se relaciona à relativa estabilidade nas concentrações de glicose em ruminantes, especialmente quando as vacas estão no meio e final de lactação, como as utilizadas no presente estudo.

Tabela 13 - Metabólitos sanguíneos de acordo com as dietas experimentais

| Item               | Dietas experimentais <sup>1</sup> |        |        |        | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |       |       |
|--------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|------------------|------------|-------|-------|
|                    | C                                 | OS     | GS     | SCAG   |                  | C1         | C2    | C3    |
|                    |                                   |        | mg/dl  |        |                  |            |       |       |
| Glicose            | 74,37                             | 76,00  | 74,50  | 76,75  | 2,20             | 0,783      | 0,943 | 0,713 |
| Colesterol         | 106,13                            | 175,75 | 192,50 | 185,88 | 9,00             | <0,001     | 0,433 | 0,733 |
| C-HDL <sup>5</sup> | 75,87                             | 89,25  | 95,37  | 87,75  | 2,92             | 0,017      | 0,706 | 0,289 |
| Uréia              | 31,00                             | 36,87  | 36,00  | 34,87  | 1,26             | 0,046      | 0,563 | 0,694 |
| NUS <sup>6</sup>   | 14,51                             | 17,21  | 16,81  | 16,30  | 0,58             | 0,050      | 0,573 | 0,502 |
|                    |                                   |        | g/l    |        |                  |            |       |       |
| Proteínas totais   | 6,05                              | 5,91   | 6,43   | 6,67   | 0,18             | 0,531      | 0,201 | 0,676 |
| Albumina           | 1,98                              | 2,21   | 2,25   | 2,21   | 0,03             | 0,005      | 0,818 | 0,691 |
|                    |                                   |        | U/L    |        |                  |            |       |       |
| AST <sup>7</sup>   | 50,25                             | 66,12  | 67,75  | 69,50  | 4,18             | 0,034      | 0,761 | 0,854 |
| GGT <sup>8</sup>   | 3,20                              | 2,16   | 1,98   | 1,90   | 0,24             | 0,009      | 0,617 | 0,862 |
|                    |                                   |        | mmol/l |        |                  |            |       |       |
| BHA <sup>9</sup>   | 0,331                             | 0,292  | 0,396  | 0,297  | 0,02             | 0,972      | 0,453 | 0,245 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®). C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio. <sup>2</sup>Erro padrão da média.

<sup>5</sup>Colesterol – lipoproteína de alta densidade (HDL); <sup>6</sup> Nitrogênio uréico no soro; <sup>7</sup>AST: aspartato aminotransferase; <sup>8</sup>GGT: gama glutamil transferase; <sup>9</sup> β-Hidroxibutirato.

OLIVEIRA et al. (2005) avaliaram a bioquímica sérica de vacas Holandesas no pré e pós-parto e observaram valores próximos aos encontrados neste estudo para as concentrações da enzima gamaglutamiltransferase, em vacas com 180 dias de lactação. HOEDEMAKER et al. (2004) avaliaram os parâmetros sanguíneos de 238 vacas e observaram valores da enzima aspartatoaminotransferase de 40,0 unidades por litro (U/L) aos 77 dias pós-parto, valor este semelhante ao encontrado neste estudo sendo estes valores também semelhantes aos estabelecidos por KANEKO, (1997).

Houve aumento ( $P<0,05$ ) da concentração de uréia ( $P<0,045$ ) e tendência ( $P<0,05$ ) para redução da concentração de nitrogênio ureico no soro para as vacas que receberam as dietas com fontes de gordura. Esse aumento pode ser atribuída à possíveis alterações no aproveitamento de nitrogênio no rúmen e no consumo de matéria seca das vacas suplementadas com sais de cálcio quando comparadas com as demais dietas experimentais. DRACKLEY et al. (1992) e ELLIOTT et al. (1993) não observaram diferença na concentração de nitrogênio ureico no sangue em vacas recebendo diferentes fontes de gordura nas rações. Segundo estes autores, este resultado pode ser atribuído a variação do consumo durante o período de fornecimento das rações avaliadas.

#### **4.9.1 Dinâmica Ruminal, Biohidrogenação**

Os resultados referentes aos dados de dinâmica ruminal pelo esvaziamento são apresentados na Tabela 14. Não houve efeito das dietas experimentais sobre o conteúdo ruminal em quilos, volume ruminal, conteúdo de matéria seca, pool ruminal de matéria seca, taxa de passagem de líquido, volume de líquido ruminal, e taxa de renovação ruminal ( $P>0,05$ ). A quantidade de líquido estimado pelo indicador polietilenoglicol (PEG) foi de 61,68 litros esta de acordo com o volume estabelecido para vacas com média de 25 kg de leite no mesmo período de lactação (GARY et al., 1979). O volume em quilos e em litros 4,5 horas após a alimentação pode ser estimado de acordo com a técnica de OBA e ALLEN (2003).

Tabela 14 – Dinâmica ruminal e taxa de passagem de líquido do rúmen de acordo com as dietas experimentais

| Item                          | Dietas experimentais <sup>1</sup> |       |       |       | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |       |       |
|-------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|------------------|------------|-------|-------|
|                               | C                                 | OS    | GS    | SCAG  |                  | C1         | C2    | C3    |
| Conteúdo ruminal, kg          | 69,58                             | 73,52 | 70,22 | 66,08 | 1,59             | 0,905      | 0,104 | 0,267 |
| Conteúdo ruminal, L           | 86,62                             | 90,50 | 85,62 | 81,37 | 2,24             | 0,860      | 0,154 | 0,440 |
| Conteúdo ruminal, % MS        | 9,18                              | 9,02  | 9,73  | 9,04  | 0,27             | 0,851      | 0,419 | 0,199 |
| Volume ruminal líquido, L     | 59,00                             | 60,51 | 67,54 | 59,68 | 2,98             | 0,623      | 0,687 | 0,381 |
| Taxa de passagem, % /h        | 3,67                              | 4,28  | 3,81  | 4,15  | 0,22             | 0,411      | 0,574 | 0,580 |
| Taxa de passagem, L/h         | 2,12                              | 2,47  | 2,31  | 2,32  | 0,07             | 0,194      | 0,422 | 0,964 |
| Turnover ruminal, vezes /24 h | 0,96                              | 1,02  | 0,91  | 0,99  | 0,06             | 0,877      | 0,618 | 0,625 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®). C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio. <sup>2</sup>Erro padrão da média;

#### 4.9.1.1 Cinética de digestão ruminal

Os resultados de cinética e digestão ruminal assim como as proporções dos componentes na digesta ruminal são apresentados na Tabela 15 e 16. A avaliação dos resultados de dinâmica ruminal e seus possíveis efeitos sobre o processo de biohidrogenação consiste em uma das mais importantes análises a serem investigadas pelos pesquisadores em nutrição animal. Existem poucos estudos na literatura que avaliaram a dinâmica ruminal sobre o processo de biohidrogenação.

Não houve efeito das fontes de gorduras avaliadas sobre a taxa de digestão da matéria seca, e da fibra em detergente neutro (FDN) ( $P>0,05$ ; Tabela 15). No entanto, os animais alimentados com a dieta contendo grão de soja apresentaram menor taxa de digestão da fibra em detergente neutro potencialmente digestível (FDNpd) quando comparada a digesta dos animais alimentados com a dieta contendo sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG) (0,89 vs 1,34 %/h) ( $P<0,036$ ). De forma coerente os animais submetidos à dieta com grão de soja apresentaram maior taxa de renovação ruminal em relação aos animais submetidos à dieta contendo sais de cálcio (2,82 vs 1,91 %/h) ( $P<0,018$ ). O tamanho e a densidade de partículas da digesta contrasta, com a passagem no rúmen sendo estes influenciados pela mastigação e fermentação (ALLEN, 1996; ALLEN, 2000). O aumento da ruminação proporciona redução do tamanho de

partícula bem como o aumento dos movimentos ruminais reduzindo ainda mais as partículas pequenas e sua taxa de escape do rúmen (Allen, 1996). Apesar de não significativo a taxa de passagem da FDNpd foi maior 4,24% para a dieta com grão de soja quando comparada a dieta com sais de cálcio (4,48 vs 4,29 %/h) justificando a maior taxa de digestão e de renovação ruminal dessa fração (Tabela 15).

