

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Elizeu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Dissertação



Óleo de girassol na dieta de vacas Jersey em lactação: efeitos sobre o consumo, produção e composição do leite, balanço energético, perfil de ácidos graxos do leite e perfil metabólico

Fábio Antunes Rizzo

Pelotas, 2014

Fábio Antunes Rizzo

Óleo de girassol na dieta de vacas Jersey em lactação: efeitos sobre o consumo, produção e composição do leite, balanço energético, perfil de ácidos graxos do leite e perfil metabólico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração: Produção e Nutrição de Ruminantes

Orientador: Dr. Jorge Schafhäuser Junior

Co-Orientador (es): Dr. Jamir Luís Silva da Silva
Dr. José Laerte Nörnberg

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catálogo na Publicação
Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

R627o Rizzo, Fábio Antunes

Óleo de girassol na dieta de vacas jersey em lactação :
efeitos sobre o consumo, produção e composição do leite,
balanço energético, perfil de ácidos graxos do leite e perfil
metab&ocut / Fábio Antunes Rizzo ; Jorge Schafhäuser
Junior, orientador ; Jamir Luís Silva da Silva, José
Laerte Nörnberg, coorientadores. — Pelotas, 2014.
99 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade
Federal de Pelotas, 2014.

1. Suplementação lipídica. 2. Leite. 3. Eficiência. 4.
Gordura do leite. I. Schafhäuser Junior, Jorge, orient. II.
Silva, Jamir Luís Silva da, coorient. III. Nörnberg, José Laerte,
coorient. IV. Título.

CDD : 636.234

Fábio Antunes Rizzo

Óleo de girassol na dieta de vacas Jersey em lactação: efeitos sobre o consumo, produção e composição do leite, balanço energético, perfil de ácidos graxos do leite e perfil metabólico

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, na área de concentração Produção e Nutrição de Ruminantes, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Elizeu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28 de Fevereiro de 2014.

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Jorge Schafhäuser Junior (Orientador)
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof. Dra. Tisa Echevarria Leite
Doutora em Ciências pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof. Dra. Ione Maria Pereira Haygert Velho
Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof. Dra. Isabella Dias Barbosa Silveira
Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

*Aos meus pais Nei da Silva Rizzo
(in memoriam) e Nossentina T.
Antunes Rizzo, minha esposa Maria
Eliane Pinheiro Rizzo e meus filhos
João Vítor e Pedro Rizzo, pelo
amor, apoio, incentivo e confiança
depositada.*

DEDICO

Agradecimentos

Primeiramente a Deus, que em sua infinita bondade me concede vitórias e conquistas durante minha caminhada.

A minha Mãe Sra. Nossentina T. Antunes Rizzo no alto dos seus 73 anos pelo incansável incentivo, suporte, amor, dedicação, preocupação e empenho. Sem dúvida nenhuma, a melhor Mãe do mundo.

A minha esposa, Maria Eliane Pinheiro Rizzo pelo companheirismo em todas as horas, cumplicidade, abnegação, incentivo, dedicação e amor.

A meus filhos João Vítor e Pedro Rizzo, motivos maiores do meu viver e de minhas lutas.

Ao meu irmão Danilo Antunes Rizzo por reafirmar incessantemente nossa amizade, trazendo alegria e incentivo.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia pela oportunidade de realização do mestrado acadêmico.

Ao meu orientador Dr. Jorge Schafhäuser Jr., pela sincera amizade, companheirismo, comprometimento, conhecimento científico e de vida passado nesses últimos dois anos. Não poderia deixar de agradecer imensamente também a sua esposa Prof. Dra. Eliza Simone Viegas Sallis, pessoa responsável por me indicar para a vaga de mestrado, sem nem mesmo me conhecer. A ambos devo sinceros e eternos agradecimentos.

Ao meu co-orientador Dr. Jamir Luís Silva da Silva pelo conhecimento, amizade e atenção sempre que necessária, e por conceder a mim a bolsa de estudos de seu projeto junto a CAPES/EMBRAPA, tornado bem menos árdua esta jornada.

Ao Professor Dr. José Laerte Nörnberg pela co-orientação e por haver disponibilizado materiais e seu laboratório no NIDAL-UFSM para realização de partes importantes desse estudo.

Aos professores do programa de pós-graduação pelos importantes conhecimentos e oportunidades oferecidas.

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Clima Temperado por haver disponibilizado de forma plena recursos e infraestrutura para realização deste estudo. Não poderia deixar de agradecer a amizade e comprometimento de todos os funcionários desta empresa, em especial aos funcionários do SISPel - Gilson, Guarací, Rogério, Júlio “Gata Cega”, Edenilson, Álcio Azambuja e ao colega médico veterinário Cristiano Weissheimer pela ajuda e amizade demonstrada. Não poderia deixar de mencionar a importante ajuda do “Zé do Álcool” e “Zeca” Faustini de Oliveira, sempre dispostos a resolver quaisquer problemas.

Aos estagiários e funcionários do Laboratório de Nutrição Animal, em especial a Rosângela “Dadá”, uma segunda Mãe, a Raquel Louzada, Léster Pinheiro, Patrícia Rosa, Joel Manfron e Daiana Santos pela ajuda na realização das análises e pelas horas de descontração e risadas proporcionadas. A eles minha sincera amizade e carinho.

Aos grandes amigos que conquistei durante esta jornada, Ana Paula Binato de Souza, Ana Carolina Fluck, Maria Cristina Lascombe, Leila Cardozo, Tamiris Beck, João Marcos “Ecologia” Andrade, Olmar Antônio Denardin Costa pela parceria e ajuda na realização do experimento e das análises laboratoriais.

Dedico um agradecimento muito especial a Zootecnista Lívia Argoud Lourenço, a “novinha” e ao Médico Veterinário e Zootecnista Víctor Ionatan Fioreze. Não saberia expressar em palavras o quanto vale para mim a amizade e quão importante foi à ajuda de vocês para realização deste estudo, basta dizer FUNDAMENTAL. São exemplo de amizade e companheirismo para ser eternamente lembrado.

Um imenso agradecimento ao meu “segundo Irmão” e colega de pós-graduação Zootecnista Rudolf Brand Scheibler, o amigo de todas as horas, exemplo de perseverança e superação. Agradeço a Deus a cada dia por haver proporcionado nossa amizade e parceria. Não existe forma de expressar o quanto devo a esse Amigo, senão chama-lo de meu IRMÃO.

Ao amigo e colega Médico Veterinário Msc. Diego Prado de Vargas, pelas análises de perfil de ácidos graxos, ajuda nas análises estatística e parceria na realização deste trabalho e na pessoa dele a todos os estagiários do NIDAL/UFSM.

A todos que de uma forma ou outra colaboraram com a realização deste estudo, meu sincero.....

MUITO OBRIGADO.

A velocidade do pensar é muito maior do que da escrita, motivo pelo qual nenhuma frase, texto, livro ou enciclopédia consegue transcrever em plenitude o conhecimento gerado...
(Fábio Antunes Rizzo, 2014).

RESUMO

RIZZO. Fábio Antunes. **Óleo de girassol na dieta de vacas Jersey em lactação: efeitos sobre o consumo, produção e composição do leite, balanço energético, perfil de ácidos graxos do leite e perfil metabólico.** 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas – RS.

Foi avaliado o efeito da inclusão de níveis crescentes de óleo de girassol sobre o consumo, produção e composição do leite, no balanço energético, perfil de ácidos graxos e perfil metabólico hepático de vacas Jersey em lactação. Foram utilizadas oito vacas multíparas, com peso médio de 443 kg \pm 63 kg e produção inicial média de leite de 21 kg \pm 2,15 kg. O delineamento experimental utilizado foi o quadrado latino 4x4 duplo, com quatro períodos experimentais de 15 dias. As dietas experimentais foram: T0=dieta controle com 3,7% de extrato etéreo (EE) na matéria seca total (MS), sendo as demais dietas T1, T2, T3, com inclusão de níveis crescentes de extrato etéreo, 6,0; 8,4 e 10,7% na MS. O volumoso empregado foi uma mistura de feno de alfafa picado e silagem de milho numa relação 50:50 em base seca (MS), sendo oferecido a vontade. Todas as variáveis obtidas foram submetidas à análise da variância e regressão até 2ª ordem. A inclusão crescente de óleo de girassol melhorou a eficiência alimentar, aumentou produção de gordura do leite, modificou o perfil de ácidos graxos do leite, sem diferenças quanto à produção de leite e perfil metabólico dos animais. É possível incluir níveis crescentes de óleo de girassol na dieta de vacas Jersey em lactação até 10,7% de extrato etéreo na matéria seca, sem prejuízos à saúde dos animais, obtendo maior aporte de energia através da dieta, com melhora da eficiência alimentar, da produção de leite e do perfil de ácidos graxos da gordura desse leite.

Palavras-chave: suplementação lipídica; leite; eficiência; gordura do leite.

ABSTRACT

RIZZO. Fábio Antunes. **Sunflower oil supplementation to lactating Jersey cows: effects on intake, milk yield and composition, energy balance, fatty acid profile of milk and metabolic profile.** 2014. 98f. Thesis (Master). Postgraduate Program in Animal Science. Federal University of Pelotas, Pelotas - RS .

The effect of increasing levels of sunflower oil on intake, milk yield and composition, energy balance, fatty acid profile and metabolic profile of lactating Jersey cows was evaluated. Were used eight multiparous cows, weighting of $443 \text{ kg} \pm 63 \text{ kg}$ and average milk yield of $21 \text{ kg} \pm 2.15 \text{ kg}$. The experimental design was a double 4x4 Latin square with four periods of 15 days. The experimental diets were: T0 = control diet with 3.7 % ether extract (EE) in total dry matter (TDM), with the other diets T1, T2, T3, with increasing levels of ether extract, 6.0, 8.4 and 10.7 % in DM. Were used a mixture of chopped alfalfa hay and corn silage in a 50:50 ratio on a dry basis. The statistical analysis was variance and regression to 2nd order in the variables. The increasing inclusion of sunflower oil improved feed efficiency, increased production of milk fat, modified the profile of milk fatty acids, no differences in milk production and metabolic profile of animals were found. It is possible add increasing levels of sunflower oil to lactating Jersey cows until 10.7 % EE without affect the health of animals, obtaining higher energy intake through diet, with improvement of feed efficiency in milk production and fat acids profile.

Keywords: fatty acids, feed efficiency, lipid supplementation, milk production, milk fat.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Consumo de matéria seca (CMS) e consumo de matéria orgânica (CMO) nos diferentes tratamentos.....	61
Figura 2 -	Digestibilidade aparente das frações proteína bruta (DigPB), extrato etéreo (DigEE), carboidratos não fibrosos (DigCNF) e teor de nutrientes digestíveis totais em porcentagem da matéria seca (NDT%MS).....	65
Figura 3 -	Comportamento das variáveis teor de gordura (GORD%) e teor de extrato seco total (EST%), nos diferentes tratamentos.....	68
Figura 4 -	Eficiência alimentar em kg leite/kg de MS consumida para leite in natura (EA) e leite corrigido para 3,5% de gordura (EA 3,5%), nos diferentes tratamentos.....	70
Figura 5 -	Concentração plasmática de colesterol total (COLt) em relação aos níveis crescentes de extrato etéreo da dieta.....	74
Figura 6 -	Concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados (AGNE) em relação aos níveis crescentes de extrato etéreo da dieta.....	74
Figura 7 -	Teores de ácido vacênico e ácido linoleico conjugado (CLA 1) frente aos níveis crescentes de extrato etéreo das dietas experimentais.....	77

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Consumo de matéria seca estimado (CMSe) e concentração estimada dos nutrientes Proteína Bruta (PB), Energia líquida de Lactação (ELI), Nutrientes digestíveis totais (NDT), Fibra em Detergente Neutro (FDN), e Cálcio (Ca), expressos em kg/dia ⁻¹ , na dieta controle e demais dietas contendo níveis crescentes de óleo de girassol. SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.....	49
Tabela 2 -	Composição das dietas experimentais de acordo com os ingredientes utilizados nos diferentes tratamentos, expressos porcentagem da participação na dieta total, calculado para atender as exigências nutricionais de acordo com NRC (2001). SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.....	49
Tabela 3 -	Composição bromatológica dos alimentos usados nas dietas experimentais, em porcentagem da matéria seca (MS) para matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos não fibrosos (CNF) e cálcio (Ca).....	50
Tabela 4 -	Consumo de matéria seca (CMS) matéria orgânica (CMO), proteína bruta (CPB), extrato etéreo (CEE), fibra insolúvel em detergente neutro (CFDN), carboidratos não fibrosos (CCNF), cálcio (CCa), nutrientes digestíveis totais (CNDT) e relações dos consumos de MS e FDN com o peso vivo dos animais (MS PV) e (FDN PV). SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.....	60
Tabela 5 -	Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (DigMS), matéria orgânica (DigMO), proteína bruta (DigPB), fibra insolúvel em detergente neutro (DigFDN), extrato etéreo (DigEE), carboidratos não fibrosos (DigCNF) e nutrientes digestíveis totais (NDT), nas dietas experimentais contendo níveis crescentes de inclusão de óleo de girassol. SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.....	64
Tabela 6 -	Médias dos teores (%) e produções (g/dia) de gordura, proteína total, lactose, estrato seco total (EST), estrato seco desengordurado (ESD) e minerais do leite produzido, nos diferentes tratamentos contendo níveis crescentes de inclusão de óleo de girassol. SISPEL, Embrapa Clima	

	Temperado, 2013.....	66
Tabela 7 -	Médias de produção de leite (PL) (kg/dia), produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLC 3,5%) (kg/dia) e eficiência alimentar em kg leite/kg de MS consumida para leite in natura (EA), leite corrigido para 3,5% de gordura (EA 3,5%), e eficiência alimentar em kg de leite produzido/kg de FDN (EA FDN) nos diferentes tratamentos contendo níveis crescentes de inclusão de óleo de girassol. SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.....	70
Tabela 8 -	Efeito da inclusão em níveis crescentes de óleo de girassol na dieta, nas concentrações sanguíneas de glicose (mg/dL), colesterol total (mg/dL), colesterol HDL (mg/dL), colesterol LDL (mg/dL), triglicerídeos (mg/dL), uréia (mg/dL), e ácidos graxos não esterificados (AGNE) (mmol/L), aspartato amino transferase (AST) (U/L) e gama glutamil transferase (GGT) (U/L). SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.....	72
Tabela 9 -	Efeito da inclusão de óleo de girassol na participação (mg/g) de ácidos graxos na gordura do leite produzido. SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.....	75

Lista de Abreviaturas e Siglas

MS - matéria seca;

MO - matéria orgânica;

PB - proteína bruta;

FDN - fibra insolúvel em detergente neutro com uso de alfa amilase termoestável corrigida para cinzas e proteína;

EE - extrato etéreo;

FDA - fibra insolúvel em detergente ácido corrigida para cinzas e proteína;

Ca - Cálcio;

Cr - Cromo;

LDA - lignina em detergente ácido;

MM - matéria mineral;

PV - peso vivo;

HDL - lipoproteína alta densidade;

LDL - lipoproteína baixa densidade;

VLDL - lipoproteína de muito baixa densidade;

PLC 3,5% - produção de leite corrigida para 3,5% de gordura;

EA - eficiência alimentar;

EA 3,5% - eficiência alimentar para leite corrigido para 3,5% de gordura;

CDA - coeficiente de digestibilidade aparente;

DigMS - digestibilidade da matéria seca;

CMS - consumo de matéria seca;

DigMO - digestibilidade da matéria orgânica;

CMO - consumo de matéria orgânica;

DigEE - digestibilidade do extrato etéreo;

CEE - consumo de extrato etéreo;

DigPB - digestibilidade da proteína bruta;

CPB - consumo de proteína bruta;

CFDN - consumo de fibra insolúvel em detergente neutro,
DigFDN - digestibilidade da fibra insolúvel em detergente neutro,
CNF - carboidratos não fibrosos;
DigCNF - digestibilidade dos carboidratos não fibrosos;
NDT - nutrientes digestíveis totais;
CNDT - consumo de nutrientes digestíveis totais;
ED - energia digestível;
EM - energia metabolizável;
ELI - energia líquida de lactação;
AST – Aspartato aminotransferase;
GGT – Gama Glutamiltransferase;
DGL – depressão da gordura do leite;
AG – ácido graxo;
CLA – ácido linoléico conjugado;
BEN – balanço energético negativo;
AGV – ácido graxo volátil;
PDR – proteína degradável no rúmen;
PNDR – proteína não degradável no rúmen;
MPS – matéria parcialmente seca;
PFT – produção fecal total;
CDA – coeficiente de digestibilidade aparente;

Sumário

1	Introdução.....	17
2	Revisão da Literatura.....	19
2.1	Utilização de gordura na dieta de bovinos de leite.....	19
2.2	Óleos vegetais como fonte de gordura dietética para bovinos	20
2.3	Digestão de lipídios pelos bovinos.....	21
2.3.1	Metabolismo Ruminal das Gorduras.....	21
2.3.1.1	Hidrólise.....	22
2.3.1.2	Biohidrogenação.....	23
2.4	Efeitos da suplementação de gordura livre na produção e composição do leite.....	26
2.5	Efeitos da gordura livre na ingestão de matéria seca e digestibilidade de seus constituintes.....	28
2.6	Efeitos da adição de gordura da dieta na composição da gordura do leite.....	29
2.7	Perfil de ácidos graxos e ácido linoléico conjugado (CLA).....	33
2.8	Efeito da suplementação de gordura no surgimento da síndrome de depressão da gordura do leite.....	36
2.9	Efeito da suplementação de gordura no perfil metabólico sanguíneo e perfil hepático.....	38
2.9.1	Glicose	40
2.9.2	Colesterol	41
2.9.3	Triglicerídeos.....	42
2.9.4	Uréia.....	43
2.9.5	Ácidos Graxos Não Esterificados (AGNE).....	44

2.9.6	Aspartato aminotransferase (AST).....	45
2.9.7	Gama-glutamil transferase (GGT).....	46
3	Material e Métodos.....	48
3.1	Local e Instalações.....	48
3.2	Animais Experimentais.....	48
3.3	Tratamentos.....	48
3.4	Delineamento experimental.....	50
3.5	Duração do experimento e períodos experimentais.....	50
3.6	Condução do experimento.....	50
3.7	Preparo de amostras.....	52
3.8	Análises e avaliações laboratoriais.....	54
3.9	Análises estatísticas.....	57
4	Resultados e discussão.....	59
4.1	Consumo de Matéria seca e suas frações constituintes.....	59
4.2	Digestibilidade Aparente das frações nutrientes.....	63
4.3	Composição do leite nos diferentes tratamentos.....	66
4.4	Produção de leite e eficiência alimentar nos diferentes tratamentos.....	69
4.5	Parâmetros Bioquímicos e Perfil Hepático nos diferentes tratamentos.....	71
4.6	Perfil de ácidos graxos da gordura do leite.....	75
5	Conclusões.....	79
6	Considerações Finais.....	80
7	Referências Bibliográficas.....	81
	Anexos.....	97

1. Introdução

De acordo com dados da FAO (2014), o Brasil figurou no ano de 2010 como o quinto maior produtor mundial de leite com mais de 30 bilhões de litros produzidos, muito embora os dados de produtividade por animal, segundo dados do IBGE (2010) esteja em 1.340 litros de leite/vaca/ano. Ainda com base nos dados oficiais, o estado do Rio Grande do Sul se destaca como segundo maior produtor nacional, respondendo por 11,8% da produção, e com índices de produtividade superiores (2.430 litros/vaca/ano) a média nacional. Desse modo, práticas que propiciem aumentos na produtividade dos rebanhos são de fundamental importância para a cadeia produtiva do leite.

A suplementação lipídica na dieta de vacas leiteiras de alta produção, com a finalidade de aumentar a concentração energética da dieta não é uma técnica nova, uma vez que o aumento da densidade energética da dieta pelo uso de carboidratos, nessa fase da lactação, tende a alterar o perfil da fermentação ruminal, reduzindo o pH do rúmen e levando os animais a uma condição limítrofe para o surgimento de distúrbios metabólicos, principalmente acidose. Nesse contexto, a utilização de gorduras) diminui os riscos de acidose ruminal, mostrando-se como uma importante ferramenta nutricional.

Em razão da proibição de utilização de produtos de origem animal na dieta de ruminantes (sebo) e o alto custo de aquisição dos insumos comerciais destinados a este fim (sais de cálcio de ácidos graxos), fontes alternativas de suplementação lipídica são incessantemente pesquisadas, como por exemplo, óleos vegetais. Além disso, diversas pesquisas têm objetivado avaliar os efeitos dessa utilização no que se refere à modificação do perfil de ácidos graxos da gordura do leite, objetivando reduzir a porção de ácidos graxos saturados e de cadeia curta, e aumentar a participação de ácidos graxos insaturados.

A busca por alimentos mais saudáveis e com elevado valor nutricional, tem produzido modificação nos hábitos e costumes alimentares do homem. Com o aumento do poder aquisitivo da população, criou-se uma nova geração de consumidores, a cada dia mais exigentes e dispostos a pagar por produtos alimentícios que ofereçam benefícios à saúde, além do valor nutricional. São exemplos os iogurtes e bebidas lácteas com adição de probióticos. Porém, é possível alterar a composição do leite por intermédio da manipulação da dieta de vacas leiteiras, em uma visão mais equilibrada e sustentável, sem necessidade de adição de compostos exógenos ao produto.

A pesquisa por substâncias que possuam ação nutracêutica nos alimentos, auxiliando na prevenção ou combate de doenças, tem oferecido um campo rico para exploração da pesquisa científica, principalmente no que se refere a produtos de origem animal. Ainda neste contexto de alimentação saudável, com diminuição no consumo de ácidos graxos saturados de origem animal tem sido extensivamente preconizada pelas sociedades médicas.

É considerada saudável uma alimentação para humanos que propicie a ingestão de ácidos graxos mono e poli-insaturados, dentre os qual ácido linoleico conjugado (CLA), tendo em vista que a ingestão de alimentos ricos em ácidos graxos poli-insaturados (ômega 6 e ômega 3) parece estar associada com redução no risco de doenças cardiovasculares. O termo Ácido linoleico conjugado (CLA) refere-se a um grupo heterogêneo de isômeros posicionais e geométricos de ácidos graxos insaturados, que são encontrados predominantemente em demais produtos com origem na exploração pecuária de ruminantes, e tem sido relacionados por seus efeitos anticarcinogênicos, antiaterogênicos, no aumento da resposta imune, redução dos depósitos lipídicos corporais, e ainda, efeito antidiabético.

Objetivou-se avaliar a inclusão de níveis crescentes de óleo de girassol na dieta de vacas leiteiras da raça Jersey, sobre seus efeitos na produção e composição do leite, eficiência alimentar e no balanço energético, assim como estudar os efeitos no consumo e digestibilidade das dietas, e o perfil de ácidos graxos da gordura do

2. Revisão da Literatura

2.1. Utilização de gordura na dieta de bovinos de leite

Ao longo de várias décadas, profissionais e pesquisadores demonstram preocupação incessante em formular dietas que atendam a demanda energética elevada no terço inicial da lactação de bovinos leiteiros, sem os efeitos colaterais negativos do excesso de carboidratos (principalmente amido), e procurando atender as exigências de fibra, compatíveis com a manutenção da saúde ruminal e teor de gordura do leite.

As fontes de gordura capazes de serem utilizadas como componente energético das dietas de vacas leiteiras são variadas e numerosas, podendo ser classificadas nutricionalmente em dois grandes grupos: (a) as disponíveis no rúmen, também chamadas de gorduras livres, as quais, apesar do incremento energético podem causar transtornos fermentativos em nível ruminal, e as gorduras rúmen-inertes ou *bypass* (sobrepassantes) podendo estas provir de fontes naturalmente protegidas (sementes oleaginosas) ou como gorduras protegidas artificialmente na forma de sais de cálcio de ácidos graxos (NÖRNBERG, 2003). Também se considera gordura livre, o sebo animal, entretanto sua utilização na dieta de bovinos está proibida no Brasil em função do risco de transmissão da Encefalite Espongiforme Bovina (EEB - Doença da vaca louca), conforme Instrução Normativa nº 15 (BRASIL, 2001).

Os lipídios são compostos orgânicos insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos (éter, clorofórmio, benzeno entre outros) e desempenham importantes funções bioquímicas e fisiológicas nos tecidos animais e vegetais (CHURCH & POND, 1977). São capazes de produzir um incremento de energia na dieta superior aos carboidratos e proteínas, uma vez que os lipídios fornecem 2,25 vezes mais energia por unidade de massa do que os carboidratos ou proteínas (DAVIS, 1993). Isto se deve aos lipídios possuírem maior número de átomos de hidrogênio em

sua composição (mais reduzidos), proporcionando maior produção de energia para as células durante o processo de oxidação.

O uso de suplementação com gordura na dieta de bovinos não é recente, tendo sido já bastante explorada sua utilização na alimentação de rebanhos de alto potencial genético para produção de leite, principalmente na forma de gordura protegida (sais de cálcio de ácidos graxos), mas em função do alto custo para aquisição deste insumo, muitas fazendas de leite deixaram de utilizar essa tecnologia. Várias pesquisas vêm demonstrando a eficácia da suplementação com fontes lipídicas para bovinos de leite, ressaltando incrementos na produção animal, melhoria na taxa de concepção das fêmeas, redução no balanço energético negativo pós-parto, melhora da eficiência alimentar na produção (relação entre kg de alimento consumido e produção), dentre outros.

Muito embora a função energética associada ao uso de gordura na dieta de vacas leiteiras não tenha sido colocada de lado pela pesquisa, nos últimos anos especial atenção tem sido dispendida com objetivo de estudar a modificação no teor de gordura do leite e perfil de ácidos graxos dessa gordura, por manipulação da dieta, principalmente pela gordura ser o componente mais variável do leite, com a quantidade e composição sendo afetada por muitos fatores, incluindo genética, estado fisiológico e meio ambiente (LOCK & SHINGFIELD, 2004; PALMQUIST et al., 1993).

2.2. Óleos vegetais como fonte de gordura dietética para bovinos

Os óleos vegetais são compostos principalmente por glicerídeos de ácidos graxos, podendo conter baixas quantidades de fosfolípidios, constituintes insaponificáveis e ácidos graxos livres. São substâncias hidrofóbicas e lipofílicas, formadas principalmente de triacilgliceróis, que se apresentam em estado líquido e viscoso nas condições normais de temperatura e pressão, devido ao baixo ponto de fusão. Estudos realizados com uso de óleos vegetais para ruminantes, com avaliação do consumo de MS e digestibilidade dos nutrientes, têm apresentado resultados muitas vezes conflitantes, possivelmente pelas diferenças inerentes às espécies animais, às fontes, aos níveis de inclusão de óleo testados e à dieta basal, em cada situação.

Cada vez mais os óleos vegetais tem se destacado como alternativas viáveis na alimentação de bovinos, em grande parte pelo interesse despertado nos pesquisadores em produzir alimentos de origem animal diferenciados. Costa et al. (2009) afirmaram que há uma tendência de que a suplementação com óleos se torne cada vez mais comum, fazendo com que a indústria produtora de óleos vegetais seja mais eficaz

e, até mesmo, estabeleça um processamento diferenciado que gere menores custos para destinar à nutrição animal.

Os óleos vegetais mais utilizados atualmente, em função de sua maior disponibilidade e principalmente em razão dos custos para sua utilização, são os óleos de soja, arroz, linhaça, girassol, canola e milho, cujos custos de utilização são favoráveis quando comparados com o custo das gorduras protegidas comerciais disponíveis no mercado.

2.3. Digestão de lipídios pelos bovinos

A digestão de gorduras nos bovinos é caracterizada por eventos em nível ruminal, que precedem a absorção intestinal. Durante sua passagem pelo rúmen as gorduras são transformadas, de modo que, a quantidade e composição da gordura que deixa o rúmen diferem da gordura ingerida (DOREAU & CHILLIARD, 1997).

2.3.1. Metabolismo Ruminal das Gorduras

De acordo com Palmquist et al. (1993), a quantidade de lipídio dietético transformado diretamente em gordura do leite é influenciado por três fatores: lipólise e biohidrogenação ruminal, absorção e relação entre estoque e mobilização de lipídeos nos tecidos adiposos.

Os mais importantes constituintes dos lipídeos na nutrição animal incluem ácidos graxos; glicerol; mono-, di- e triglicerídeos (ésteres de glicerol e ácidos graxos) e fosfolipídios.

A composição de lipídeos das forrageiras é muito variável incluindo lipídeos simples, fosfolipídeos, galactolipídeos e pigmentos. Os grãos de oleaginosas (soja, girassol, canola, linhaça) são ricos em lipídeos (20-40% da MS), com elevado conteúdo de triglicerídeos (99%). O conteúdo de lipídeos nos grãos de cereais varia entre 2,1% (trigo) a 7,1% (aveia) (GAGLIOSTRO & CHILLIARD, 1992).

Os lipídios podem ser agrupados em lipídios de reserva (principalmente triglicerídeos em sementes), lipídios de membranas (galactolipídios e fosfolipídios) e em uma mistura heterogênea de outras estruturas moleculares solúveis em éter (ceras, carotenoides, clorofila, etc.).

Os lipídios presentes nas plantas são representados, principalmente, por galactolipídios e fosfolipídios, enquanto a gordura animal, e aquela presente nos grãos de cereais e oleaginosas são basicamente triglicerídeos (KOZLOSKI, 2012; PALMQUIST, 1996).

KOZLOSKI (2012) relata que a maior parte dos ácidos graxos (AG) de origem vegetal é insaturada, geralmente mais de 70%. Nos cereais e na maioria das sementes oleaginosas há predominância de ácido linoleico (C18:2 n-6), enquanto em forragens o ácido mais comum seja o α -linolênico (C18:3 n-3). Algumas exceções importantes incluem o óleo de palma (alto teor de ácido palmítico – C16:0), óleo de canola (alto teor de ácido oléico – C18:1 n-9) e o óleo de linhaça (alto teor de ácido α -linolênico – C18:3 n-3) (PALMQUIST & MATTOS, 2006).

Os ácidos graxos presentes na dieta não contribuem como fonte de energia para a microbiota ruminal. Além disso, a presença de ácidos graxos livres no ambiente ruminal, principalmente AG insaturados, pode acarretar efeitos deletérios ao ambiente ruminal como recobrimento das partículas de alimento e de células microbianas, dificultando com isso a adesão destas e, conseqüentemente, prejudicando a fermentação dos alimentos. Por conseguinte, a maior parte dos lipídeos que chegam ao rúmen é transformada por ação da microbiota, através de dois processos que se seguem: hidrólise e biohidrogenação, respectivamente.