Não houve efeito das dietas experimentais sobre as taxas de renovação ruminal da matéria seca, matéria orgânica, FDN e FDNi (Tabela 15;  $P > 0,05$ ). A taxa de renovação ruminal da matéria seca dos animais submetidos à dieta com grão de soja foi 8,3 % menor quando comparada as demais dietas. Não houve efeito das dietas experimentais sobre a taxa de passagem da matéria seca, FDN, FDNi e FDNpd ( $P > 0,05$ ). A taxa de passagem média de matéria seca deste experimento foi de 4,86 %/h (NRC, 2001). Apesar de não ter sido observada redução do consumo de matéria seca para as diferentes dietas (Tabela 5), houve aumento numérico do consumo de matéria seca em 3,2% para as dietas com fontes de gordura em relação a dieta controle (Tabela 5). A variação pode ser comprovada pela alteração da taxa de passagem para as dietas contendo fontes de gordura sendo esta menor em 6,7% em relação à dieta controle (Tabela 15).

Não houve diferenças entre a composição total de matéria seca, matéria orgânica, matéria mineral, FDN, FDNpd e FDNi. Devido ao maior consumo de FDN observado para os animais submetidos à dieta com grão de soja (Tabela 5) também foi observado no pool ruminal destes animais 2,1 % (100 g de FDN) a mais comparada a dieta com sais de cálcio (Tabela 15).



Tabela 15 – Dinâmica ruminal, concentrações e digestibilidade de nutrientes

| Item                            | Dietas experimentais <sup>1</sup> |       |       |       | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |       |       |
|---------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|------------------|------------|-------|-------|
|                                 | C                                 | OS    | GS    | SCAG  |                  | C1         | C2    | C3    |
| Taxa de digestão (%/h)          |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Matéria seca                    | 3,09                              | 3,85  | 3,05  | 3,95  | 0,24             | 0,229      | 0,441 | 0,100 |
| FDN <sup>3</sup>                | 2,40                              | 2,29  | 2,37  | 2,30  | 0,51             | 0,655      | 0,797 | 0,729 |
| FDNpd <sup>4</sup>              | 1,21                              | 1,30  | 0,89  | 1,34  | 0,09             | 0,816      | 0,292 | 0,036 |
| Taxa de renovação ruminal (%/h) |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Matéria seca                    | 8,22                              | 8,67  | 7,81  | 8,69  | 0,26             | 0,701      | 0,383 | 0,122 |
| Matéria orgânica                | 7,49                              | 7,92  | 7,15  | 7,94  | 0,24             | 0,673      | 0,396 | 0,362 |
| FDN                             | 4,92                              | 5,02  | 4,97  | 4,52  | 0,22             | 0,836      | 0,514 | 0,368 |
| FDN indigestível                | 1,86                              | 1,45  | 1,44  | 1,65  | 0,10             | 0,052      | 0,596 | 0,315 |
| FDNpd                           | 2,13                              | 2,48  | 2,82  | 1,91  | 0,16             | 0,354      | 0,714 | 0,018 |
| Taxa de passagem (%/h)          |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Matéria seca                    | 5,12                              | 4,82  | 4,75  | 4,75  | 0,19             | 0,296      | 0,845 | 0,987 |
| FDN                             | 4,04                              | 3,70  | 3,83  | 3,89  | 0,24             | 0,468      | 0,630 | 0,893 |
| FDNpd <sup>4</sup>              | 4,09                              | 4,37  | 4,48  | 4,29  | 0,24             | 0,477      | 0,982 | 0,697 |
| FDN indigestível                | 1,36                              | 1,14  | 1,06  | 1,30  | 0,06             | 0,060      | 0,697 | 0,062 |
| Massa da digesta ruminal kg     |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Peso matéria natural            | 66,88                             | 66,65 | 66,10 | 63,40 | 1,37             | 0,453      | 0,374 | 0,276 |
| Matéria seca                    | 6,01                              | 6,11  | 6,52  | 5,76  | 0,30             | 0,792      | 0,946 | 0,172 |
| Matéria orgânica                | 5,61                              | 5,73  | 5,98  | 5,75  | 0,29             | 0,619      | 0,754 | 0,664 |
| Matéria mineral                 | 0,40                              | 0,38  | 0,54  | 0,39  | 0,03             | 0,531      | 0,195 | 0,066 |
| FDN                             | 4,34                              | 4,41  | 4,60  | 4,50  | 0,22             | 0,637      | 0,693 | 0,799 |
| FDNpd                           | 3,58                              | 3,41  | 3,69  | 3,51  | 0,12             | 0,875      | 0,491 | 0,586 |
| FDNi <sup>5</sup>               | 3,04                              | 3,10  | 3,19  | 3,08  | 0,10             | 0,676      | 0,866 | 0,629 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®). C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio. <sup>2</sup> Erro padrão da média; <sup>3</sup> fibra em detergente neutro; <sup>4</sup> fibra em detergente neutro potencialmente digestível; <sup>5</sup>fibra em detergente neutro indigestível;

Não houve diferenças para a digestibilidade ruminal da FDN em porcentagem e em kg/dia ( $P>0,05$ ; Tabela 16). A digestibilidade ruminal da FDN foi de 25,84% em média para este estudo, resultado semelhante aos dados observados pelo estudo do HAVERTINE e ALLEN, (2006a), que observaram valor médio de 28,35% avaliando vacas canuladas no rúmen e duodeno com produção média de leite de 40 kg vaca/dia e consumo de 24,0 kg de MS. No entanto OBA e ALLEN, (2003a) avaliaram a dinâmica ruminal em 8 vacas Holandesas canuladas no rúmen e duodeno com produção média de leite de 36 kg/vaca/dia e observaram digestibilidade ruminal de FDN em 18%. Estes

autores relatam que este valor está abaixo do comumente observado na literatura e atribuíram o baixo valor de digestibilidade ruminal ao fluxo superestimado de FDN no duodeno.

Tabela 16 – Dinâmica ruminal, concentrações e digestibilidade da FDN

| Item                           | Dietas experimentais <sup>1</sup> |       |       |       | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |       |       |
|--------------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|------------------|------------|-------|-------|
|                                | C                                 | OS    | GS    | SCAG  |                  | C1         | C2    | C3    |
| FDN                            |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Consumo, kg/dia                | 4,78                              | 4,99  | 5,25  | 4,65  | 0,16             | 0,423      | 0,868 | 0,040 |
| Digestibilidade ruminal        |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Kg/dia                         | 2,76                              | 2,79  | 3,18  | 2,64  | 1,06             | 0,706      | 0,699 | 0,137 |
| %                              | 28,26                             | 27,79 | 25,86 | 21,46 | 2,41             | 0,379      | 0,290 | 0,328 |
| Passagem para o abomaso        |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Kg/dia                         | 3,70                              | 3,58  | 3,98  | 3,88  | 0,11             | 0,591      | 0,145 | 0,727 |
| % do consumo                   | 74,41                             | 72,20 | 75,45 | 80,70 | 2,79             | 0,945      | 0,206 | 0,324 |
| FDN indigestível kg            | 1,62                              | 1,60  | 1,63  | 1,59  | 0,03             | 0,863      | 0,986 | 0,631 |
| FDNpd kg                       | 1,90                              | 1,98  | 2,26  | 2,08  | 0,10             | 0,336      | 0,405 | 0,501 |
| Digestibilidade no trato total |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Kg/dia                         | 2,31                              | 2,71  | 2,79  | 2,41  | 0,19             | 0,059      | 0,614 | 0,314 |
| % do consumo (fluxo abomasal)  | 48,37                             | 54,36 | 53,12 | 51,83 | 1,55             | 0,092      | 0,512 | 0,697 |
| FDNi                           |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Consumo kg/dia                 | 1,72                              | 1,78  | 1,71  | 1,69  | 0,27             | 0,606      | 0,770 | 0,704 |
| FDNpd                          |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Consumo kg/dia                 | 2,65                              | 2,69  | 2,41  | 2,70  | 0,07             | 0,542      | 0,170 | 0,016 |
| Digestibilidade ruminal        |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Kg/dia                         | 1,41                              | 1,79  | 2,02  | 1,88  | 0,10             | 0,041      | 0,508 | 0,611 |
| %                              | 42,09                             | 55,26 | 54,91 | 55,04 | 3,30             | 0,076      | 0,969 | 0,987 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®). C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio. <sup>2</sup> Erro padrão da média;

O consumo de FDNpd kg/dia foi maior para as vacas submetidas a dieta com sais de cálcio em relação a dieta com grão de soja ( $P<0,016$ ). No entanto os animais submetidos às dietas com fontes de gordura apresentaram maior digestibilidade ruminal da fração FDNpd ( $P<0,041$ ) em relação a dieta controle. Esses dados podem ser justificados pelo maior consumo de FDNpd para a dieta com grão de soja o que permitiu maior média para as fontes de gordura proporcionando efeito na análise estatística quando se analisa o contraste 3.