2.3.1.1. Hidrólise

A hidrólise das ligações ésteres é o primeiro processo que ocorre quando a gordura da dieta chega ao rúmen. Os lipídios são então hidrolisados pelas lipases, galactosidases e fosfolipases microbianas liberando ácidos graxos livres, galactose e glicerol. O glicerol é fermentado rapidamente, produzindo propionato (ácido graxo volátil – AGV) como produto final (JENKINS, 1993), assim como a galactose (STAPLES, 2000).

A extensão da hidrólise é geralmente alta, atingindo cerca de 85% do ácidos graxos da ingesta, embora um bom número de fatores seja capaz de diminuir essa etapa inicial (LOCK et al., 2006; BAUMAN et al., 2011).

A hidrólise dos lipídios pode ser diminuída quando o nível de gordura da dieta é aumentado ou quando fatores como baixo pH ruminal, principalmente por dietas com alta inclusão de concentrado rico em amido (dietas acidogênicas), ou por ação de antibióticos ionóforos que inibem a atividade e o crescimento de determinados gêneros de bactérias ruminais (DOREAU et al., 1997; HARFOOT & HAZLEWOOD, 1997).

Como nos alimentos, os lipídeos encontram-se, em sua maioria, na forma esterificada como triglicerídeos e galactolipídios (ácidos graxos ligados a uma molécula glicídica), e as bactérias responsáveis pela biohidrogenação atuam exclusivamente sobre ácidos graxos livres, a lipólise é um pré-requisito para a biohidrogenação.

2.3.1.2. Biohidrogenação

A atuação nos compartimentos fermentativos pelos microrganismos ruminais modifica a natureza lipídica da dieta, transformando os ácidos graxos insaturados em saturados, através do processo de biohidrogenação.

Considerando o efeito tóxico de ácidos graxos insaturados sobre os microrganismos ruminais, um mecanismo de defesa para redução desta toxidez é a provável razão para o desenvolvimento da capacidade de biohidrogenação pela microbiota ruminal (PALMQUIST & MATTOS, 2006).

A biohidrogenação visa diminuir as duplas ligações existentes na cadeia carbonada dos ácidos graxos insaturados pela adição de íons hidrogênio.

Os ácidos graxos insaturados apresentam alta capacidade reativa com as membranas celulares bacterianas, processo que resulta normalmente em perda da natureza bifásica da membrana celular bacteriana, levando a morte microbiana. Além disso, a biohidrogenação contribui para retirada dos íons hidrogênio (H^+) do ambiente ruminal, evitando seu acúmulo; reduz também a produção de metano (CH_4) pelas bactérias metanogênicas, uma vez que consome íons H^+ , aumentando com isso, a eficiência energética da dieta (COSTA, 2008).

Segundo Chalupa et al. (1986) os lipídios insaturados estimulam as bactérias ruminais produtoras de propionato, causando decréscimo na proporção acetato:propionato e na produção de metano, agindo de maneira similar aos ionóforos.

Os microrganismos mais susceptíveis aos efeitos do acúmulo de ácidos graxos poli-insaturados são bactérias gram positivas, metanogênicas e os protozoários. (MACHMÜLLER & KREUZER, 1999).

Os ácidos graxos insaturados encontrados na gordura vegetal e a maioria das gorduras animais apresentam configuração isomérica *cis* (STAPLES, 2000), no entanto, além da adição de íons hidrogênio, durante a biohidrogenação, pela ação de isomerases, algumas duplas ligações dos ácidos graxos de origem vegetal na forma *cis* são convertidas a forma *trans*.

Ao longo do processo de biohidrogenação, isomerases e redutases convertem os ácidos linoleico (18:2) e linolênico (18:3) a esteárico (18:0), com formação de diversos intermediários (KOZLOSKI, 2012). Entre estes, destacam-se os compostos denominados CLA (ácido linoleico conjugado) que, segundo Dhiman et al. (2000), são isômeros posicionais e geométricos do ácido linoleico, contendo duplas ligações

conjugadas. Tais ligações geralmente se encontram nas posições 9 e 11 ou 10 e 12, com configuração *cis* ou *trans*.

A biohidrogenação é realizada por dois grupos distintos de bactérias. O primeiro é responsável pela biohidrogenação do ácido linoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3) a ácido transvacênico (trans-11 C18:1) e as bactérias do segundo grupo são capazes de biohidrogenar uma grande extensão de *cis* e *trans* C18:1 a ácido esteárico (C18:0) (DEMEYER & DOREAU, 1999).

Em algumas situações dietéticas a biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos da dieta é incompleta, acarretando na passagem de diversos isômeros posicionais de ácido linoleico e linolênico para o intestino delgado onde serão absorvidos, sendo transportados até a glândula mamária e incorporados na gordura do leite ou ao tecido adiposo corporal, alterando seu perfil de ácidos graxos.

Essas situações incluem a grande oferta de concentrado na dieta, com conseqüente redução do pH ruminal, onde as taxas de lipólise e biohidrogenação serão menores, o que resulta num maior escape de ácidos graxos insaturados e isômeros posicionais de ácido linoleico e linolênico do rúmen-retículo, chegando intactos ao abomaso e intestino delgado.

A velocidade de passagem da digesta pelos pré-estômagos é capaz de afetar a taxa de biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados e, conseqüentemente, aumentar a chegada de produtos intermediários da biohidrogenação no intestino delgado. Coppock & Wilks (1991) afirmam quanto ao nível de consumo de matéria seca que, animais consumindo 4 % ou mais de matéria seca em relação ao peso vivo, em função da maior taxa de passagem da digesta e, portanto, menor tempo de permanência no rúmen, possibilita aos ácidos graxos da dieta e produtos intermediários da biohidrogenação destes chegar mais rapidamente e intactos ao intestino delgado. O mesmo ocorre em dietas em que são utilizados alimentos volumosos de alta qualidade, mas de baixa efetividade da fração fibrosa (alimentos muito picados), diminuindo com isso a atividade de ruminação e aumentando a taxa de passagem. A extensão da lipólise é dependente também da quantidade de gordura adicionada à dieta e da natureza lipídica dessa gordura, sendo que óleos vegetais, como o de linhaça e girassol são quase que completamente hidrolisados (em torno de 90%) enquanto que óleo de peixe, por exemplo, tende a ser menos hidrolisado (em torno de 50 %) (CHURCH, 1988).

Embora o ácido esteárico (C18:0) seja o principal produto final da biohidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados, existem certas condições que afetam a biohidrogenação. Em dietas suplementadas com óleo de peixe (WACHIRA et al. 2002; SHINGFIELD et al., 2003), foi observada a inibição do último passo da biohidrogenação, levando ao acúmulo de ácidos graxos *trans* C18:1. Condições nas quais se reduz o pH ruminal, como no caso de dietas ricas em concentrado, ou dietas com inclusão de ionóforos, também podem levar a inibir o último passo da biohidrogenação (VAN NEVEL & DEMEYER, 1995).

O resultado final da biohidrogenação dos ácidos linoleico e linolênico é a formação de ácido esteárico. Durante este processo formam-se, como produtos intermediários, ácidos graxos conjugados, principalmente o *cis*-9, *trans*-11 C18:2 Ácido Linoleico Conjugado (CLA), também denominado Ácido Rumênico, bem como ácidos graxos monoinsaturados com a dupla ligação com configuração *trans*, principalmente Ácido Vacênico *trans*-11 C18:1.

Modificações na dieta tradicional de bovinos, principalmente pela adição de fontes lipídicas ricas em ácidos graxos insaturados (óleos vegetais, por exemplo), são capazes de aumentar a proporção destes ácidos no perfil de ácidos graxos da carne e do leite, agregando a estes alimentos substâncias de reconhecido valor nutracêutico como o Ácido Linoleico Conjugado (CLA). Além disso, diversas pesquisas demonstraram a eficácia de alguns ácidos graxos do grupo *trans* em diminuir a produção de gordura do leite (PIPEROVA et.al., 2000; BAUMGARD & BAUMAN, 2001; BAUMAN & GRIINARI, 2001; STAPLES, 2006; BAUMAN et. al., 2011).

Assim, vários trabalhos têm sido realizados para estudar a quantidade e o tipo de gordura a ser adicionada a dieta de bovinos, sua aceitabilidade e digestibilidade com a finalidade de elevar os conteúdos de CLA e medir os efeitos de ácidos *trans* na gordura do leite.

2.4 Efeitos da suplementação de gordura livre na produção e composição do leite

A suplementação lipídica nem sempre leva a uma maior produção de leite. Há situações em que o consumo de matéria seca total é reduzido pela adição de gordura livre e o aumento da ingestão de energia por fonte lipídica não se mostra compensatório (LÓPEZ, 2001; NORNBORG, 2003).

A redução da síntese de gordura do leite, que ocorre em alguns casos pela suplementação lipídica, disponibiliza mais energia para a síntese de outros

componentes do leite (NORNBERG et al., 2004), entre eles a lactose, estando esta diretamente relacionada com volume de leite produzido.

Grummer (2004) revisando 41 estudos utilizando suplementação lipídica relata que a resposta da produção de leite em vacas em início de lactação aumentou 0,30 kg por dia por incremento de unidade percentual de gordura suplementada, enquanto que a resposta em leite de vacas no meio da lactação não foi significativa.

A resposta positiva de vacas em lactação precoce pode ser parcialmente explicada pelo balanço energético negativo, com uma maior transferência de ácidos graxos da dieta, a partir do sangue, para a glândula mamária. Aumento da incorporação de ácidos graxos da dieta para o leite, provavelmente irá aumentar a disponibilidade da glicose para a síntese de lactose e produção de leite (GRUMMER, 2004).

Schafhäuser (2005) trabalhando com vacas leiteiras e utilizando diferentes dietas com 3,5; 5,0; 6,5 e 8% de extrato etéreo e usando gordura livre em substituição aos carboidratos da dieta, utilizando farelo de arroz integral e óleo de arroz em suas formulações, observou que a produção de leite se manteve nos quatro tratamentos, não obtendo efeito da gordura sobre essa variável. Entretanto, a adição de gordura à dieta de vacas em lactação poderá aumentar a produção de leite quando a energia for o fator limitante na dieta, desde que atendidas a demandas de outros nutrientes do animal.

As alterações na concentração de proteína do leite, através de manipulações dietéticas, ocorrem numa escala bem menor do que para a gordura. A produção de proteína do leite decorre em função do suprimento de aminoácidos originários de fontes endógenas, microbiana e proteínas dietéticas não degradadas (BROCKMAN, 1993; NRC, 2001; FIRKINS et al. 2006).

Segundo Palmquist & Jenkins (1980), a adição elevada de lipídios na dieta diminui a produção e o teor de proteína do leite. As gorduras de origem vegetal na forma livre na dieta diminuem a capacidade de fermentação ruminal por recobrimento de partículas do alimento e células bacterianas, além de seus efeitos tóxicos à microbiota ruminal, diminuindo assim a multiplicação microbiana e, conseqüentemente, o aporte de aminoácidos de origem microbiana para o intestino (SMITH et al., 1978; COPPOCK & WILKS, 1991; VAN SOEST, 1994).

Quando se utiliza suplementação lipídica, deve-se ter especial atenção para o aporte de proteína metabolizável da dieta, pois o uso de gordura livre pode acarretar

em diminuição da concentração de proteína do leite, normalmente em 0,1-0,2 unidades percentuais, podendo ser prevenida pelo aumento na proteína metabolizável na dieta, evitando assim a depressão no teor de proteína do leite (LOCK & GARNSWORTHY, 2002). Esta redução da concentração de proteína do leite ocorre, provavelmente, devido a um menor aporte de aminoácidos para a glândula mamária (WU & HUBER, 1994, EMERY, 1978).

Stern et al. (1994) revisando os fatores ligados à síntese de proteína no leite, sugerem que a adição de gordura na dieta afeta o fluxo de proteína microbiana no rúmen, por alterar a quantidade de carboidratos na dieta, a fermentação dos carboidratos e possivelmente a quantidade de N incorporado na proteína microbiana, por unidade de carboidrato fermentado. Por outro lado, a degradação ruminal da proteína dietética é um dos fatores mais importantes que influenciam o suprimento de aminoácidos para vacas leiteiras e que pode comprometer os teores de proteína no leite.

Costa (2008) observou redução no teor de proteína do leite, utilizando dietas contendo grão de soja tratado quimicamente, devido à baixa disponibilidade de aminoácidos que chegavam à glândula mamária para síntese da proteína do leite. Segundo Palmquist & Weiss (1994), a explicação para este resultado é que os microrganismos do rúmen não são capazes de utilizar lipídeos como fonte energética para seu crescimento, afetando a síntese microbiana e, conseqüentemente, fornecimento dos aminoácidos para a síntese proteica do leite.

A lactose, principal componente osmótico do leite, geralmente não sofre alterações drásticas com o aumento da suplementação de gordura na dieta. Excetuando-se situações em que a dieta é incapaz de prover quantidades mínimas de precursores de glicose, a lactose sofre pouca influência da alimentação, por isso, sua concentração no leite é bastante constante, sendo considerado um marca-passo da síntese do leite, por ser, junto com o potássio, o seu principal componente osmótico (MÜHLBACH et al., 2000).

2.5 Efeitos da gordura livre na ingestão de matéria seca e digestibilidade de seus constituintes

A suplementação com gordura em dietas para vacas leiteiras tem como um dos principais objetivos permitir maior ingestão de energia em situações nas quais o animal tem sua capacidade de consumo reduzida, como no início da lactação. Isso

acontecendo, o BEN pode ser amenizado, permitindo que o animal manifeste mais plenamente seu potencial genético. Porém, na prática nem sempre isso é possível, visto que a gordura suplementar produz outros efeitos sobre o metabolismo animal e sobre a fermentação ruminal, que podem, inclusive, fazer com que o animal ingira menor quantidade de energia, comparado com uma dieta sem gordura complementar. Nesse caso, pode não haver resultado positivo na produção de leite (SCHAFHÄUSER, 2005).

A inclusão de níveis elevados de óleo nas rações, acima de 7% de EE na MS, podem apresentar efeitos negativos e inibitórios na fermentação ruminal (KOZLOSKI, 2012), comprometendo o consumo (PALMQUIST & MATTOS, 2006), a digestibilidade de alguns nutrientes, principalmente da fração fibrosa (NRC, 2001; VARGAS et al., 2002), e mudanças da população celulolítica (COSTA, 2008).

Acredita-se que a depressão de apetite, como efeito da gordura sobre a fermentação ruminal, motilidade intestinal, aceitabilidade da dieta com suplemento (palatabilidade), secreção de hormônios intestinais como a Colecistocinina (CCK), taxa glicêmica sanguínea, e a capacidade limitada dos ruminantes de oxidar os ácidos graxos, sejam as principais razões da inibição de consumo de alimentos (ALLEN, 2000). Esse efeito de redução do CMS através da suplementação lipídica pode ser também atribuído à redução da fermentação ruminal e digestibilidade da fibra que algumas fontes de gordura produzem, e por sua vez, contribuiriam para o tempo de permanência do alimento no rúmen-retículo (CHOI et.al. 2000; NRC, 2001).

O aporte de ácidos graxos poliinsaturados (óleos vegetais e óleo de peixe) tem efeito direto na fermentação ruminal, provocando modificação na ingestão, pela modificação do padrão de fermentação ruminal com mudanças da população celulolítica e diminuição da digestibilidade da fibra (COSTA, 2008).

Alterações na fermentação ruminal e no consumo de alimentos parecem estar relacionadas também com as características do volumoso empregado na dieta. Em dietas contendo alta concentração de lipídios, principalmente na forma de gordura vegetal e sebo, em que a única fonte de volumoso empregado foi silagem de milho, ocorreu maior depressão no consumo de matéria seca quando comparado à substituição de 25 a 50% da silagem de milho por feno de alfafa (SMITH et al., 1993). A alfafa, principalmente na forma de feno, parece adsorver parte da gordura livre presente no rúmen, diminuindo o efeito desta em nível ruminal.

Quando é aumentada a densidade energética da dieta das vacas leiteiras com utilização de gorduras, é esperado um maior consumo de energia, desde que, o consumo de matéria seca não diminua (COPPOCK & WILKS, 1991).

Em estudo feito por KELLY et al. (1998) utilizando três dietas isoproteicas, isofibróticas e isoenergéticas, todas com 8,5% de EE na MS total, variando apenas a fonte lipídica adicionada (óleo de amendoim, de girassol e de linhaça), não encontraram diferenças de consumo de matéria seca ($21,1 \pm 0,3$ kg/d) e produção de leite (média de $34,2 \pm 1,3$ kg/d) entre os tratamentos.

Ueda et al. (2003) não observaram diferenças na ingestão de MS em animais que receberam 3% de óleo de linhaça na MS da ração, com os que não receberam essa suplementação. Já Eifert et al (2006), observaram que a redução significativa de ingestão de MS (13,8%) com a inclusão de 3,93 % de óleo de soja na dieta de vacas em lactação, alcançando 6,19% de extrato etéreo na MS.

2.6 Efeitos da adição de gordura da dieta na composição da gordura do leite

Fontes lipídicas como sabões cálcicos de ácidos graxos (gordura protegida comercial), ou fontes ricas em ácidos graxos saturados, são consideradas como parcialmente inertes no rúmen, apresentando pouco ou nenhum efeito sobre a população microbiana ruminal e na digestão dos alimentos pela microbiota. Em contrapartida, a adição de óleo vegetal ou de peixe na forma de gordura livre na dieta de vacas em lactação, afeta negativamente a produção de gordura do leite, sendo o efeito mais acentuado quando da utilização de óleo de peixe (MARTINEZ et al., 2010).

A produção de gordura do leite é especialmente sensível à nutrição, o que faz com que a manipulação da dieta seja uma ferramenta prática para alterar a sua composição e produção (CHILLIARD et al., 2000; LOCK & BAUMAN, 2004). Dependendo do nível de suplementação com lipídios e do grau de insaturação da fonte lipídica utilizada, estes podem determinar a redução no teor de gordura do leite, pelos distúrbios que podem causar a fermentação ruminal (BAUMAN & GRIINARI, 2001).

A gordura é o principal componente energético do leite e também o componente com maior coeficiente de variação, sendo responsável por muitas das propriedades físicas, características organolépticas, e de qualidade e fabricação de produtos lácteos, assim como representa o ingrediente do leite de maior custo energético para sua síntese (BAUMAN & GRIINARI, 2001; BAUMAN et.al., 2011). Doreau & Chilliard (1992) comentam que o efeito das fontes lipídicas incluídas na dieta sobre o teor de gordura do leite depende do impacto destas sobre a digestão ruminal, o qual se relaciona por

sua vez com a proteção da fonte lipídica frente aos microrganismos ruminais, grau de insaturação, e processamento.

A utilização de óleos insaturados é descrita como uma das causas da síndrome da depressão de gordura do leite (Milk Fat Depression - MFD), quando fornecida para vacas leiteiras em lactação. Esta síndrome é extensamente descrita e revisada na literatura (BAUNGARD et.al., 2000; BAUMAN & GRIINARI, 2001; STAPLES, 2006; BAUMAN et al., 2011), tendo sido demonstrado recentemente que o acúmulo de ácidos graxos intermediários da biohidrogenação, principalmente ácidos graxos *trans*-10, afetam a síntese de gordura do leite em nível celular na glândula mamária (BAUMAN et al., 2011) .

Os ácidos graxos (AG) do leite bovino apresentam em sua composição típica 70–80% de ácidos graxos saturados e 20 - 30% de insaturados (JENKINS & LUNDY, 2001). Alguns destes AG saturados, dentre os quais os ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), são relatados como potencial precursores de elevações no colesterol sanguíneo de baixa densidade (LDL), estando este relacionado com o aparecimento de doenças cardiovasculares (PARODI, 1999; CHILLIARD & DOREAU, 2001).

As recomendações de restrição ao consumo humano de alimentos ricos em gorduras saturadas pelas sociedades médicas já há várias décadas, principalmente pela associação com doenças cardíacas, e mediante a possibilidade de manipular o teor de gordura do leite e seu perfil de ácidos graxos, através da suplementação com fontes de gordura na dieta de bovinos, oferece uma vasta área de interesse na pesquisa científica. Segundo Demeyer & Doreau (1999), é interessante aumentar a participação de ácidos graxos insaturados, na composição da gordura do leite, pois estes AG possibilitam redução da incidência de doenças coronarianas, através da alteração nas concentrações sanguíneas de colesterol de baixa densidade (LDL) e colesterol de alta densidade (HDL).

Uma diminuição no teor de gordura do leite pode ser feita pela redução no teor de fibra da dieta, principalmente por redução na fração fisicamente efetiva, e aumento do fornecimento de componentes rapidamente fermentáveis (carboidratos não fibrosos - CNF) no concentrado, entretanto, essa alteração na relação volumoso:concentrado pode acarretar em prejuízos a saúde animal, gerando distúrbios como acidose, por exemplo.

A utilização de lipídeos na dieta de forma suplementar, principalmente fontes de gordura insaturadas como óleos vegetais e óleo de peixe, é capaz de promover o mesmo decréscimo no teor de gordura do leite sem, no entanto, comprometer a saúde do animal, além de produzir, de acordo com o perfil de ácidos graxos da gordura utilizada, modificações no perfil de ácidos graxos do leite (STEGEMAN et al., 1992; HAYASHI, 2003).

Quando as vacas são alimentadas com gordura, a eficiência energética da síntese do leite é aumentada (CANT et al., 1993). Isso pode ser explicado pelo aumento na eficiência produtiva de vacas leiteiras suplementadas por meio de uma combinação de efeitos calóricos e não calóricos. Efeitos calóricos são atribuíveis a um maior conteúdo de energia e eficiência energética dos lipídios em relação aos carboidratos e proteínas, conforme já mencionado. .

Os efeitos não calóricos podem ser atribuídos ao fato da suplementação lipídica de vacas leiteiras, principalmente na forma de gorduras livres, alterar a relação acetato:propionato no rúmen, diminuindo a produção de acetato em relação ao propionato, sendo o acetato um dos precursores da *síntese de novo* de ácidos graxos pela glândula mamária. O propionato por sua vez, é o principal precursor da glicose em ruminantes através da gliconogênese hepática. Assim sendo, a suplementação de ácidos graxos insaturados na dieta proporciona economia energética na síntese do leite, por diminuição da síntese de gordura láctea e pela incorporação direta de lipídios da dieta na gordura do leite (SANTOS, 2002), e melhora da disponibilidade de glicose para outras funções fisiológicas (produção de leite, por exemplo), além de poder alterar perfil de ácidos graxos do leite.

Para compreender como a nutrição influencia composição de gordura de leite, é importante compreender como ocorrem as vias metabólicas para a síntese de gordura do leite. Segundo GRUMMER (1990), os triglicerídeos compreendem mais de 97% da gordura do leite, sendo os ácidos graxos seu constituinte primário. Estes ácidos graxos são derivados de duas fontes principais: o Acetato e o β -hidroxibutirato provenientes da fermentação ruminal de carboidratos, principalmente de carboidratos fibrosos, e de ácidos graxos de cadeia longa presentes na dieta, que são diretamente transferidos do sangue circulante para a glândula mamária após a absorção intestinal.

A formação dos ácidos graxos do leite a partir de Acetato e β – hidroxibutirato pela glândula mamária é chamada "*síntese de novo*". Esta *síntese de novo* é catalisada por duas enzimas: a Acetil CoA carboxilase (ACC) e a Ácido Graxo sintetase (AGS).

Esta é a via que dá origem aos ácidos graxos de cadeia curta e média do leite, com cadeias de 4 a 14 átomos de carbono (C4:0 a C14:0), e de aproximadamente metade do ácido palmítico (C16:0) presente na gordura do leite. A outra metade do ácido palmítico e os demais ácidos graxos de cadeia longa são derivados de lipídios circulantes no sangue proveniente da absorção intestinal (GRUMMER, 1990).

Durante a biohidrogenação, a conversão de CLA (cis-9, trans-11 C18:2) em ácido vacênico (trans-11 C18:1) é mais rápida que a hidrogenação deste último até ácido esteárico (GRIINARI et al., 1997; HARFOOT & HAZELWOOD, 1997), justificando assim a tendência de acúmulo de ácido *trans* vacênico nos produtos finais. A conversão de ácido vacênico (trans-11 C18:1) em ácido esteárico (C18:0), parece envolver um grupo diferente de microrganismos e ocorre a uma taxa mais lenta (GRIINARI et al., 1997).

Além disso, o fornecimento de rações com grande inclusão de fontes lipídicas ricas em ácidos graxos insaturados, promove inibição da etapa final do processo de biohidrogenação, talvez por ultrapassar a capacidade limite das bactérias em biohidrogenar os ácidos graxos totalmente, aumentando significativamente a concentração de ácido vacênico (trans-11 C18:1) (PALMQUIST & MATTOS, 2006). Este ácido graxo é capaz de servir como substrato para atuação da enzima Δ^9 -dessorase (redutase) nos tecidos animais, resultando na síntese endógena de CLA.

2.7 Perfil de ácidos graxos e ácido linoléico conjugado (CLA)

Atualmente, considera-se uma alimentação saudável para humanos a que propicie a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), ácido linolênico e ácido linoleico conjugado (CLA), tendo em vista que a ingestão de alimentos ricos em ácidos graxos poli-insaturados (ômega 6 e ômega 3) tem sido associada com redução no risco de doenças cardiovasculares (LORGERIL & SALEN, 2002; NÖRNBERG, 2003).

O termo ácido linoleico conjugado (CLA) é utilizado para denominar isômeros específicos do ácido linoleico (C18:2) que apresentam duas duplas ligações adjacentes uma a outra.

Ácido linoleico conjugado (CLA) é, portanto, a denominação empregada a um grupo heterogêneo de isômeros posicionais e geométricos de ácidos graxos insaturados, que são encontrados predominantemente no leite e derivados lácteos, carnes e demais produtos com origem na exploração pecuária de ruminantes (BENJAMIN & SPENER, 2009).

O ácido rumênico (cis-9, trans-11 CLA) representa 75 a 90% do total de CLA na gordura do leite, e a sua presença está diretamente correlacionada com a biohidrogenação de ácidos graxos polinsaturados no rúmen, e atuação de enzimas nos tecidos animais. O cis-9, trans-11 CLA (Ácido Rumênico) é formado no rúmen como primeiro intermediário da biohidrogenação do ácido linoléico, pela ação da enzima ácido linoleico isomerase, proveniente da bactéria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens* que isomeriza o ácido linoleico preferencialmente para as formas cis-9 e trans-11 (BAUMAN & GRIINARI, 1999; BAUMAN & GRIINARI, 2003).

O ácido linolênico atravessa um processo de biohidrogenação semelhante ao ácido linoleico e também é capazes de produzir ácido vacênico trans-11 C18:1 e ácido esteárico C18:0, mas não parecem dar origem ao ácido linoleico conjugado como um intermediário do processo de biohidrogenação ruminal, entretanto, em experimento com infusão duodenal de ácido vacênico trans-11 C18:1 (12,5 g / dia) (GIINARI, et al., 2000), promoveu aumento no teor de cis-9, trans -11 CLA na gordura do leite de 31%, sendo este aumento atribuído a atuação da enzima delta 9 dessaturase endógena, capaz de adicionar uma dupla ligação na posição cis-9 ao ácido vacênico C18:1 trans-11, originado assim cis-9, trans-11 CLA.

Outra via de formação de CLA nos ruminantes ocorre pela desaturação do ácido graxo trans Vacênico (trans-11 C18:1), por enzima presente na glândula mamária e tecido adiposo chamada Delta-9 desaturase (CORL et al., 1999). Segundo alguns autores, ao contrário do que se pensava há algum tempo, esta é a via responsável por maior parte da síntese de CLA em ruminantes, e não somente a biohidrogenação ruminal (CORL et al., 1999; GRIINARI et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2004).

Embora o ácido cis-9, trans-11 CLA seja o isômero predominante no leite bovino, outros isômeros podem ser formados com ligações duplas nas posições 8/10, 10/12 ou 11/13. Cada uma destas ligações duplas podem ter uma configuração *cis* ou *trans*, dando origem a uma gama de possíveis isômeros de CLA (SONG & KENNELLY, 2002).

O ácido linoleico conjugado (CLA) tem sido relacionado por seus efeitos anticarcinogênicos, antiaterogênicos, aumento da resposta imune, redução dos depósitos lipídicos corporais, e ainda, efeito antidiabético para a saúde humana (TANAKA, 2005; PARIZA, et al., 1999; BAUMAN et al. 2005).

A possibilidade de aumento da presença do CLA no leite bovino por manipulação da dieta, e sua associação com a saúde humana, amplia as

possibilidades da pesquisa científica em aumentar a concentração de CLA por manipulação da dieta, demonstrando a viabilidade de produzir lácteos naturalmente enriquecidos com CLA.

A atenção com alimentação saudável e de qualidade por parte dos consumidores, aliado a possibilidade de consumo de alimentos com reconhecidas propriedades nutracêuticas vem aumentando nas últimas décadas. Assim sendo, diminuição do teor de gordura do leite pela adição de ácidos graxos poli - insaturados na dieta de vacas leiteiras, associado ao incremento nas concentrações de CLA no leite, poderá atender um novo mercado de oportunidades ao leite e aos seus derivados, tais como manteiga, requeijão e queijos, melhorando a imagem dos produtos lácteos junto ao consumidor.

Choinard et al. (1998) e Kelly et al. (1998) indicaram que o CLA foi derivado principalmente da suplementação de ácido linoleico (cis-9, cis12 C18:2) na dieta. No entanto, durante a biohidrogenação de ácido linolênico há igual formação de ácido vacênico, podendo este dar origem ao CLA nos tecidos adiposo e glândula mamária por desaturação, feito pela enzima Δ^9 - dessaturase.

Dhiman et. al. (2000) utilizando dietas com óleo de soja (rico em C18:2) ou óleo de linhaça (rico em C18:3) concluíram que a suplementação da dieta de vacas em lactação com estas fontes lipídicas aumentaram o teor de CLA do leite. A alimentação com óleo livre diminuiu o teor de gordura total do leite, mas o grande aumento no teor de CLA do leite de vacas alimentadas com óleos resultou num aumento da produção diária de CLA por vaca. Ainda neste estudo, a inclusão do óleo de soja em 2% da matéria seca da dieta resultou num aumento de 237% no teor de CLA do leite quando comparado com o grupo controle (sem adição de óleo).

Igualmente Santos (2001) utilizando fontes de gordura na dieta na forma de grãos de soja moído ou óleo de soja para obter 7% de extrato etéreo (EE) na matéria seca total (MS), e comparando os resultados com um grupo controle (com 3% de EE na dieta e sem adição de fonte de lipídios na dieta), observou aumento de CLA na gordura do leite. Estes resultados, portanto, demonstram que a adição de óleo não protegido à dieta aumenta o teor de CLA, conforme observado por McGuire et al. (1996) e Griinari et al.(1996).