#### 4.9.1.2 Fluxo abomasal de ácidos graxos e biohidrogenação

O consumo de ácidos graxos representa uma combinação da concentração de ácidos graxos (AG) da dieta e o consumo de matéria seca. Para avaliação do consumo de ácidos graxos deste estudo todos os ingredientes foram analisados quanto a concentração dos ácidos graxos com variação do número de carbonos de C4 a C24 (Tabela 4). Os ingredientes foram coletados em todas as preparações das dietas ainda na fábrica de ração durante cada período experimental para a realização *pool* e posterior análise.

Os animais alimentados com as dietas contendo fontes de gordura apresentaram maior consumo de ácidos graxos em relação à dieta controle (484,7 vs 928,15; 869,29; 867,73 g/dia respectivamente para dietas C, OS, GS e SCAG) ( $P < 0,001$ ; Tabela 17). O mesmo resultado foi observado para os consumos de C18:0, C16, C18:1 *cis*, C18:2 e C18:3. De acordo com ALLEN (2000) a correlação entre a concentração total de ácidos graxos e o teor de extrato etéreo gira em torno de 87%. Este número justifica o resultado de maior consumo de AG para as dietas com fontes de gordura, pois estas apresentaram teores de extrato etéreo em torno de 40% maior em relação à dieta controle. Além do mais não houve diferença no CMS entre as dietas experimentais, e como o consumo de AG representa uma combinação entre o CMS e o teor de AG da dieta, essa combinação de resultados representou aumento do consumo de AG para as dietas com fontes de gordura (Tabela 17) (HAVARTINE e ALLEN, 2006c).

Entre as fontes de gordura, as vacas que foram alimentadas com a dieta contendo óleo de soja apresentaram maior consumo de AG em relação às dietas com grão de soja e sais de cálcio (928,15 vs 869,29 e 867,73 g/dia) ( $P < 0,049$ ; Tabela 17). Esse resultado pode ser atribuído ao maior teor de extrato etéreo numérico para a dieta óleo de soja (5,91%) em relação às demais dietas com fontes de gordura grão de soja (5,75%) e sais de cálcio (5,52%), com uma diferença de 4,6% da dieta com óleo de soja em relação às dietas grão de soja e SCAG. Assim, pode ter ocorrido seletividade dos animais quando alimentados com as dietas contendo grão de soja e SCAG favorecendo maior quantidade de concentrado nas sobras contendo essas fontes de gordura. De

forma geral a dieta contendo óleo soja tem maior aceitabilidade entre as fontes de gordura.

Tabela 17- Consumo, fluxo abomasal, e composição de ácidos graxos no abomaso

|                     | Dietas experimentais <sup>1</sup> |        |        |        | EPM   | Valor de P |       |       |
|---------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|-------|------------|-------|-------|
|                     | C                                 | OS     | GS     | SCAG   |       | C1         | C2    | C3    |
| Consumo             | g/dia                             |        |        |        |       |            |       |       |
| Total AG            | 484,97                            | 928,15 | 869,29 | 867,73 | 36,98 | <0,001     | 0,049 | 0,893 |
| 16:0                | 54,13                             | 116,25 | 102,64 | 113,19 | 5,42  | <0,001     | 0,079 | 0,049 |
| 18:0                | 9,68                              | 20,15  | 16,53  | 20,66  | 1,09  | <0,001     | 0,334 | 0,035 |
| 18:1 cis            | 30,07                             | 59,77  | 55,16  | 54,67  | 3,26  | <0,001     | 0,158 | 0,904 |
| 18:2                | 105,53                            | 255,58 | 233,23 | 233,82 | 12,26 | <0,001     | 0,044 | 0,961 |
| 18:3                | 9,48                              | 21,80  | 20,30  | 19,65  | 1,02  | <0,001     | 0,087 | 0,588 |
| Fluxo abomasal      | g/dia                             |        |        |        |       |            |       |       |
| Total AG            | 445,04                            | 910,31 | 850,25 | 828,74 | 38,35 | <0,001     | 0,035 | 0,556 |
| 16:0                | 62,58                             | 143,10 | 128,08 | 127,74 | 6,28  | <0,001     | 0,062 | 0,734 |
| 18:0                | 286,88                            | 584,29 | 568,96 | 495,84 | 28,56 | <0,001     | 0,240 | 0,156 |
| 18:1 trans          | 36,71                             | 70,95  | 62,81  | 79,09  | 5,30  | 0,004      | 0,999 | 0,220 |
| 18:1 cis            | 7,68                              | 18,21  | 12,32  | 11,84  | 1,65  | 0,156      | 0,200 | 0,930 |
| 18:2                | 19,61                             | 42,40  | 35,02  | 38,43  | 5,59  | 0,053      | 0,564 | 0,765 |
| 18:3                | 1,83                              | 4,20   | 3,95   | 5,60   | 0,59  | 0,062      | 0,699 | 0,342 |
| Composição abomasal | g/100g de AG                      |        |        |        |       |            |       |       |
| 16:0                | 15,52                             | 15,71  | 15,19  | 14,92  | 0,28  | 0,763      | 0,444 | 0,783 |
| 18:0                | 64,96                             | 63,90  | 66,61  | 59,66  | 1,58  | 0,695      | 0,855 | 0,167 |
| 18:1 trans          | 7,97                              | 7,80   | 7,37   | 9,60   | 0,54  | 0,834      | 0,641 | 0,198 |
| 18:1 cis            | 1,60                              | 2,02   | 1,49   | 1,41   | 0,20  | 0,937      | 0,355 | 0,908 |
| 18:2                | 6,12                              | 6,76   | 5,76   | 6,87   | 0,65  | 0,844      | 0,809 | 0,602 |
| 18:3                | 0,417                             | 0,480  | 0,446  | 0,703  | 0,07  | 0,492      | 0,623 | 0,257 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®), C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio, <sup>2</sup> Erro padrão da média,

De forma coerente aos dados de consumo de AG foi observado o mesmo comportamento nos resultados de fluxo abomasal de AG (Tabela 17). Os animais submetidos às dietas contendo fontes de gordura apresentaram maior fluxo de AG em relação a dieta controle ( $P < 0,001$ ). Além do mais, as vacas alimentadas com a dieta contendo óleo de soja apresentaram maior fluxo de AG em relação às dietas com grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos ( $P < 0,035$ ; Tabela 17).

Grandes perdas ruminais de AG não são consideradas quando se analisa a biohidrogenação como modelo de taxa de passagem. No entanto, em 15 de 47 estudos de digestão foram observadas perdas médias de AG de 8% do total consumido (JENKINS, 2007; DOREAU, 2011). Neste estudo as perdas de AG do consumo para o abomaso para a dieta controle foram de 8,2% e para as dietas com fontes de ácidos graxos de 1,5% de perdas. HAVARTINE e ALLEN (2006c) verificaram perdas de 5% para a dieta controle e cerca de 8% para dietas com fontes de ácidos graxos insaturados. De acordo com GLASSER et al., (2008) as perdas de AG também podem ser consideradas com erros de metodologias devido a presença de alguns ácidos graxos não identificados nas análises.