Santos (2001) observou ainda que as fontes de lipídios utilizadas nas dietas experimentais, diminuiram o total de ácidos graxos saturados do leite, principalmente

no grupo alimentado com óleo de soja, e tenderam a aumentar o total de ácidos graxos insaturados.

A diminuição do teor de ácidos graxos saturados de cadeia curta na gordura do leite, principalmente em dietas contendo óleo livre, pode ser explicada em função do menor suprimento de ácidos acético e butírico, alterando a relação acetato:propionato ruminal, com diminuição na produção destes ácidos graxos voláteis por ação microbiana ruminal. Tanto ácido acético como o butírico são utilizados na *síntese de novo* dos ácidos graxos de cadeia curta do leite na glândula mamária (JENKINS, 1995). A redução do teor de ácidos graxos saturados de cadeia curta ocorre também devido ao aumento no fornecimento de lipídios ricos em ácidos graxos insaturados na dieta, em que parte destes escapa do processo de biohidrogenação ruminal, sendo absorvidos no intestino delgado e incorporados diretamente ao leite, poupando assim etapas metabólicas.

2.8 Efeito da suplementação de gordura no surgimento da síndrome de depressão da gordura do leite

Dietas que induzem o aparecimento da síndrome de depressão da gordura do leite são classicamente observadas em vacas sendo alimentadas com dietas altamente fermentescíveis, ou dietas que contenham óleo vegetal ou óleo de peixe como fonte de suplementação lipídica (BAUMAN et al., 2011).

Grandes variações do teor de gordura do leite são comumente observadas dentro da mesma espécie animal, sendo a magnitude desta variação muito superior à observada para os demais componentes do leite (lactose, proteína e outros nutrientes presentes em menores quantidades). Por exemplo, não é incomum verificar, dentro de um mesmo rebanho de vacas leiteiras, teores de gordura variando de 2,0 a 5,0% (BAUMAN & GRIINARI, 2003).

A Depressão da Gordura do leite (DGL) foi relatada pela primeira vez em 1885, quando Boussingault observou redução na produção de gordura do leite quando beterrabas foram utilizadas na alimentação de vacas leiteiras, sendo referido por Van Soest (1994).

Griinari & Bauman (2001) definiram o aparecimento desta síndrome como resultado da interação entre fatores ligados ao processo digestivo do bovino e o metabolismo tecidual.

Diversos fatores ligados à alimentação podem levar à diminuição no teor e na síntese de gordura do leite, dentre eles estão as dietas ricas em carboidratos de rápida fermentação ruminal ou dietas pobres em fibra (relação volumoso:concentrado inferior a 40:60), ou onde a fonte de fibra da dieta é pouco efetiva em manter e estimular a ruminação, promovem queda de pH do rumen a valores inferiores a 6. Abaixo desse valor de pH, ocorrem alterações severas na microbiota ruminal com o desaparecimento de espécies celulolíticas e protozoários, diminuindo a degradação da fração fibrosa do alimento pela microbiota e conseqüentemente diminuindo a produção dos ácidos graxos voláteis acético e butirico, ambos envolvidos na *síntese de novo* de ácidos graxos na glândula mamária.

Em situações de dietas com grande inclusão de concentrado, a adição de tamponantes na dieta minimiza as alterações na fermentação ruminal e pode restaurar a níveis normais a produção de gordura do leite (KENNELLY et al., 1999). Além disso, a diminuição do pH ruminal afeta negativamente a biohidrogenação ruminal de ácidos graxos poliinsaturados, aumentando a concentração de intermediários da biohidrogenação, levando a maior absorção intestinal desses ácidos graxos pelo ruminante.

A descoberta de alterações na produção de gordura do leite em animais suplementados com gordura, feitas por Davis e Brown (1970), correlacionando à presença de ácidos graxos *trans* – C18:1 com a diminuição na produção de gordura do leite, foi a chave para dar início às pesquisas sobre DGL.

Posteriormente, Bauman e Griinari (2001), propuseram que a indução dietética da DGL era devido a uma inibição na síntese de lipídios em nível de glândula mamária por ação de ácidos graxos específicos, produzidos durante a biohidrogenação ruminal de ácidos graxos poliinsaturados.

Em recente estudo, Bauman et al. (2011), descreve que os avanços no conhecimento da biohidrogenação ao longo da última década, permitiram determinar que a ocorrência de DGL envolve uma inter-relação entre o processo de fermentação ruminal da dieta e a síntese mamária de gordura do leite. Este mesmo autor cita que a DGL induzida pela dieta é frequentemente encontrado na produção leiteira moderna, e sua ocorrência exige duas condições: (a) alteração no ambiente do rúmen com mudança na microbiota ruminal comumente relacionada à alteração de pH no rúmen, e (b) a presença de ácidos graxos poliinsaturados na dieta.

Com o objetivo de comprovar os efeitos de ácidos graxos formados pela incompleta biohidrogenação ruminal, Baungard et al. (2000) utilizando a infusão abomasal em bovinos de leite de isômeros relativamente puros, observaram que a infusão abomasal de *trans*-10, *cis*-12 CLA resultou numa diminuição imediata na síntese de gordura do leite, enquanto que o isômero *cis*-9, *trans*-11 CLA (ácido rumênico) não demonstrou ter efeito na indução da DGL.

Atualmente, o isômero *trans*-10, *cis* – 12 CLA é considerado como principal isômero responsável pela DGL, com trabalhos científicos inclusive demonstrando as relações dose – resposta na diminuição do teor de gordura do leite. Entretanto, diversos outros isômeros formados durante a biohidrogenação ruminal de ácidos graxos poliinsaturados estão atualmente sendo estudados a fim de determinar seus efeitos na DGL, e futuramente poderão ser incluídos como corresponsáveis pelo efeito do *trans*-10, *cis* – 12 CLA no aparecimento da síndrome de DGL. Palmquist & Griinari (2006) em experimento utilizando uma dieta basal com óleo de girassol e substituição deste em proporções fixas por óleo de peixe (0; 33; 66 e 100% de substituição), observou que os ácidos graxos do óleo de girassol (rico em ácido linoleico), ou os seus metabólitos, inibem mais fortemente a *síntese de novo* de ácidos graxos na glândula mamária do que os ácidos graxos de óleo de peixe.

2.9 Efeito da suplementação de gordura no perfil metabólico sanguíneo e perfil hepático

Segundo GONZÁLEZ & SILVA (2008), a determinação e interpretação de compostos químicos no sangue é uma das principais aplicações práticas da Bioquímica Clínica. Os perfis bioquímicos do plasma podem ser utilizados em veterinária não somente para avaliação clínica individual, mas também para avaliar e monitorar a condição nutricional e metabólica em grupos de animais. Quando interpretado adequadamente, o perfil bioquímico do plasma fornece importante informação com relação ao estado clínico, metabólico e produtivo de um animal.

Porém, alterações nos perfis laboratoriais não devem ser consideradas como diagnóstico definitivo, senão uma ajuda no diagnóstico, devendo-se levar em consideração demais fatores que possam alterar estes parâmetros, como raça, idade, estágio produtivo, doenças concomitantes, entre outras.

A intensificação nos sistemas de produção animal tem levado a um aumento do risco de aparecimento de transtornos metabólicos nos rebanhos leiteiros uma vez que

o desafio metabólico imposto pela maior produtividade favorece o desequilíbrio entre o aporte de nutrientes no organismo, capacidade de metabolização desses componentes e os níveis de produção alcançados (GONZÁLEZ, 2000; WITTWER, 2000). Durante várias décadas a análise dos componentes sanguíneos tem sido a forma mais frequente de conhecer e interpretar o estado de saúde da vaca leiteira, basicamente no que se refere a seu estado metabólico (WITTWER, 2000).

Variações dos componentes do perfil metabólico sanguíneo em vacas leiteiras podem estimar o processo de adaptação metabólica a novas situações fisiológicas ou de alimentação. Transtornos como cetose ou desequilíbrios no metabolismo proteico ou mineral podem ser detectados através da análise direta do perfil metabólico (PAYNE & PAYNE, 1987).

Os componentes bioquímicos sanguíneos mais comumente determinados no perfil metabólico representam as principais vias metabólicas do organismo, das quais a glicose, o colesterol total e suas frações, os triglicerídeos, os ácidos graxos não esterificados (AGNE) e o beta-hidroxibutirato (β -HB) representam o metabolismo energético, enquanto uréia, albumina, proteínas plasmáticas totais, dentre outras, representam o metabolismo proteico.

Outros metabólitos ligados ao metabolismo animal igualmente estudados são a atividade de certas enzimas no plasma, entre as quais se destaca as enzimas ligadas ao funcionamento hepático tais como as enzimas AST (aspartatoaminotransferase) e GGT (gama-glutamilttransferase) (GONZALEZ, 1997).

González e Silva (2008) explicam que o estudo da atividade enzimática no sangue é de grande ajuda diagnóstica, várias das quais são incluídas no estudo do perfil metabólico sanguíneo. Segundo estes autores, a medição da atividade enzimática no plasma como ajuda diagnóstica está fundamentada nos seguintes conceitos:

(a) No plasma sanguíneo podem ser encontradas enzimas cuja síntese e funções são exercidas em nível intracelular, mas que podem sair para a corrente circulatória, após a morte celular. Sob condições normais, essas enzimas têm baixa atividade no plasma.

(b) Como a concentração intracelular das enzimas é bem maior que no plasma, danos celulares relativamente pequenos podem levar a aumentos significativos da atividade das enzimas no plasma.

(c) Aumentos da atividade enzimática no plasma permite fazer inferência sobre o lugar e o grau do dano celular, uma vez que muitas enzimas são específicas de órgãos.

(d) Os níveis enzimáticos no plasma estão influenciados pela velocidade com que entram na corrente circulatória, o que por sua vez depende do dano celular e pela taxa de inativação enzimática (meia-vida da enzima).

(e) O evento que interessa na determinação enzimática é o aumento da atividade, não tendo geralmente importância sua diminuição.

2.9.1. Glicose

Nos animais, assim como no homem, vários metabólitos são usados como combustível para a oxidação respiratória, a glicose é considerada o mais importante, sendo vital para funções tais como o metabolismo do cérebro e na lactação. O nível de glicose sanguínea pode indicar falhas na homeostase, como ocorre em doenças tais como as cetoses e na diabetes. Nos ruminantes, o principal precursor de glicose é o ácido propiônico, seguido por aminoácidos (VAN SOEST, 1994).

Em ruminantes, pouca glicose proveniente do trato digestivo entra na corrente sanguínea em função da extensa fermentação de carboidratos solúveis no rúmen. O fígado é o órgão responsável pela sua síntese a partir de moléculas precursoras na via gliconeogênica. Assim, o ácido propiônico atende cerca de 50% dos requerimentos de glicose, os aminoácidos gliconeogênicos contribuem com 25% e o ácido láctico com 15%. Outro precursor importante é o glicerol, proveniente da quebra de triacilgliceróis a partir do tecido adiposo (GONZÁLEZ & SILVA, 2008).

Nesses animais o nível de glicose sanguínea apresenta poucas variações (PAYNE & PAYNE, 1987) em função dos mecanismos homeostáticos bastante eficientes do organismo, os quais envolvem o controle endócrino por parte da insulina e do glucagon sobre o glicogênio, e dos glicocorticoides sobre a gliconeogênese. Quando o fornecimento energético é inadequado, esses hormônios estimulam a degradação de glicogênio hepático e a síntese de nova glicose no fígado e quando o balanço energético se torna negativo, estimulam a mobilização de triglicerídeos para fornecer ácidos graxos como fonte de energia e glicerol como precursor de glicose hepática.

É explicado por González e Silva (2008) que estados hipoglicêmicos em vacas leiteiras estão associados à ocorrência de cetose e deficiências severas de energia ou, em menor grau, como consequência de elevadas produções de leite (acima de 30 kg

de leite/dia). Este fato é perfeitamente compreensível, uma vez que a glicose circulante é precursora da lactose (principal carboidrato do leite), um dos principais componentes osmóticos do leite e, portanto, essencial para a máxima produção. Por conseguinte, a diminuição nos níveis plasmáticos de glicose pode levar a diminuição da produção de leite, como forma de compensação.

Em vacas de alta produção, os requerimentos energéticos devem ser atendidos pela alimentação adequada e gliconeogênese hepática normal. Assim sendo, é imprescindível o aporte energético através da alimentação para vacas em lactação, bem como o perfeito funcionamento hepático para gliconeogênese.

A adição de fontes de gordura suplementar tende a diminuir a oxidação de glicose (efeito poupador de glicose) e aumentar a sua disponibilidade para a produção de leite (GRUMMER & CARROLL 1991; PALMQUIST & JENKINS, 1980). No entanto, a diminuição na oxidação da glicose geralmente não é observável a partir dos níveis de glicose no sangue devido ao efeito homeostático. Palmquist & Conrad (1978) não observaram alterações significativas nas concentrações de glicose sanguínea, em experimento envolvendo suplementação de grandes quantidades de óleo vegetal na dieta de vacas em lactação.

Gaafar (2004) comenta que em geral, as concentrações de glicose no sangue de vacas suplementadas com gordura não são alteradas ou apresentam discreta diminuição.

2.9.2. Colesterol

Normalmente a digestibilidade dos lipídeos no intestino delgado dos ruminantes é de 80 a 90%. Durante o processo de absorção, após a hidrólise dos triglicerídeos, a maior parte dos ácidos graxos é reesterificada nos enterócitos para triglicerídeos, fosfolipídios e ésteres de colesterol (KOZLOSKI, 2012).

O colesterol é armazenado nos tecidos na forma esterificada, sendo o precursor dos hormônios esteróides do organismo, como corticosteroides, hormônios sexuais, ácidos biliares e vitamina D. Aproximadamente 50% do colesterol se originam no fígado, 15% no intestino e uma grande proporção do restante, na pele. A síntese ocorre a partir do Acetil-CoA, que por sua vez, provém do ácido acético produzido no rúmen pela fermentação da fibra da dieta, dependendo do estado nutricional (KANEKO, 2008).

Valores elevados de colesterol em animais de alta produção sugerem que este metabólito possa ser um indicador da habilidade da vaca em produzir leite, como reflexo da mobilização lipídica das reservas corporais para lactogênese (GONZÁLEZ E ROCHA, 1998).

O colesterol circula no plasma ligado às lipoproteínas, com diferentes densidades, denominadas frações do colesterol total (COL_{HDL} , COL_{IDL} , COL_{LDL} e COL_{VLDL}), sendo que cerca de 2/3 do colesterol está esterificado com ácidos graxos. Os níveis de colesterol plasmático são indicadores adequados do total de lipídios no plasma, pois correspondem a aproximadamente 30% do total.

Efeitos da suplementação lipídica sobre o aumento da concentração plasmática de colesterol têm sido citados na literatura (JENKINS & JENNY, 1989; ELLIOTT et al., 1993; NÖRNBERG et al., 2003; LÓPEZ et al., 2004; SCHAFHÄUSER, 2005). Este tem sido atribuído a uma maior demanda de colesterol para digestão, absorção e transporte de lipídeos (SCHAUFF et al., 1992; DRACKLEY & ELLIOTT, 1993; BRUSS, 2008).