O aumento das concentrações dos ácidos graxos C18:1 cis e C18:1 trans-11 no abomaso indicam de acordo com CHILLIARD et al., (2007) qual a rota do processo de biohidrogenação a qual a dieta foi submetida. Quando aumentaram as concentrações de C18:1 trans-11 (vacênico) no abomaso e respectivamente no leite existe a indicação de que o processo de biohidrogenação ocorreu em sua maioria pela principal rota (Figura 2) a qual gera como principal ácido graxo o ácido linoléico conjugado (ALC) C18:2 cis-9, trans-11. Quando ocorre desvio da rota do processo de biohidrogenação pela segunda rota proposta por CHILLIARD et al, (2007) há maior produção principalmente do ácido graxo do ácido graxo C18:1 cis-11 e do CLA C18:2 *trans*-10 *cis*-12.

As quantidades dos ácidos graxos presentes no rúmen podem ser observadas na Tabela 18. De forma coerente ao consumo de ácidos graxos, as quantidades de C18:2 ( $P < 0,029$ ) e C18:3 ( $P < 0,039$ ) no rúmen foram maiores para as dietas com fontes de gordura em relação a dieta controle (Tabela 18). As concentrações de CLA C18:2 cis-9, trans-11 para os animais alimentados com a dieta contendo grão de soja, foi superior em 18,3% em relação a dieta contendo óleo de soja, e cerca de 30,98% superior as quantidades nos animais alimentados com a dieta saís de cálcio. Já as concentrações de CLA C18:2 *trans*-10 *cis*-12 no rúmen dos animais alimentados com a dieta contendo óleo de soja foi 65,9% maior em relação as vacas alimentadas com as dietas contendo grão de soja e 47,72% em relação a dieta SCAG. Esses resultados demonstram que o

fornecimento de fontes de ácidos graxos não complexados no rúmen como óleos favorecem a segunda rota da biohidrogenação a qual produz como principais intermediários os ácidos graxos CLA C18:2 *trans*-10 *cis*-12 e C18:1 *trans*-11 (vacênico).

A biohidrogenação pode ocorrer de forma completa e incompleta. A avaliação deste processo no que diz respeito se este foi realizado de forma completa ou incompleta pode ser determinado, pelas concentrações de ácido esteárico C18:0 sendo este o produto final do processo ruminal de biohidrogenação (CHILLIARD et al., 2007). Ambas as dietas contendo óleo de soja e grão de soja apresentaram numericamente maiores concentrações de C18:0 em relação as dietas controle e sais de cálcio de ácidos graxos (Tabela 18). No entanto a dieta com grão de soja proporcionou aumento de 4,91% e 2,43% para as quantidades de C18:3 e C18:2 respectivamente quando comparada a dieta com sais de cálcio (Tabela 18).

Tabela 18- Quantidades de ácidos graxos no rumen

| Item                                  | Dietas experimentais <sup>1</sup> |        |        |        | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |       |       |
|---------------------------------------|-----------------------------------|--------|--------|--------|------------------|------------|-------|-------|
|                                       | C                                 | OS     | GS     | SCAG   |                  | C1         | C2    | C3    |
| Ruminal pool                          | g                                 |        |        |        |                  |            |       |       |
| Total AG                              | 661,87                            | 660,18 | 702,18 | 619,18 | 34,58            | 0,979      | 0,988 | 0,162 |
| 16:0                                  | 122,54                            | 107,05 | 115,31 | 94,67  | 6,43             | 0,154      | 0,866 | 0,155 |
| 18:0                                  | 333,73                            | 354,44 | 364,99 | 319,21 | 20,60            | 0,718      | 0,736 | 0,286 |
| 18:1 <i>trans</i> -11                 | 22,00                             | 16,57  | 13,84  | 16,64  | 1,91             | 0,164      | 0,777 | 0,606 |
| 18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11  | 0,64                              | 0,58   | 0,71   | 0,49   | 0,08             | 0,783      | 0,937 | 0,296 |
| 18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 | 0,34                              | 0,88   | 0,30   | 0,46   | 0,13             | 0,422      | 0,081 | 0,602 |
| 18:1 <i>cis</i>                       | 68,61                             | 61,75  | 67,98  | 63,42  | 3,44             | 0,495      | 0,548 | 0,547 |
| 18:2                                  | 27,08                             | 46,93  | 56,79  | 55,41  | 4,91             | 0,029      | 0,439 | 0,919 |
| 18:3                                  | 2,44                              | 4,05   | 5,29   | 5,03   | 0,50             | 0,039      | 0,333 | 0,841 |
| Taxa de renovação %/h                 |                                   |        |        |        |                  |            |       |       |
| Total AG                              | 11,27                             | 5,68   | 6,26   | 6,47   | 0,40             | <0,001     | 0,245 | 0,755 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®), C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio, <sup>2</sup>Erro padrão da media,

A biohidrogenação é tradicionalmente definida como a proporção de ácidos graxos insaturados ou de ligação duplas que são desaparecidos no rúmen (TICE et al., 1994; WU et al., 1991; DOREAU, 2011). As técnicas usadas para determinar a

biohidrogenação ruminal podem ser realizadas mais facilmente em sistemas de incubação *in vitro* (HARFOOT et al., 1997; BEAM et al., 2000). No entanto, a aplicação é limitada em condições *in vivo* (HAVARTINE e ALLEN, 2000d).

Os métodos para modelagem de digestão de carboidratos podem ser aplicados ao metabolismo de ácidos graxos (ALLEN e MERTENS, 1988). A determinação do tamanho do *pool* de ácidos graxos no rúmen, e o fluxo de AG permitem o cálculo da taxa de passagem e possibilita a determinação da taxa fracional de biohidrogenação com o pressuposto de que não há oxidação e absorção já que estas são consideradas mínimas. O modelo também permite calcular a extensão da biohidrogenação individual de cada ácido graxo pelo desaparecimento que leva em consideração a taxa de passagem e biohidrogenação fracional.

No caso deste estudo, foram avaliados dois modelos de biohidrogenação: (1) o Modelo A leva em consideração a dinâmica ruminal que consiste no modelo que leva em consideração a dinâmica ruminal, apresentado acima (Tabela 19); (2), o Modelo B leva em consideração somente a taxa de desaparecimento entre o consumido e o fluxo dos ácidos graxos apresentados no abomaso ou duodeno (JENKINS e DOREAU, 2007). Este último pode ser considerado mais simples e com menos variáveis a serem levadas em consideração para estimativa da biohidrogenação. É preciso enfatizar que ambos os modelos levam em consideração estimativas e são difíceis de serem determinados *in vivo*.

As diferenças na taxa de passagem fracional de AG no rúmen estão relacionadas aos diferentes *pools* de ácidos graxos associados com as frações dos alimentos da dieta (ALLEN, 2000). Não houve diferença para a taxa fracional de passagem (%/h) sobre o total de AG, e para o total de AG e para os AG C16:0, C18:0, C18:1 cis, e C18:3 (Tabela 19). No entanto, as dietas contendo fontes de gordura proporcionaram menor taxa de passagem do ácido linoléico (C18:2) pelo rúmen em relação à dieta controle ( $P < 0,023$ ) (HAVARTINE e ALLEN, 2006a). Esse resultado pode ser atribuído de acordo com ALLEN, (2000) a disposição dos ácidos graxos, e em que tipo de partícula este AG está ligado no rúmen. Segundo este autor o fornecimento de AG na forma de pequenas partículas, como farelo de soja, milho permite maior passagem pelo



rúmen maior fluxo. Por outro lado, AG associados a sementes de oleaginosas são mais retidos na fibra impedindo sua passagem. Além do mais ocorreu menor quantidade consumida deste ácido graxo para a dieta controle como observado na Tabela 17, favorecendo o maior desaparecimento em relação às dietas com fontes de gordura e consequentemente a maior taxa passagem. Esse comportamento foi observado nas taxas de desaparecimento para as quantidades do total de AG, C18:2 e C18:3 para as dietas com fontes de gordura (Tabela 19).

Não houve diferença para a taxa de biohidrogenação do C18:1 entre as dietas experimentais quando se observa o modelo A (Tabela 19;  $P > 0,05$ ).