2.9.3. Triglicerídeos

Os triglicerídeos são a principal forma de armazenamento de ácidos graxos no tecido adiposo, e são compostos por uma molécula de glicerol ligada a três moléculas de ácidos graxos de cadeia longa. Embora a maioria das células tenha capacidade de sintetizar triglicerídeos, esta ocorre principalmente no fígado, tecido adiposo, glândula mamária e intestino delgado (BRUSS, 2008).

Nos bovinos, cerca de 90% da síntese de ácidos graxos e triglicerídeos ocorrem no tecido adiposo, onde o principal precursor é o acetato. Em animais não lactantes e não gestantes, aproximadamente um terço do acetato absorvido é armazenado como triglicerídeo (KOZLOSKI, 2012).

Assim como ocorre com o colesterol, verifica-se aumento dos níveis séricos de triglicerídeos no período absorptivo pós-prandial. Durante o processo de absorção dos lipídios nos enterócitos, parte dos ácidos graxos é reesterificada a triglicerídeos, que são incorporados nas lipoproteínas (principalmente VLDL). Estas são liberadas na circulação linfática e, posteriormente, atingem a circulação sanguínea e são direcionadas aos tecidos periféricos (KOZLOSKI, 2012).

Os níveis séricos de triglicerídeos em ruminantes são baixos comparados aos não ruminantes, o que reflete a baixa capacidade de síntese hepática de triglicerídeos nos primeiros. Entretanto, após a ingestão de dietas com alta densidade energética

(ricas em amido), ocorre aumento da síntese hepática de ácidos graxos a partir das elevadas quantidades de acetato e propionato que chegam ao fígado (BRUSS, 2008), resultando em aumento da exportação de triglicerídeos na forma de VLDL.

Diversos autores relatam uma elevação na concentração sérica de triglicerídeos (TRIG) em função da suplementação lipídica (PALMQUIST & CONRAD, 1978) em razão da maior absorção intestinal de gorduras (JENKINS & JENNY, 1989; LÓPEZ et al., 2004). Entretanto, os resultados descritos na literatura a esse respeito são bastante variáveis, visto que embora muitos trabalhos demonstrem efeito da suplementação lipídica sobre este metabólito, outros estudos não encontraram efeito (BERMUDES, 1999; SCHAFHÄUSER, 2005).

Comumente, elevados níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos são indicativos de balanço energético positivo, com conseqüente lipogênese.

2.9.4. Uréia

A uréia é um produto de excreção do metabolismo do nitrogênio e a sua determinação em amostras de soro sanguíneo, junto com a albumina, revelam informação sobre a atividade metabólica proteica do animal. A concentração sanguínea de uréia está em relação direta com o aporte proteico da ração, bem como da relação energia: proteína. Valores baixos de uréia no sangue dos animais são encontrados em rebanhos que utilizam dietas deficitárias em proteínas e valores altos naqueles que utilizam dietas com excessivo aporte proteico ou com déficit de energia (GONZALEZ & SILVA, 2008).

No bovino, de 60% a 80% da proteína são transformados em amônia no rúmen, onde são utilizados pelos microrganismos ruminais para a síntese de suas proteínas estruturais, sendo o excedente absorvido através da parede ruminal para a circulação portal. A amônia absorvida chega ao fígado via sanguínea, onde é transformada em uréia, a qual é excretada, uma parte por via renal enquanto que uma fração volta ao rúmen através da saliva, ou por difusão da parede ruminal reintegrando-se ao ciclo. Isso ocorre com a fração correspondente à proteína degradável, a qual está acompanhada no alimento por proteínas não degradáveis que escapam à utilização ruminal, sendo absorvidas na forma de aminoácidos no intestino delgado. A diminuição da ingestão de energia na forma de carboidratos influi inversamente na concentração de amônia ruminal devido à redução da síntese proteica microbiana, elevando a concentração de uréia sanguínea. Neste aspecto, a gordura dietética não é capaz de

ser utilizada como fonte energética pelos microrganismos do rúmen para sua multiplicação.

Segundo González & Silva (2008), é importante diferenciar e salientar a forma como se expressa o resultado dessa variável para que não ocorram erros de interpretação dos resultados. Podem ser feitas dosagens sanguíneas de uréia ou de nitrogênio uréico (N-uréico), entretanto se deve salientar que o valor de uréia é 2,14 vezes maior que o valor de N-uréico.

Aumentos nas concentrações plasmáticas de uréia e/ou N-uréico em função da suplementação com lipídios são relatadas (LÓPEZ, 2001; SCHAFHÄUSER, 2005), no entanto, Nörnberg (2003) usando como fontes de suplementação lipídica o sebo, óleo de arroz e sais de cálcio de ácidos graxos nas dietas experimentais não observou diferenças nas concentrações plasmáticas de N-uréico nos diferentes tratamentos.

Aumentos nas concentrações de uréia plasmática e/ou N-uréico em dietas isoenergéticas contendo gordura, têm sido atribuídas à diminuição na disponibilidade de carboidratos não fibrosos (CNF) nas dietas em razão da substituição de parte dos ingredientes energéticos da dieta por gordura, aumentando a concentração de amônia a nível ruminal e conseqüentemente de uréia no plasma. No entanto, o excesso de proteína não degradável no rúmen (PNDR) produzem alterações semelhantes, uma vez que a fração nitrogenada (aminoácidos) absorvida a nível intestinal é igualmente eliminada pelo mesmo processo de síntese hepática da uréia, bem como o excesso de proteína degradável no rúmen (PDR) em dietas deficientes em energia por aumento no catabolismo proteico no tecido muscular.

2.9.5. Ácidos Graxos Não Esterificados (AGNE)

Os ácidos graxos não esterificados (AGNE) no sangue podem ser de origem exógena, provenientes da digestão e absorção de gorduras ou endógena, provenientes da lipólise dos triglicerídeos armazenados no tecido adiposo (GONZÁLEZ & SILVA, 2008).

O metabolismo de AGNE no plasma é bastante significativo do ponto de vista energético, uma vez que estes compostos são fontes de energia para o metabolismo de alguns tecidos de forma prontamente disponível (PALMQUIST & MATTOS, 2006).

Os AGNE são direcionados a produção de energia pela via da β -oxidação no fígado, no tecido muscular esquelético e no coração (BRUSS, 2008).

No período absorptivo, os ácidos graxos que chegam ao fígado podem ser incorporados às lipoproteínas de muito baixa densidade (Colesterol VLDL) e liberados na circulação. Estes podem ser direcionados para duas rotas metabólicas: quando a demanda energética do animal encontra-se atendida, os ácidos graxos são transportados ao tecido adiposo e armazenados na forma de triglicerídeos; por outro lado, se a demanda energética não está sendo atendida, os ácidos graxos são transportados aos tecidos periféricos e oxidados para produzir energia (PALMQUIST & MATTOS, 2011). As concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNE) ou ácidos graxos livres (AGL) no plasma são usadas para indicar a mobilização de gordura durante período de insuficiente consumo de energia. A explicação seria a hidrólise dos triglicerídeos pela ação da lipase lipoprotéica e pela lipomobilização que é estimulada (PALMQUIST & CONRAD, 1978).

Segundo González & Silva (2008), existe correlação positiva entre os níveis sanguíneos de AGNE e de corpos cetônicos. Assim sendo, a oxidação excessiva de ácidos graxos, junto com a deficiência aguda de energia na dieta, provoca, em alguns casos, a cetose. Ainda segundo os autores, a maioria das vacas de alta produção têm algum grau de cetose subclínica no início da lactação em função do balanço energético negativo nesse período crítico, sendo diferentes entre indivíduos de um rebanho a habilidade metabólica para contornar o problema e evitar a manifestação de sintomas.

2.9.6. – Aspartato aminotransferase (AST)

A enzima Aspartato Aminotransferase (AST) é uma enzima citosólica e mitocondrial com presença abundante nos hepatócitos, células musculares esqueléticas e células cardíacas. O aumento da atividade da AST no soro sanguíneo ocorre tanto em casos de lesão reversível como irreversível para hepatócitos, colestase e lesão muscular. Entretanto a etiologia do aumento não pode ser identificada somente pelo aumento de atividade dessa enzima no soro, servindo apenas para demonstrar que houve lesão celular no tecido hepático ou muscular. Para diferenciação entre as lesões hepatocelulares ou lesão dos miócitos, outros testes podem ser empregados utilizando-se enzimas específicas dos órgãos suspeitos.

Em bovinos, a sensibilidade é relatada para ser 94% para lipidose hepática (WEST, 1991 citado por KANEKO et al., 2008).

A determinação da atividade sérica desta enzima é rotineiramente utilizada na medicina equina e em alimentos de origem animal como teste de triagem para danos

em ambos os tecidos, muscular e hepático. A atividade sérica da AST é prontamente disponível no perfil bioquímico e estável durante dias no soro à temperatura ambiente, ou em amostras refrigeradas ou congeladas.

Segundo González & Silva (2008), em ruminantes a AST é um bom indicador do funcionamento hepático. Assim, seus níveis sanguíneos são utilizados em vacas no pré-parto para monitorar doenças metabólicas durante o pós-parto, especialmente em vacas de alta produção. Vacas com altos valores de AST antes do parto (>35 U/l) têm mais tendência a sofrer problemas de infertilidade, paresia puerperal e retenção de placenta do que vacas com baixos valores (<25 U/l). Valores altos de AST e baixos de colesterol e de albumina revelam, com razoável certeza, transtornos na função hepática.

Plantas hepatotóxicas que causem necrose hepática, como *Cestrum parqui* e *Xanthium cavalinense* são causas possíveis de aumento da AST. *Senna occidentalis* e outras que causam extensa necrose muscular podem ter o mesmo efeito.

Comumente o aumento da atividade plasmática da aspartatoaminotransferase (AST) indica insuficiência hepática aguda em diversas espécies, entretanto, como mencionado anteriormente não é muito específica, pois pode indicar também problemas musculares, entre outros. Porém, quando o fígado sofre infiltração de gordura, é produzida uma lesão das células hepáticas e as enzimas indicadoras de injúria (aspartato aminotransferase - AST e gama glutamiltransferase - GGT) têm sua atividade aumentada no soro (BOBE et al., 2004).

2.9.7. Gama-glutamiltransferase (GGT)

A gama glutamiltransferase (GGT) é uma enzima presente na superfície celular dos hepatócitos, células do epitélio biliar e ductos, células epiteliais dos túbulos renais e da glândula mamária (principalmente em animais em lactação). Aumentos na concentração sérica dessa enzima são interpretados como compatíveis com lesões nos órgãos que as contêm, entretanto, lesões renais induzem aumento da concentração dessa enzima na urina, não sendo detectável aumento de sua atividade no sangue. O aumento na concentração sérica desta enzima no sangue ocorre em afecções hepatobiliares que cursam com colestase (DIRKSEN, 1993), sendo recomendada a realização de biópsia hepática a fim de determinar a intensidade das lesões (SANTOS et al., 2007).

A GGT do plasma é de origem hepática, sendo indicativa de colestases, lesão de ductos biliares em todas as espécies, aumentando também na cirrose e no colangiocarcinoma.

Em bovinos, se relata elevação da atividade da GGT em vacas leiteiras com lipidose hepática e em animais infestados com *Fasciola hepatica*, nos quais os níveis de GGT estão aumentados cerca de 6 semanas após a infecção. Seu aumento no plasma é indicativo de insuficiência hepática crônica (tumor, colestase).

Gregory et al., 1999, afirmam e propõem que, nas condições brasileiras, os valores da atividade sérica da AST, em bovinos saudáveis, não deveriam exceder 50U/l, enquanto para a GGT não deveriam ultrapassar 25U/l. Quando os valores da AST forem maiores do que 50U/l e menores do que 100U/l, não estando associados a um aumento nos valores da creatinina-quinase (CK), e os valores da GGT forem maiores do que 25U/l e menores do que 50U/l ficaria caracterizada uma alteração da função hepática, indicativo de que o fígado está sendo lesado ou sobrecarregado e, portanto, poderiam ser utilizados para o reconhecimento precoce de enfermidades no fígado. Nessas condições seriam recomendadas modificações no sistema de criação e produção, principalmente em relação ao manejo alimentar, pois só assim seria minimizada a incidência de distúrbios crônicos do fígado e o consequente descarte precoce do animal afetado. Quando os valores da AST forem maiores do que 100U/l, não estando associados ao aumento nos valores da creatinina-quinase (CK), e os valores da GGT forem maiores do que 50U/l estaria caracterizada a insuficiência hepática aguda do bovino examinado.

3. Material e Métodos

3.1. Local e Instalações

O experimento foi conduzido nas dependências do Sistema de Produção de Leite do Sistema de Pesquisa e Desenvolvimento em Pecuária Leiteira (SISPEL) na Estação Terras Baixas da Embrapa Clima Temperado, município de Capão do Leão, situado na região Sul do estado do Rio Grande do Sul a 31° 52' 20" de latitude sul e 52° 21' 24" de longitude oeste, com altitude média de sete metros acima do nível do mar, na região denominada Encosta do Sudeste.

Durante a realização do experimento, os animais foram mantidos em baias individuais, em galpão de alvenaria, com telhado de zinco, armação e piso de concreto (frisado), camas de borracha sintética, sem paredes laterais, com 3,5m de pé-direito, com livre acesso a água, e acesso a cocho individual para concentrado e para volumoso.

3.2. Animais Experimentais

Foram utilizadas oito vacas da raça Jersey PO multíparas (3 ± 1 partos), em média com 90 dias de lactação, peso médio inicial de 443kg (±63kg) e produção inicial média de 21kg (± 2kg) de leite, selecionadas a partir de um rebanho de aproximadamente 80 animais.

3.3. Tratamentos

As dietas foram formuladas levando em consideração o peso dos animais e a estimativa do seu potencial de produção, e testadas em simulador de desempenho de dietas (NRC, 2001), para serem isoproteicas, isoenergéticas e isofibrosas (Tabela 1), sendo a dieta controle (T0) sem adição de óleo contendo 3,7% de EE, e as demais contendo 6,0%, 8,4% e 10,7% de EE respectivamente nas dietas T1, T2 e T3, em razão da inclusão de níveis crescentes de óleo de girassol refinado. O consumo de matéria seca estimado (CMSe) e concentração

estimada de nutrientes é demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Consumo de matéria seca estimado (CMSe) e concentração estimada dos nutrientes Proteína Bruta (PB), Energia Líquida de Lactação (ELI), Nutrientes digestíveis totais (NDT), Fibra em Detergente Neutro (FDN), e Cálcio (Ca), expressos em kg/dia⁻¹, na dieta controle e demais dietas contendo níveis crescentes de óleo de girassol. SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.

Dietas	CMSe	PB	ELI	NDT	FDN	MM	Ca
T0	18,00	3,0	29,24	12,2	6,8	1232	132
T1	16,70	2,8	28,88	12,0	6,5	1237	138
T2	15,91	2,9	28,44	11,7	6,3	1262	145
T3	15,30	2,8	28,18	11,5	6,0	1267	151

Os concentrados continham milho em grão, farelo de trigo, farelo de soja, premix vitamínico-mineral e fosfato bicálcico. Objetivou-se uma relação volumoso:concentrado mínima de 50:50 (ÍTAVO, et al. 2000). O volumoso ofertado consistiu na mistura de silagem de milho e feno de alfafa picado (\pm 3cm) em mistura de aproximadamente 50:50 em base de matéria seca (Tabela 2).

Tabela 2. Composição das dietas experimentais de acordo com os ingredientes utilizados nos diferentes tratamentos, expressos porcentagem da participação na dieta total, calculado para atender as exigências nutricionais de acordo com NRC (2001). SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.

Ingredientes	Tratamentos			
	T0	T1	T2	T3
Volumosos				
Milho, silagem	25,12	26,36	27,65	28,85
Alfafa, feno	25,12	26,36	27,65	28,85
Mistura de Volumosos ^a	50,25	52,72	55,30	57,70
Concentrado				
Milho, grão moído	29,70	25,22	18,30	14,76
Trigo, farelo	9,87	8,45	7,30	3,81
Soja, farelo	8,70	9,30	11,89	13,71
Girassol, óleo	-	2,58	5,21	7,73
Mineral-vitamínico ^b	1,48	1,55	1,63	1,7
Fosfato bicálcico	-	0,18	0,37	0,59
Sub-total	49,25	47,28	44,7	42,3

^aMistura de silagem de milho e feno de alfafa (1:1) em base seca. ^b Composição mínima por kg: Ca-229g; P-95g; Mg-1,1g; Na-60g; S-12g; Vit. A-120.000 UI; Vit. D3-30.000 UI; Vit. E-1200 UI; Se-20g; Zn-3g; Lasalocida-1000mg.

Na Tabela 3 são apresentadas a composição bromatológica dos ingredientes utilizados na formulação das dietas experimentais.

Tabela 3. Composição bromatológica dos alimentos usados nas dietas experimentais, em porcentagem da matéria seca (MS) para matéria mineral (MM), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos não fibrosos (CNF) e cálcio (Ca). SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.

Alimentos	MS	MM	PB	EE	FDN	CNF	Ca
	%	-----% da MS -----					
Feno de Alfafa	78,31	9,0	19,30	4,11	51,84	17,54	1,19
Silagem de Milho	20,53	7,3	9,38	3,21	60,90	20,03	0,31
Milho grão	83,83	1,2	9,61	2,78	15,26	70,12	0,03
Farelo de trigo	82,87	5,4	17,16	4,66	46,02	25,29	0,10
Farelo de Soja	82,28	6,8	48,97	3,36	18,64	12,58	0,37
Premix Mineral	95,78	86,5	-	-	-	-	22,17
Fosfato bicálcico	82,70	90,6	-	-	-	-	23,01
Óleo de girassol	100	-	-	100	-	-	-

3.4. Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi o de duplo quadrado latino 4x4, com quatro tratamentos e quatro períodos experimentais, com repetições, tendo os dois quadrados ocorrido simultaneamente e sendo cada animal considerado como uma unidade experimental. As oito vacas foram distribuídas segundo data de parto, peso vivo e ordem de lactação nos dois quadrados.

3.5. Duração do Experimento e Períodos experimentais

Os animais permaneceram confinados num total de 65 dias, dos quais cinco dias destinados a adaptação ao confinamento, recebendo neste tempo uma dieta pré-experimental, visando também a determinação inicial do volumoso a ser ofertado, a fim de obter sobras da ordem de 5 a 10%, visando consumo à vontade.

O período experimental e de coleta de dados a campo foi de 24 de julho à 22 de setembro de 2012, num total de 60 dias, divididos em 4 períodos experimentais de 15 dias. Os períodos experimentais compreenderam dez dias de adaptação as dietas experimentais e cinco dias de coleta de dados, conforme descrito por Arriaga (2010), no que se refere às sobras de volumoso e coleta de fezes. As amostras de leite e sangue foram obtidas no 14^o e 15^o dias de cada período.

3.6. Condução do Experimento

Durante a realização do experimento de campo, as vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia em ordenhadeira canalizada tipo duplo 4x4 equipada com medidor automático de leite, expresso em kg de leite por ordenha, e

extrator automático de conjuntos, sendo observado intervalo de 12 horas entre a ordenha da manhã (6h e 30min) e tarde (18h e 30min), e as produções individuais de leite medidas a cada ordenha para efeito de controle experimental.

No início do período pré-experimental e nos cinco dias consecutivos de coleta de amostras de cada período, as vacas foram pesadas logo após a ordenha da manhã, e antes do fornecimento do alimento, em balança individual analógica, sendo a média utilizada como peso médio individual do animal no período.

O alimento volumoso foi fornecido em dois momentos do dia (manhã e tarde), em quantidade suficiente para proporcionar sobras de 10 – 15%, garantindo o consumo à vontade. O alimento concentrado foi fornecido em três momentos do dia (08:00; 13:00 e 19:30hs), em cocho separado do volumoso, a fim de obter-se consumo total. Os ingredientes do concentrado das diferentes dietas experimentais, com exceção ao óleo de girassol, foram misturados previamente ao início do experimento. A adição do óleo de girassol e a mistura desse com os demais ingredientes do concentrado foram feitas manualmente a cada dois dias em recipiente apropriado e durante todo período experimental, com o objetivo de evitar rancificação do óleo. Durante esse preparo do concentrado, foi separado o volume correspondente a cada refeição, em cada tratamento, para os dois dias, sendo essas armazenadas em sacos plásticos identificados. Foram disponibilizados cochos individuais de água, com capacidade para 50 litros, sendo estes lavados e abastecidos diariamente, conforme necessidade. O feno de alfafa foi processado em picador de forragem estacionário, em tamanho médio de 3 cm, a fim de obter mistura homogênea e menor seleção das partes pelos animais.

A silagem de milho e o feno de alfafa picado foram misturados diariamente obedecendo a uma proporção aproximada de 1:1 em base de matéria seca. Ambos foram amostrados diariamente, durante os cinco dias de coleta. A silagem foi acondicionada em saco plástico, identificada e armazenada em freezer (-18°C), sendo formada uma amostra composta no final de cada período. Da mesma forma, amostras diárias de feno de alfafa foram armazenadas em saco plástico, identificado, e ao final do período misturadas em igual proporção de peso a fim de formar uma amostra composta do período.

As sobras de volumoso foram retiradas e pesadas diariamente pela manhã antes do fornecimento de nova mistura volumosa, durante os períodos de coleta foram coletadas amostras representativas, armazenadas em freezer perfazendo uma amostra composta por período e por indivíduo. Ao final de cada período, as subamostras de

cada animal foram misturadas e retiradas uma amostra composta representativa dos cinco dias de coleta de sobras por animal por período.

Para estimativa da excreção fecal e determinação da digestibilidade aparente das frações nutrientes das dietas, foram administradas 10g de óxido de cromo (Cr_2O_3), fracionado em duas doses diárias de 5g, após as ordenhas da manhã e da tarde, na forma de envelope de papel manteiga, sendo administrado em regime de ingestão forçada com auxílio de tronco imobilizador, iniciando-se 96 horas antes da primeira coleta de fezes e estendendo-se até a manhã do quinto dia de coleta de cada período experimental.

As coletas de fezes e sangue foram realizadas durante o experimento, em tronco de contenção, após a ordenha. As fezes foram coletadas diretamente da ampola retal com utilização de luva apropriada para palpação retal, em dois momentos do dia, após a ordenha da manhã e da tarde, durante os cinco dias de coleta de cada período experimental. Tão logo feita a coleta, estas foram acondicionadas em sacos plásticos individuais identificados, sendo conservada em freezer a temperatura de -18°C .

As amostras de sangue foram obtidas através de punção jugular utilizando sistema de coleta em tubo estéril com vácuo, contendo gel separador, sendo retirados três tubos de 10 ml por animal por coleta, para possível contra prova e ou análises necessárias.

Diariamente, antes de dar-se início à ordenha, foram realizados testes com caneca de fundo preto para verificação da presença de mastite clínica e quinzenalmente teste de CMT (California Mastitis Test) para verificação de mastite subclínica em todos os animais experimentais.

Durante o período em que os animais permaneciam na sala de ordenha, as baias individuais do *freestall* foram limpas, primeiramente com um sistema de refluxo de água de limpeza, e posteriormente lavadas com mangueira de alta pressão.

3.7. Preparo de Amostras

As subamostras de fezes e sobras de volumoso de cada animal, obtidas nos dias de coleta experimental em cada período, foram descongeladas à temperatura ambiente e misturadas em iguais proporções de peso, sendo retirada desta a amostra a ser processada. O mesmo foi feito com as amostras de silagem e feno de alfafa de cada período. As amostras compostas de sobras de volumoso, silagem de milho, feno de alfafa foram pesadas em sacos de papel, previamente tarados e identificados,

sendo então colocados em estufa com circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas a fim de obter uma amostra parcialmente seca. Para esta determinação, as amostras de fezes foram acondicionadas em bandejas de alumínio.

Após determinação da matéria parcialmente seca (MPS) das amostras, estas foram moídas em moinho do tipo *Willey* com peneira de crivos de 1 mm e acondicionadas em sacos plásticos identificados para posterior análise bromatológica. As amostras de concentrados e seus ingredientes foram diretamente moídos e armazenados em sacos plásticos identificados.

A tomada de amostras de leite, realizadas no 14^o e 15^o dias de cada período experimental, foram feitas retirando-se uma alíquota do leite total, previamente homogeneizado, obtido em cada ordenha (aprox. 600 ml), sendo este volume coletado igualmente na ordenha da tarde, e posteriormente misturado proporcionalmente ao volume produzido em cada ordenha, formando assim a amostra final de cada dia de coleta de cada animal. O produto da coleta do dia, de cada animal, foi separado em dois frascos individuais de vidro âmbar com capacidade para 100 ml de amostra, e em frasco fornecido pelo Laboratório de Análise de Leite (LabLeite) da Embrapa Clima Temperado, destinado a análise de composição do leite. Todos os frascos foram devidamente identificados, sendo os frascos âmbar conservados a -18°C, em freezer, para posterior análise do perfil de ácidos graxos. As amostras destinadas ao Laboratório de Análises de Leite (LabLeite) da Embrapa Clima Temperado foram acondicionadas em frascos estéreis apropriados contendo cada um uma dose de conservante denominado Bromopol (8mg de 2-Bromo-2-Nitropropano-1,3Diol e 0,3mg de Natamicina), conservadas sob refrigeração e agitadas a cada 10 minutos por meia hora até dissolução total da pastilha de conservante, o que se verifica pela coloração alaranjada homogênea adquirida pela amostra de leite. Tão logo dissolvido o conservante, as amostras foram remetidas, sob refrigeração a 5°C em caixa térmica, ao laboratório para realização das análises.

As amostras de sangue foram colhidas no 14^o e 15^o dias de cada período experimental. Após a coleta os tubos foram deixados em repouso e ao abrigo da luz direta e calor por 10 minutos, sendo tão logo colocados em centrífuga apropriada, com velocidade programada de 4800 rpm por 12 minutos. Destes, 2 tubos foram levados em caixa térmica contendo gelo reciclável para um laboratório de análises clínicas na cidade de Pelotas, RS, onde foram analisados. Do tubo restante foram retiradas amostras de soro sanguíneo e acondicionadas em *ependorf* devidamente

identificados e selados com a utilização de *parafilm*, sendo estocados em freezer para posterior utilização.

3.8. Análises e Avaliações Laboratoriais

Os ingredientes das dietas, as sobras de volumoso bem como as fezes de cada animal em cada período, foram analisados bromatologicamente a fim de determinar a composição e a digestibilidade individual de cada constituinte dietético. As amostras de silagem, sobra de volumoso e fezes, e as amostras de concentrado e feno foram analisadas, após moagem, para matéria seca (MS) em estufa a 105°C, matéria orgânica (MO) por incineração em mufla a 550°C durante 5 horas, proteína bruta (PB) pelo método micro Kjeldahl ($N \times 6,25$), extrato etéreo (EE) por extração com éter di-etílico em sistema Soxhlet, segundo AOAC (1996), fibra insolúvel em detergente ácido corrigida para cinzas (FDAC) e fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas (FDNC), e suas correções para proteína, com adição de α -amilase termoestável mas sem uso de sulfito de sódio, lignina em detergente ácido (LDA) segundo Van Soest et al. (1991), no Laboratório de Nutrição Animal da EMBRAPA Clima Temperado.

Os teores de cálcio (Ca), dos ingredientes das dietas, das sobras de volumoso e das fezes foram determinados por digestão nitro-perclórica e leitura em equipamento de absorção atômica por chama, segundo metodologia descrita por SARRUGE & HAAG (1974), utilizou-se desta mesma metodologia para determinação dos teores de cromo (Cr) presentes nas fezes, bem como a determinação real do elemento cromo no óxido de cromo (Cr_2O_3) fornecido aos animais, sendo as análises realizadas na Central Analítica da EMBRAPA Clima Temperado.

O consumo de matéria seca (CMS) foi obtido pela diferença entre a quantidade dos componentes das dietas ofertados e as sobras diárias, durante os cinco dias de coleta experimental. Avaliou-se o consumo de matéria seca considerando a quantidade ofertada e as sobras de matéria seca da mistura de volumoso após 24h, visto que para o concentrado obteve-se consumo total. Os consumos de cada nutriente (MO, PB, FDN, EE, CNF) foram obtidos a partir da multiplicação dos teores de cada fração bromatológica à matéria seca consumida.

A eficiência alimentar foi determinada através da média de produção de leite e produção corrigida para 3,5% em relação ao consumo médio de MS e FDN em kg/dia.

Foram analisados o perfil metabólico sanguíneo através da determinação de glicose, colesterol total (COLt), colesterol LDL, colesterol HDL e triglicerídeos utilizando

método enzimático colorimétrico automatizado, ácidos graxos não esterificados (AGNE) por espectrofotometria enzimática, uréia e as concentrações das enzimas aspartato aminotransferase (AST), gama glutamiltransferase (GGT) por método cinético enzimático automatizado, em laboratório comercial na cidade de Pelotas, RS.

A produção de leite foi obtida fazendo-se a média de leite produzido nos cinco dias de coleta de cada período, esta foi corrigida para 3,5% de gordura através da equação: $PLCG\ 3,5\% (kg\ dia^{-1}) = (0,432 + 0,1625 \times G) \times kg\ de\ leite$, em que $G = \%$ de gordura do leite, citada por SKLAN et al. (1992).

As análises do leite para gordura, proteína total, extrato seco total (EST) e lactose foram realizadas por espectroscopia infravermelha, seguindo protocolos do Laboratório de Análises de Leite – LABLEITE da Embrapa Clima Temperado, Os teores de extrato seco desengordurado (ESD) foram obtidos pela diferença entre os sólidos totais e o teor de gordura do leite. Já os teores de matéria mineral do leite foram obtidos pela diferença entre os teores de sólidos totais diminuído da soma de proteína, gordura e lactose.

A extração de lipídeos totais das amostras foi feita segundo a metodologia de Bligh & Dyer (1959), enquanto a transesterificação e metilação de acordo com a técnica descrita por Christie (1982). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos (EMAG) foram analisados usando um cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização em chama (GC-FID) (Agilent Technologies[®], modelo HP6890), amostrador automático (Agilent Technologies[®]) e coluna capilar SP-2560 (100 m x 0.25 mm I.D. x 0.20 µm). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio à pressão constante de 20 psi. As condições cromatográficas adotadas foram: injetor no modo split (razão 1:50) e temperatura de 250°C, temperatura inicial da coluna de 50°C por 1 minuto, aumentando 15°C por minuto até 185°C, depois 0,5°C por minuto até 205°C e então 5°C por minuto até 220°C, sendo esta temperatura mantida por 10 minutos. A identificação dos ácidos graxos foi baseada na comparação dos tempos de retenção da amostra com o de ésteres metílicos de padrões, contendo os isômeros geométricos do ácido linoleico conjugado (CLA: c9t11 e CLA: t10c12), do ácido graxo vacênico (ácido graxo trans 18:1) e uma mistura de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos (O-5632, 46905-U e 47885-U, Supelco[®], respectivamente), por adição de padrão (“*spiking*”) e, pelo comprimento equivalente de cadeia (ECL). Os valores do comprimento equivalente de cadeia (ECL), para os EMAG, foram determinados conforme proposto por Visentainer e

Franco (2006) e, a identificação, baseada nos valores de ECL determinados para o padrão 47885-U (Supelco®).