A biohidrogenação do C18:1 é tradicionalmente reconhecida e pode ocorrer de forma direta sem formação de intermediários (HARFOOT et al., 1997). No entanto, quando ocorre aumento do aproveitamento de C18:1 normalmente há aumento das concentrações de C18:1 trans-11 na digesta ruminal, no fluxo intestinal e no leite (ABUGHAZALEH et al., 2003; KALSCHEUR et al., 1997). Esse resultado apesar de não significativo ocorreu neste estudo, pois, a dieta controle proporcionou maior quantidade de C18:1 trans-11 na digesta ruminal de (22,0 g controle vs 16,57; 13,84; 16,64 para as dietas OS; GS e SCAG respectivamente).

Quando se analisa o contraste dois, os animais alimentados com a dieta contendo óleo de soja, apresentaram maior taxa de biohidrogenação do ácido linoléico (C18:2;  $P < 0,045$ ), e uma tendência para redução da BHB do ácido linolênico (C18:3;  $P < 0,059$ ) quando comparada aos animais que receberam as dietas contendo grão de soja e sais de cálcio pelo modelo A. Esse resultado pode ser comprovado pela taxa de desaparecimento dos ácidos graxos no rúmen. Apesar de não significativo a dieta contendo óleo de soja apresentou uma taxa de desaparecimento 36,02, e 30,63 (%/h) quando comparada a dietas contendo grão de soja e sais de cálcio, para o ácido linolênico e 3,8%/h e 12,82%/h para o ácido linoléico respectivamente (Tabela 19). LOOR et al., (2004) avaliaram a inclusão de óleo de soja em dietas de vacas canuladas no rúmen e duodeno e verificaram aumento de 9,9% na taxa de biohidrogenação do ácido linolênico quando se forneceu na dieta com alto concentrado e 3% de inclusão de



óleo de linhaça na dieta dos animais em relação aos animais alimentados com dieta com baixo concentrado sem inclusão de óleo.

Tabela 19 – Dinâmica e biohidrogenação dos ácidos graxos

| Item                        | Dietas experimentais <sup>1</sup> |       |       |       | EPM <sup>2</sup> | Valor de P |       |       |
|-----------------------------|-----------------------------------|-------|-------|-------|------------------|------------|-------|-------|
|                             | C                                 | OS    | GS    | SCAG  |                  | C1         | C2    | C3    |
| Taxa de Passagem (Kp) %/h   |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Total AG                    | 9,07                              | 8,72  | 8,25  | 9,06  | 0,55             | 0,641      | 0,941 | 0,435 |
| 16:0                        | 7,73                              | 8,51  | 7,43  | 9,18  | 0,60             | 0,554      | 0,855 | 0,196 |
| 18:0                        | 11,92                             | 10,00 | 11,07 | 10,05 | 0,66             | 0,128      | 0,593 | 0,401 |
| 18:1-cis                    | 6,59                              | 7,85  | 6,25  | 8,21  | 0,86             | 0,629      | 0,735 | 0,361 |
| 18:2                        | 11,41                             | 5,74  | 6,85  | 8,18  | 0,89             | 0,023      | 0,366 | 0,555 |
| 18:3                        | 9,63                              | 5,13  | 6,49  | 10,35 | 1,02             | 0,314      | 0,180 | 0,174 |
| Taxa de desaparecimento %/h |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| Total AG                    | 1,96                              | 0,97  | 1,00  | 1,04  | 0,10             | <0,001     | 0,761 | 0,818 |
| 18:2                        | 0,67                              | 0,78  | 0,75  | 0,68  | 0,09             | 0,638      | 0,386 | 0,978 |
| 18:3                        | 0,35                              | 2,97  | 1,90  | 2,06  | 0,02             | 0,387      | 0,109 | 0,814 |
| Taxa de Biohidrogenação %   |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
|                             | % consumido                       |       |       |       |                  |            |       |       |
| Modelo A <sup>3</sup>       |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| 18:1                        | 67,12                             | 66,36 | 68,06 | 70,00 | 1,08             | 0,665      | 0,289 | 0,501 |
| 18:2                        | 91,91                             | 93,71 | 86,35 | 82,34 | 1,76             | 0,291      | 0,045 | 0,433 |
| 18:3                        | 76,31                             | 93,18 | 76,49 | 70,36 | 3,93             | 0,693      | 0,059 | 0,595 |
| Modelo B <sup>4</sup>       |                                   |       |       |       |                  |            |       |       |
| 18:1                        | 72,01                             | 88,84 | 84,14 | 85,99 | 2,71             | 0,020      | 0,557 | 0,801 |
| 18:2                        | 68,34                             | 89,94 | 86,92 | 82,61 | 2,15             | 0,003      | 0,234 | 0,385 |
| 18:3                        | 74,66                             | 93,20 | 88,45 | 77,65 | 2,48             | 0,041      | 0,091 | 0,116 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®), C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio, <sup>2</sup>Erro padrão da média; <sup>3</sup>Modelo utilizado (Havertine e Allen, 2006d); <sup>4</sup>Modelo utilizado segundo (Jenkins e Doreau, 2007).

A média da taxa de biohidrogenação para o ácido linoléico (C18:2) no modelo A foi de 88,58% e para modelo B 81,95% para todas as dietas. A média da taxa de biohidrogenação para o C18:3 deste estudo foi de 79,09 % para o modelo A e 83,49% para o modelo B (Tabela 19). HAVERTINE e ALLEN (2006c) avaliaram a biohidrogenação e o fluxo intestinal de ácidos graxos com 4 dietas sendo uma dieta controle e 3 dietas com fontes de gordura uma composta de ácido graxos saturados, a segunda com ácidos graxos insaturados, e a terceira com a mistura das duas fontes. Foram utilizadas neste estudo 8 vacas Holandesas canuladas no rúmen e duodeno com

produção média de leite de 40 kg/dia e um consumo média de matéria seca de 25kg/vaca/dia. Estes autores verificaram que os animais que consumiram a dieta com fonte de gordura insaturada (57,5% de sais de cálcio de ácidos graxos insaturados) apresentaram taxa média de biohidrogenação para ácido C18:2 de 86,1% semelhante ao observado neste estudo (88,58%), utilizando o modelo A.

As dietas com fontes de gordura apresentaram maior taxa de biohidrogenação quando comparada a dieta controle para o ácido linolênico ( $P < 0,041$ ; Tabela 19). O modelo B proporcionou tendência ( $P < 0,09$ ) para redução da biohidrogenação do ácido linolênico para as dietas com grão de soja e sais de cálcio quando comparada à dieta com óleo de soja. Os lipídios da dieta contendo grão de soja e sais de cálcio foram cerca de 16,68% e 5,09% menos biohidrogenados em relação aos da dieta com óleo de soja (Tabela 19).

Desde que ocorreram os primeiros estudos sobre o processo de biohidrogenação na década de 90 os pesquisadores já haviam determinado alguns fatores que ainda não mudaram sobre o comportamento de certas formas de ácidos graxos nas dietas de ruminantes. No entanto, as mudanças das formas industriais de preparação de produtos comerciais, e as diferenças particulares para cada fonte de ácido graxo testada nos estudos com animais, podem alterar tais premissas. SUKHIJA e PALMQUIST, (1990) enfatizaram que para que ocorresse a biohidrogenação dos ácidos graxos ligados ao sais de cálcio, deveria ocorrer primeiro a dissociação do cálcio e dos ácidos graxos e isto aconteceria em valores de pH baixos no rumen, especialmente quando quando é fornecido sais de cálcio de ácidos graxos insaturados. WU et al. (1991) observaram uma taxa de biohidrogenação de 49% para dietas com sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma quando comparada a uma taxa de 80% de biohidrogenação para as dietas contendo fontes de ácidos graxos de óleos de gordura vegetal.

LUNDY et al. (2003) avaliaram a inclusão de ácidos graxos de óleo de soja em quantidades iguais nas dietas de vacas Holandesas canuladas no rumen em três formas: óleo de soja sem proteção; na forma de sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de soja; e como amida. A taxa de desaparecimento para o ácido linoléico foi de 94,8, 92,2, e 92,4% para a dieta com óleo de soja, sais de cálcio e amida, respectivamente.

Estes observaram quantidades de 5,0 a 6,0 g/dia de ácido linolênico, e 25 a 39g/dia de ácido linoléico chegando ao omaso sendo estes resultados semelhantes aos observados neste estudo.

De acordo com JENKINS et al., (2007) em estudo de metanálise de experimentos que avaliaram a BHB *in vivo*, a média das perdas de ácidos graxos insaturados por unidade de ácido graxo consumido depois de ajustado os estudos como sendo aleatórios foi de 86,5% com desvio padrão (DP) de 1,5% para o ácido oléico, 81,7% com DP de  $\pm 1,9\%$  para o ácido linoléico, e 86,0% com DP de  $\pm 2,8\%$  para o ácido linolênico. A média observada para o desaparecimento do ácido linolênico neste estudo foi de 83,49 % pelo modelo B mais usado na literatura.

Na tabela 20 são apresentadas as perdas relativas aos três principais ácidos graxos analisados sobre o processo de biohidrogenação. Não houve efeito das dietas experimentais sobre as perdas de C18:1, C18:2, C18:3 (Tabela 20;  $P>0,05$ ).

Tabela 20- Perdas de ácidos graxos a partir do consumo e do fluxo abomasal

| Item            | Dietas experimentais |        |        |        |       | Valor de P |       |       |
|-----------------|----------------------|--------|--------|--------|-------|------------|-------|-------|
|                 | C                    | OS     | GS     | SCAG   | EPM   | C1         | C2    | C3    |
| 18:1 cis        |                      |        |        |        |       |            |       |       |
| Consumo (g/dia) | 30,07                | 59,77  | 55,16  | 54,67  | 3,26  | <0,001     | 0,158 | 0,904 |
| Abomaso (g/dia) | 7,68                 | 18,21  | 12,32  | 11,84  | 1,65  | 0,156      | 0,200 | 0,930 |
| Perdas (%)      | 76,38                | 67,97  | 76,55  | 77,88  | 2,71  | 0,320      | 0,381 | 0,925 |
| 18:2            |                      |        |        |        |       |            |       |       |
| Consumo (g/dia) | 105,53               | 255,58 | 233,23 | 233,82 | 12,26 | <0,001     | 0,044 | 0,961 |
| Abomaso (g/dia) | 28,02                | 60,58  | 50,03  | 54,90  | 5,59  | 0,053      | 0,564 | 0,765 |
| Perdas (%)      | 74,05                | 75,86  | 78,95  | 74,93  | 2,41  | 0,693      | 0,873 | 0,608 |
| 18:3            |                      |        |        |        |       |            |       |       |
| Consumo (g/dia) | 9,48                 | 21,80  | 20,30  | 19,65  | 1,02  | <0,001     | 0,087 | 0,588 |
| Abomaso (g/dia) | 1,83                 | 4,20   | 3,95   | 5,60   | 0,59  | 0,590      | 0,062 | 0,699 |
| Perdas (%)      | 79,77                | 80,01  | 81,18  | 69,53  | 3,10  | 0,728      | 0,595 | 0,256 |

<sup>1</sup>Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SCAG), (Megalac-E®), C1= controle versus fontes de gordura (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja versus sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja versus sais de cálcio, <sup>2</sup> Erro padrão da média,

Experimentos que tem como objetivo a avaliação de fluxo intestinal e biohidrogenação *in vivo* são extremamente difíceis de serem realizados especialmente com vacas em lactação. Apesar de não ter ocorrido efeito estatístico entre as fontes de gordura em alguns parâmetros de biohidrogenação ruminal, a medida de dispersão obtida para os dados e usada nesta análise, no caso o erro padrão da média, se apresentou em todas as variáveis com valores iguais ou menores aos observados na literatura quando se utiliza dois quadrados latinos com um total de 32 observações. Assim, é válida a avaliação dos dados de forma quantitativa com o intuito de aprofundar as análises e permitir uma avaliação fisiológica mais próxima da realidade.

## **5. CONCLUSÕES**

A utilização de grão de soja cru integral e sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, reduz a taxa de biohidrogenação ruminal e aumenta o fluxo dos ácidos graxos linoléico e linolênico no abomaso de vacas leiteiras em lactação, em relação ao óleo de soja, sem alterar os parâmetros envolvidos no processo digestório e no metabolismo ruminal de ácidos graxos.

Entre as fontes de gordura utilizadas neste estudo, por se tratar de um produto não beneficiado, o grão de soja se desdobra como opção bastante interessante do ponto de vista fisiológico e prático. O porquê consiste de fonte de ácido graxo entre as fontes avaliadas que possui proteção semelhante aos produtos contendo sais de cálcio de ácidos graxos insaturados permitindo seu uso em dietas de vacas leiteiras.

## **6. IMPLICAÇÕES**

Verifica-se que os resultados da utilização de fontes de gordura em dietas de vacas leiteiras canuladas no rúmen e abomaso no terço inicial de lactação, pode influenciar de forma reduzida o metabolismo digestivo dos animais, incluindo potenciais efeitos sobre a fermentação ruminal. No entanto, os resultados de fluxo e biohidrogenação dos ácidos linoléico e linolênico, permitem concluir que o grão de soja

assim como o suplemento formado de sais de cálcio de ácidos graxos insaturados, promovem maior proteção destes ácidos graxos até a absorção no intestino em relação ao óleo de soja.

Assim, é importante considerar que os resultados obtidos são válidos para a fase do ciclo produtivo, nível de produção e tipo de volumoso utilizado nas dietas dos animais que compuseram este experimento principalmente do ponto de vista econômico. Isso pode ser justificado devido ao baixo custo do grão de soja integral quando comparada ao óleo de soja e ao produto comercial. Também, é importante salientar que a investigação de cunho científico possibilita a tomada de decisão e aplicação prática dos resultados com relação às concentrações dos suplementos nas dietas a serem utilizadas para este tipo de animal.

Portanto este estudo baseia-se não só na fisiologia, mas também no aspecto econômico para que haja recomendação das fontes de gordura em dietas de vacas leiteiras em fazendas visando aumento da rentabilidade do sistema de produção.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABUGHAZALEH A.A.; SCHINGOETHE D.J.; HIPPEN A.R. et al. Milk conjugated linoleic acid response to fish oil supplementation of diets differing in fatty acid profiles. **Journal of Dairy Science**. 86, 944–953, 2003.
- ALLEN M. S.; MERTENS D. R. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. **Journal Nutrition**. 118, 261–270, 1988.
- ALLEN, M. S. Effects of Diet on Short-Term Regulation of Feed Intake by Lactating Dairy Cattle, **Journal of Dairy Science**, v.83, n. 7, p. 1598-1630, 2000.
- ALLEN, M. S. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. **Journal Animal Science**, 74, P.3063–3075. 1996.
- ANDERSEN, J, B.; RIDDER, C.; LARSEN, T, Priming the cow for mobilization in the periparturient period: effects of supplementing the dry cow with saturated fat or linseed, **Journal of Dairy Science**, v, 91, p, 1029-1043, 2008.
- BALCELLS, J.; MARTÍN-ORÚE, S. S.; GUADA, J. A. et al, Microbial nitrogen production in growing heifers: direct measurement of duodenal flow of purine bases

versus urinary excretion of purine derivatives as estimation procedures, **Animal Feed Science and Technology**, V,88, P,171-188, 2001.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M, Nutrition regulation of milk fat synthesis, **Annual Rev, Nutrition**, v,23, p203-227, 2003.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome, **Livestock Production Science**, v.70, p.15–29, 2001.

BEAM T. M.; JENKINS, T.C.; MOATE P.J. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. **Journal of Dairy Science**.83, 2564–2573, 2000.

BIGGS, H. G.; COOPER, J. M. An evaluation of four methods of measuring urinary creatinine, **Clinical Chemistry**, v.7, p. 665-673, 1961.

BLIGH, E. G.; W. J. DYER, A rapid method for total lipid extraction and purification, **Canadian Journal Biochemical, Physiology**, 37, p.911– 917, 1959.

BREMMER, D. R.; RUPPERT, L. D.; CLARK, J. H. Effects of chain length and instauration of fatty acid mixtures infused into the abomasum of lactating dairy cows, **Journal of Dairy Science**, v.81, p. 176-188, 1998.

BYERS, F.M.; SCHELLING, G.T. **Los lipidos en la nutricion de los rumientes**, In: CHURCH, C, D, (Ed), **El ruminante: fisiologia digestiva y nutrición**, Zaragoza: Acribia, p,339-356. 1993.

CHEN, G.; RUSSELL, J. B. More monensin-sensitive, ammonia producing bacteria from the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1052-1057, 1989.

CHEN, X.B.; GOMES, M.J. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - an overview of technical details, (Occasional publication) **INTERNATIONAL FEED RESEARCH UNIT**, Bucksburnd, Aberdeen:Rowett Research Institute, 21p. 1992.

CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A. et al, Dieta, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat, **Europe Journal Science Technology**, v.109, p. 828-825, 2007.

CHIZZOTTI, M. L. **Avaliação da casca de algodão para novilhos de origem leiteira e determinação da excreção de creatinina e produção de proteína microbiana em novilhas e vacas**, 2004, 132 p. Dissertação (mestrado em zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

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

COELHO, D.T.; ROCHA, J.A.A. **Práticas de processamento de produtos animais**, VIÇOSA: UFV, 79P, 1977.

COSTA, M. G. **Desempenho, perfil de ácidos graxos do leite e dinâmica de nutrientes de vacas leiteiras submetidas a diferentes fontes lipídicas**, 2008, 91p, Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

D'ANGELO, et al., **Fontes de gordura na limentaca de vacas leiteiras no period de transição e início de lactação**, Dissertação de Mestrado (USP) 2009.

DOREAU M.; FERLAY A; ELMEDDAH Y. Organic matter and nitrogen digestion by dairy cows fed calcium salts of rapeseed oil fatty acids or rapeseed oil, **Journal Animal Science**, v.71, p.499-504, 1993.

DOREAU, **Biohidrogenação Ruminal de Acidos Graxos**, IN: SIMPOSIO INTERNACIONAL AVANCOS EM TECNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, **P 46-58**, 2011

DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals, **British Journal of Nutrition**, v. 78, p.15-35, 1997.

DOREAU, M.; Y, CHILLIARD, Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals, **Journal Nutrition**, V.78, p.15–35, 1997.

DRACKLEY, J. K.; KLUSMEYER, T. H.; TRUSK, A. M. et al. Infusion of Long-chain Fatty Acids Varying in Saturation and Chain Length into the Abomasum of Lactating Dairy Cows, **Journal of Dairy Science**, v.75, p. 1517-1526, 1992.

EDMONSON, A.J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D. et al. body condition scoring chart for Holstein dairy cows, **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 1, p, 68-78, 1989.

ELLIOTT, J. P.; DRACKLEY, J. K.; SCHAUFF, D. J. et al. Diets containing high oil corn and tallow for dairy cows during early lactation, **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 775-789, 1993.

ERWIN E.S.; MARCO G. J.; EMERY E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography, **Journal of Dairy Science**, 44, 1768-1771, 1961.

FENG, S.; LOCK, A. L.; GARNSWORTHY, P. C. Technical note: A rapid lipid separation, **Journal of Dairy Science** , 2004.



FERLAY A.; CHABROT J.; ELMEDDAH Y. et al. Ruminant lipid balance and intestinal digestion by dairy cows fed calcium salts of rapeseed oil fatty acids or rapeseed oil. **Journal Animal Science**. 71, 2237–2245, 1993.

FIRKINS JL, ALLEN MS, OLDICK BS, ST-PIERRE NR, Modeling ruminal digestibility of carbohydrates and microbial protein flow to the duodenum, **Journal of Dairy Science**, 81, 3350–3369, 1998.

FIRKINS, J. L; M. L. EASTRIDGE, Assessment of the effects of iodine value on fatty acid digestibility, feed intake, and Milk production, **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2357–2366, 1994.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, **Journal of Biological Chemistry**, v,226, p,497–509, 1957.

FREITAS JUNIOR, J. E.; RENNO, F. P.; SANTOS, M. V. et al, Productive performance and composition of milk protein fraction in dairy cows supplemented with fat sources, **Revista Brasileira Zootecnia**, v.39, n.4, p. 845-852, 2010.

FUENTES, C.; CALSAMIGLIA, S. CARDOZO, W. et al, Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture, **Journal of Dairy Science**, v, 92, p, 4456–4466, 2009.

FUJIHARA, T., ØRSKOV, E.R. AND REEDS, P.J. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal. Agriculture Science**., CAMB., 109:7-12, 1987.

GARY, F.; LARRY, D. S. Determination of rumen fill, retention time and ruminal turnover rates of ingesta at different stages of lactation in dairy cows, **Journal of Animal Science**, v.48, p 381-392, 1979.

GLASSER, F.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. Oilseed Lipid Supplements and Fatty Acid Composition of Cow Milk: A Meta-Analysis, **Journal of Dairy Science**. V.91, p. 4687-4703, 2008.

GOZHO, G. N.; MUTSVANGWA, T. Influence of carbohydrate source on ruminal fermentation characteristics, performance, and microbial protein synthesis in dairy cows, **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 2726-2735, 2008.

GRUMMER, R. R.; D. J. CARROLL, Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle, **Journal of Animal Science**, v, 69, p.3838–3852, 1991.



HALL, M, B, Making nutritional sense of nonstructural carbohydrate, In: ANNUAL FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 9,, 1998, Gainesville, FL, **Proceedings...** Gainesville: Florida University Press, 1998, p.108-121.

HARA, A.; N. S. RADIN, Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent, **Anal, Biochem**, 90, 420–426, 1978.

HARFOOT C.G.; HAZLEWOOD G.P. **Lipid metabolism in the rumen**. In: Hobson PN, Stewart CS, editors. The rumen microbial ecosystem. 2nd ed. London (UK): Blackie Academic & Professional. p. 382–426, 1997.

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of Fatty Acid Supplements on Feed Intake, and Feeding and Chewing Behavior of Lactating Dairy Cows, **Journal of Dairy Science**, v, 89, p,1104–1112, 2006b,

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of Fatty Acid Supplements on Ruminal and Total Tract Nutrient Digestion in Lactating Dairy Cows, **Journal of Dairy Science**, v, 89, p.1092–1103, 2006c.

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of Fatty Acid Supplements on Milk Yield and Energy Balance of Lactating Dairy Cows, **Journal of Dairy Science**, v, 89, p,1081–1091, 2006a.

HAVERTINE, K.; ALLEN, M. S. Fat Supplements Affect Fractional Rates of Ruminal Fatty Acid Biohydrogenation and Passage in Dairy Cows, **Journal Nutrition**. V. 136, p. 677–685, 2006d.

HIPPEN, A, R., J, W, YOUNG, AND D, C, BEITZ, Influence of saturation of dietary fat supplements on production and composition of milk from dairy cows, MS **Thesis, Iowa State Univ**,. Ames, 1996.

HOEDEMAKER, M. et al. Peripartal propylene glycol supplementation and metabolism, animal health, fertility, and production in dairy cows, **Journal of Dairy Science**, V,87, 2136-2145, 2004.

HUANG, Y.; SCHOONMAKER, J. P.; BRADFORD, B. J. et al. Response of Milk Fatty Acid Composition to Dietary Supplementation of Soy Oil, Conjugated Linoleic Acid, or Both, **Journal of Dairy Science**, V, 91, p. 260–270, 2008.

HYDEN, S. A. A turbidimetric method for the determination of higher polyethylene glycol in biological material, **KGL Lantbruks-hogskol Annales Uppsala**, v. 22, p,139-145, 1956.

JENKINS T.C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**. 76:3851–63, 1993.

- JENKINS, T. C.; BRIDGES W. C. Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle, **Europe Journal Lipid Science technology**, v 109, p,778-789, 2007.
- JOUANY, J. P.; DEMEYER, D. I.; GRAIN, J. Effect of defaunating the rumen, **Anim, Feed Sci, Technol**, v. 21, p. 229-265, 1988.
- KALSCHEUR K.F.; TETER B.B.; PIPEROVA L.S. Effect of fat source on duodenal flow of trans-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**.80, 2115–2126, 1997.
- KANEKO, J. J.; HARVERY, J. W.; BRUSS, M. C. **Clinical biochemistry of domestic animals**, 5, ed, San Diego: Academic Press, 1997.
- KLUSMEYER, I. H.; LYNCH, G. L.; CLARK, J. H. et al. Effects of Calcium Salts of Fatty Acids and Protein Source on Ruminal Fermentation and Nutrient Flow to Duodenum of Cows, **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 2206-2219, 1991.
- KRAMER J.K.G.; FELLNER V. DUGAN, M.E.R. et al. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids** v.32, p.1219–1228, 1997.
- LEITE, L. C. **Perfil dos ácidos graxos do leite e metabolismo de lipídios no rúmen de vacas recebendo dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou de peixe**. 2006. 97 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.
- LOOR, J. J. UEDA, K. FERLAY, A. et al. Biohydrogenation, Duodenal Flow, and Intestinal Digestibility of Trans Fatty Acids and Conjugated Linoleic Acids in Response to Dietary Forage:Concentrate Ratio and Linseed Oil in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.2472-2485, 2004.
- LUNDY, F. P., E. BLOCK, W. C. BRIDGES, JR., J. Ruminal biohydrogenation in holstein cows fed soybean fatty acids as amides or calcium salts **Journal Dairy Science**. V.87, P.1038–1046, 2004.
- MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fibre in feeds with refluxing beakers or crucibles: collaborative study, **Journal of AOAC International**, v. 85, p. 1217-1240, 2002.
- MOALLEM, U.; KATZ, M.; ARIELI, A. et al. Effects of peripartum propylene glycol or fats differing in fatty acid profiles on feed intake, production, and plasma metabolites in dairy cows, **Journal of Dairy Science**, v.90, p. 3846-3856, 2007.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC 2001, **Nutrient requirements of dairy cattle**, 7 ed, Washinton, D,C,: National Academic Press, 381p.

NOCEK, J. E. In situ and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility, A review, **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2051-2069, 1988.

OBA, M.; ALLEN, M. S. Effects of corn grain conservation method on ruminal digestion kinetics for lactating dairy cows at two dietary starch concentrations, **Journal of Dairy Science**, v. 86, p.184–194, 2003.

OCKNER, R. K.; PITTMAN, J. P.; YAGER, J. L. Differences in the intestinal absorption of saturated and unsaturated long chain fatty acids, **Gastroenterology** v, 62, p. 981–992, 1972.

OLIVEIRA, A. S.; VALADARES, R. F. D.; FILHO, S. C. V. et al Produção de proteína microbiana e estimativas das excreções de derivados de purinas e de uréia em vacas lactantes alimentadas com rações isoprotéicas contendo diferentes níveis de compostos nitrogenados não-protéicos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1621-1629, 2001.

OLIVEIRA, N. J. F.; MELO, M. M.; LAGO, L. A. et al. Nascimento Hemograma, bioquímica sérica e histologia da biópsia hepática de bovinos após administração de polpa cítrica, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v, 57, n, 3, p, 418-422, 2005.

ORELLANA BOERO, P.; BALCELLS, J.; MARTÍN-ORÚE, S.M. et al, Excretion of purine derivates in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases, **Livestock production science**, v,68, p. 243-250, 2001.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de Lipídeos, In: BERCHIELI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S, G, (Eds,) **Nutrição de ruminantes**, Jaboticabal: Funep, p, 287-310. 2006.

PETERSON D. G.; ELVINA A.; BAUMAN D.E. et al. Diet-Induced Milk Fat Depression in Dairy Cows Results in Increased trans-10, cis-12 CLA in Milk Fat and Coordinate Suppression of mRNA Abundance for Mammary Enzymes Involved in Milk Fat Synthesis, **Journal of Nutrition** v,133, p.3098-3102, 2003.

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

RENNÓ, L. N. **Consumo, digestibilidade total e parcial, produção microbiana, parâmetros ruminais e excreções de uréia e creatinina em novilhos alimentados com dietas contendo quatro níveis de uréia ou dois de proteína**, 2003, 252 p, Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

SANTOS, F. L.; LANA, R. P.; SILVA, M.T. C. et al. Produção e composição do leite de vacas submetidas a dietas contendo diferentes níveis e formas de suplementação de lipídios, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n, 4, p. 1376-1380, 2001.

SAS, STATISTICAL ANALYSIS/STAT **User's Guide**, Release 8,0 Edition, Cary: SAS. 1999, 1500 p.

SCHAUFF, D. J.; ELLIOT, J. P.; CLARK, J. H. et al. Effects of feeding lactating dairy cows diets containing whole soybeans and tallow, **Journal of Dairy Science**, v, 75, p. 1923-1935, 1992.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de Alimentos** (Métodos químicos e biológicos), Viçosa: UFV, Impr, Univ., 2002, 235p.

SKLAN, D.; ASHKENAZI, R.; BRUN, A. et al. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids, and cottonseeds fed to high yielding cows, **Journal of Dairy Science**, v, 75, p. 2463-2472, 1992.

SNIFFEN, C.J.; O'CONNOR, J.D.; VAN SOEST, P.S. et, al, A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets, II, Carbohydrate and protein availability, **Journal of Animal Science**, v.70, n.11, p.3562-3577, 1992.

SPANGHERO, M. Z.; KOWALSKI, Z. M. Critical analysis of N balance experiments with lactating cows, **Livestock Production Science**, v. 52, p. 113-122, 1997.

SUKHIJA P.S.; PALMQUIST D.L. Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. **Journal of Dairy Science**. 73:1784–1794, 1990.

TICE E. M.; EASTRIDGE, M.L.; FIRKINS J.L. Raw soybeans and roasted soybeans of different particle sizes. Fatty acid utilization by lactating cows. **Journal of Dairy Science** 77, 166–80, 1994.

UCHIDA, S.; M. TODA, Y. KAMEI, Reproduction of elasmobranchs in captivity, p, 211-237, in: h. r. pratt; s,h, gruber & t, taniuchi (eds), elasmobranchs as living resources: **Advances in the biology, ecology, systematics, and the status of the fisheries**, Seattle, noaa technical report NMFS 90, 518p., 1990.

VALADARES FILHO, S. C.; MAGALHÃES, K. A.; ROCHA JÚNIOR,V. R. Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos, Viçosa: UFV. 2006, 329 p.

VALADARES, R. F. D.; BRODERICK, G. A.; VALADARES FILHO, S. C. Effect of replacing alfafa with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives, **Journal of Dairy Science**,v,82, p.2686-2696, 1999.

VAN SOEST, P. J.; MASON, V.C. The influence of Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds, **Animal Feed Science and Technology**, v.32, n.1, p,45-53, 1991.

VARGAS L. H.; LANA, R. P.; JHAM, G. N. et al. Adição de lipídios na ração de vacas leiteiras: parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do leite, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v, 31, n. 1, p. 522-529, 2002.

WALDO, D. R.; SMITH, L. W.; COX, E. L. Model of cellulose disappearance from the rumen, **Journal of Dairy Science**, Champaign, v, 55, n. 1, p. 125-129, 1972.

WEISS, W. P.; CONRAD, H. R.; PIERRE, N. R. S. T. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates, **Animal Feed Science Technology**, v. 39, p. 95-110, 1992.

WILDMAN, O. E. E.; JONES, G. M.; WAGNER, P. E. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics, **Journal of Dairy Science**, v, 65, n. 3, p. 495-501, 1982.

WILLIAMS, C. H.; DAVID, O. J.; IISMA, A. The determination of chromic oxide in feces samples by atomic absorption spectrophotometry, **Journal Agriculture Science**, 59, 381–385, 1962.

WOLFINGER R. Covariance structure selection in general mixed models. **COMMUN, STATIST-SIMULA**, v. 22, p. 1079–1106, 1993.

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