A quantificação dos ácidos graxos, em mg g^{-1} de lipídios totais, foi efetuada em relação ao padrão interno, tricosanoato de metila (23:0), Supelco®. Antes da transesterificação, foi adicionado 1mL da solução do padrão interno (1 mg/mL) em todas as amostras, para posterior evaporação do solvente sob fluxo de N_2 . A quantificação dos ácidos graxos das amostras foi realizada após a verificação da concordância entre os fatores de resposta teórico e experimental.

Os cálculos da concentração dos ácidos graxos contidos nas amostras foram realizados conforme Visentainer e Franco (2006), pela equação:

$$C \left(\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right) = \frac{A_X \cdot M_{23:0} \cdot F_{RT}}{A_{23:0} \cdot M_A \cdot F_{CT}}$$

onde:

A_X = área dos ésteres metílicos dos ácidos graxos;

$A_{23:0}$ = área do padrão interno;

$M_{23:0}$ = massa do padrão interno adicionado a amostra (em miligramas);

M_A = massa da amostra (em gramas);

F_{RT} = fator teórico de resposta dos ésteres metílicos de ácidos graxos;

F_{CT} = fator de conversão para expressão dos resultados em mg de ácidos graxos/g de lipídeos totais.

As estimativas de produção fecal total (PFT) para os diferentes tratamentos e períodos foram obtidas levando em consideração as concentrações de cromo fecal através da fórmula: $\text{PFT} = (\text{g Cr fornecido dia}^{-1}) / (\text{g Cr} / \text{g MS fecal})$.

Os carboidratos não fibrosos corrigidos para cinzas e proteína (CNF) na matéria seca foram calculados através de equação proposta por Hall (2003), em que: $\text{CNF} = (100 - \% \text{FDN} - \% \text{PB} - \% \text{EE} - \% \text{MM})$, considerando o valor de FDN corrigido para cinzas e proteínas.

Determinou-se os coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (DigMS), da matéria orgânica (DigMO), do extrato etéreo (DigEE), da fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína (DigFDN), dos carboidratos não fibrosos corrigidos para cinzas e proteína (DigCNF) das dietas experimentais, segundo fórmula: $\text{CDA} (\%) = (\text{g nutriente consumido} - \text{g nutriente excretado}) / \text{g nutriente consumido} \times 100$.

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados a partir da digestibilidade aparente, segundo equação descrita por Weiss (1999), mas utilizando a FDN e CNF corrigidos para cinza e proteína. $NDT (\%) = PBd + FDNd + CNFd + 2,25 * EEd$. em que: $PBd = PB$ digestível; $FDNd = FDN$ digestível; $CNFd = CNF$ digestíveis; e $EEd = EE$ digestível.

3.9. – Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no aplicativo SAS® - Statistical Analysis System versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA, 2009).

Os dados foram investigados quanto à presença de *outliers*, através do resíduo estudentizado, testados quanto à normalidade residual pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto à homocedasticidade pelo teste de Levene. Posteriormente, foram submetidos à análise de variância univariada (ANOVA), pelo procedimento GLM em delineamento quadrado latino (4 x 4) duplo, com quatro tratamentos, quatro períodos experimentais e quatro animais em cada um dos dois quadrados, conforme modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + Q_i + T_j + P_k + V_{(i)l} + e_{ijk}$$

em que, μ = constante geral; Q_i = efeito do quadrado latino; sendo $i = 1$ e 2 ; T_j = efeito do tratamento j , sendo $j = 1, 2, 3$ e 4 ; P_k = efeito do período experimental k , sendo $k = 1, 2, 3$ e 4 ; $V_{(i)l}$ = efeito do animal ou sequência de tratamento l , aninhada ao efeito de quadrado latino, e e_{ijk} = erro experimental, associado a cada observação, pressuposto NID (0, σ^2).

Em seguida, as médias dos tratamentos foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ordinários com o comando LSMEANS (Least Squares Means). Após a identificação de significância de tratamento nos efeitos fixos do modelo estatístico, foi efetuada análise de regressão linear e quadrática, com o intuito de investigar as alterações nas variáveis dependentes em função dos diferentes níveis de extrato etéreo das dietas experimentais.

Os parâmetros do modelo considerado foram estimados pelo procedimento GLM, enquanto a sua falta de ajuste, pela opção LACKFIT na declaração MODEL, sendo o coeficiente de determinação (r^2), expresso em relação à fonte tratamentos (regressão + falta de ajuste).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Consumo de Matéria seca e suas frações constituintes

O consumo de matéria seca e de algumas de suas frações constituintes diferiu em razão dos tratamentos utilizados. Houve aumentos lineares significativos ($p < 0,05$) no que se refere aos consumos de extrato etéreo (CEE), de cálcio (CCa) e na relação volumoso:concentrado em resposta aos tratamentos.

Os consumos de matéria seca (CMS), matéria orgânica (CMO), fibra em detergente neutro (CFDN), de carboidratos não fibrosos (CCNF), de matéria seca de concentrado (CMSconc), e as relações entre consumo de matéria seca e peso vivo (CMS/PV) e consumo de fibra em detergente neutro em relação ao peso vivo (CFDN/PV) diferiram significativamente entre os tratamentos ($p < 0,05$), demonstrando comportamento linear decrescente.

Os CMS e CMO apresentaram comportamento semelhante, ajustando-se as equações $Y = -0,25X + 19,41$; $r^2 = 0,95$ e $Y = -0,43X + 18,75$; $r^2 = 0,98$ respectivamente. Estes comportamentos corroboram com muitos autores (JENKINS, 1993; NRC 2001; HARVATINE & ALLEN, 2005; HARVATINE & ALLEN, 2006; EIFERT et al., 2006), que associam a suplementação lipídica com depressão da ingestão voluntária de alimentos, por uma série de motivos, tais como pela adsorção da gordura da dieta e formação de camada lipídica de natureza hidrofóbica na superfície dos alimentos e células bacterianas no rúmen (KOZLOSKI, 2012), a alteração da permeabilidade da membrana das bactérias gram-positivas, principalmente as celulolíticas (NAGARAJA et al., 1997), alteração na fermentação ruminal dos carboidratos fibrosos (NRC, 2001) e efeitos metabólicos (ALLEN, 2000; CHOI & PALMQUIST et al., 2001).

Ao utilizar-se de uma fonte de gordura para nutrição de bovinos leiteiros deve-se atentar para os consumos uma vez que, mesmo a gordura aumentando a densidade energética, a redução no consumo não pode ser exacerbada a ponto de limitar o aporte de nutrientes para os animais.

As médias obtidas em cada tratamento para as variáveis de consumo são mostradas na Tabela 4.

Tabela 4. Consumo de matéria seca (CMS) matéria orgânica (CMO), proteína bruta (CPB), extrato etéreo (CEE), fibra insolúvel em detergente neutro (CFDN), carboidratos não fibrosos (CCNF), cálcio (CCa), nutrientes digestíveis totais (CNDT) e relações dos consumos de MS e FDN com o peso vivo dos animais (MS PV) e (FDN PV). SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.

Consumo (kg)	T0	T1	T2	T3	CV(%)	p-valor
CMS	18,45	17,87	17,56	16,61	3,71	0,0003
CMO	17,14	16,12	15,34	14,06	3,87	<0,0001
CPB	3,32	3,19	3,28	3,30	3,27	0,1290
CFDN	6,30	6,14	6,13	5,64	5,59	0,0163
CEE	0,687	1,073	1,470	1,775	2,27	<0,0001
CCNF	6,37	5,70	4,84	3,95	2,76	<0,0001
CNDT	12,54	12,45	13,26	12,89	5,08	0,1030
CCa	0,157	0,166	0,173	0,179	4,44	<0,0001
CMSconc [*]	8,170	7,889	7,114	6,409	0,00	<0,0001
CMSvol ^{**}	9,74	9,98	10,44	10,07	6,50	0,1068
Rel-V:C ^{***}	52,68	55,72	59,24	61,07	2,73	<0,0001
Consumo (%PV)						
CMS/PV	4,53	4,40	4,25	4,14	4,16	0,0025
CFDN/PV	1,57	1,52	1,47	1,40	4,74	0,0026

T0 – sem inclusão de óleo de girassol; T1 – com inclusão de óleo de girassol até 6,0% de EE; T2 – com inclusão de óleo de girassol até 8,4% EE; T3 – com inclusão de óleo de girassol até 10,7% de EE na MS; ^{*} Consumo de MS oriunda do concentrado; ^{**} Consumo de MS oriunda da mistura de volumosos; ^{***} Relação entre volumoso e concentrado nas dietas experimentais.

Contrariamente à maioria das pesquisas, neste estudo a redução nos consumos de MS e algumas frações está diretamente relacionada com a composição das dietas. Provavelmente o CMS reduziu por um menor consumo de concentrado, que se ajustou a uma equação linear decrescente ($Y = -0,31X + 9,78$; $r^2 = 0,99$). Este comportamento corresponde a uma das premissas de utilização do óleo que consiste em fornecer a mesma quantidade de energia em menor volume, quando comparado aos CNF como fonte energética. Essa afirmativa é reforçada uma vez que o consumo de volumoso não diferiu entre os tratamentos ($p = 0,1068$), com tendência de aumento (Tabela 4). Essa tendência, provavelmente, também esteja relacionada à redução do volume do concentrado ofertado durante o experimento, à medida que a inclusão de gordura elevava sua densidade energética.

A Figura 1 ilustra o comportamento das variáveis consumo de matéria seca (CMS) e consumo de matéria orgânica (CMO), frente aos níveis crescentes de extrato etéreo das dietas experimentais

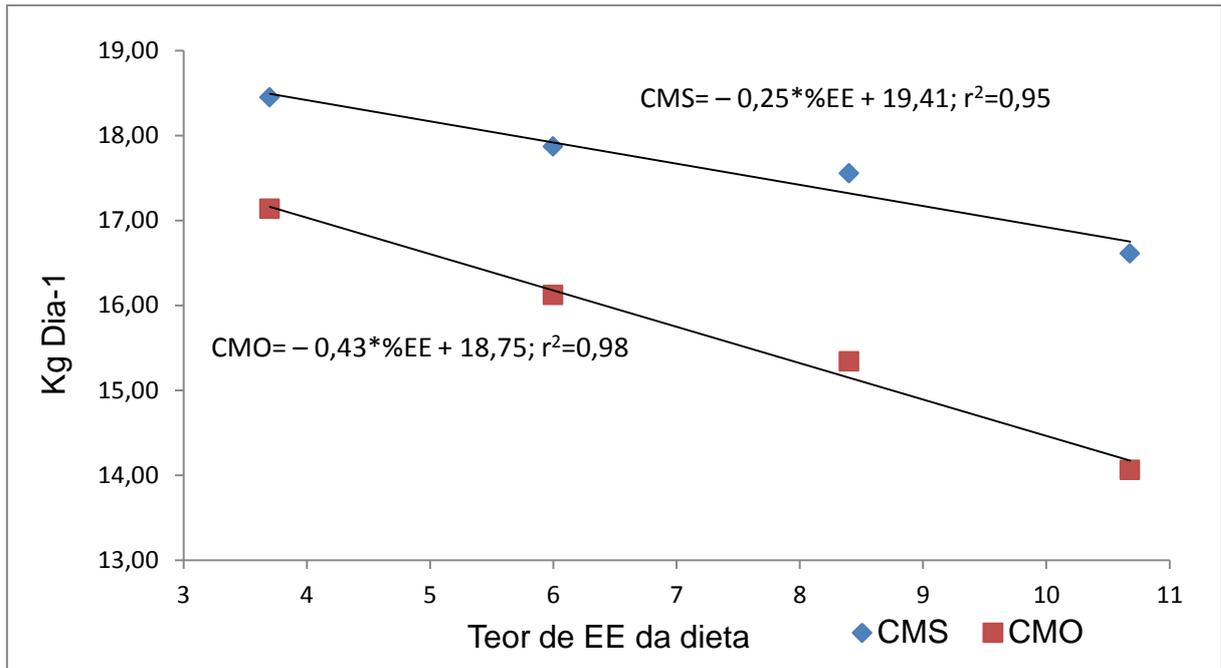


Figura 1 - Consumo de matéria seca (CMS) e consumo de matéria orgânica (CMO) nos diferentes tratamentos.

Esses fatos proporcionaram uma melhora na relação entre volumoso e concentrado, que foi crescente com a inclusão de óleo ($Y = 1,23X + 48,33$; $r^2=0,98$), chegando a 61% de volumoso no tratamento T3.

Em trabalho realizado por Costa (2008), o consumo de matéria seca foi menor para as dietas suplementadas com fontes lipídicas, em relação à dieta controle, concordando com outros pesquisadores (PALMSQUIT & JENKINS 1980; MALAFAIA et al., 1996; VARGAS et al., 2002; SCHAFHÄUSER, 2005; EIFERT et al., 2006), independente da natureza da fonte lipídica.

Os consumos de FDN e CNF ajustaram-se linearmente as equações ($Y = -0,09X + 7,10$; $r^2=0,82$ e $Y = -0,35X + 7,70$; $r^2=0,99$) respectivamente. Esses também devem estar correlacionados com a formulação dos concentrados, uma vez que, com a inclusão de óleo livre no concentrado aumentou sua densidade energética, por substituição das fontes energéticas tradicionais, milho e farelo de trigo (Tabela 1), diminuindo as quantidades de FDN e CNF vindas do mesmo.

O consumo de volumoso não diferiu entre os tratamentos mesmo com a elevação dos níveis de extrato etéreo das dietas experimentais, provavelmente pela homogeneidade e moagem dos volumosos empregados, com conseqüente padronização no tamanho da fibra fisicamente efetiva. Esse fato reforça o pressuposto de que as diferenças encontradas no consumo de MS, MO, FDN e CNF, ocorreram devido à substituição dos ingredientes energéticos nas dietas, por óleo de girassol,

levando os concentrados de cada tratamento a serem diferentes sob a ótica volumétrica.

Alterações na fermentação ruminal e no consumo de alimentos em dietas contendo gordura podem ser relacionadas também com características do volumoso, em dietas em que a única fonte de volumoso empregado foi silagem de milho, foram relatadas maiores depressões no consumo de matéria seca quando comparado à substituição de parte da silagem de milho por alfafa (SMITH et al., 1993; ONETTI & GRUMMER, 2004; RUPPERT et al., 2003).

Quanto ao consumo de matéria seca em relação ao peso vivo (CMS/PV) e consumo de fibra em detergente neutro em relação ao peso vivo (CFDN/PV), ambos os parâmetros sofreram influência dos tratamentos utilizados, diferindo estatisticamente ($p=0,002$), ajustando-se ambos em equações lineares decrescentes ($Y= -0,056X + 4,73$; $r^2=0,99$ e $Y= -0,028X + 1,69$; $r^2=0,94$) respectivamente. Segundo NRC (2001), a capacidade ingestiva de FDN por vacas multíparas é estimada entre 1,0 – 1,3% do peso vivo (PV), no entanto, estes valores não levam em consideração o tamanho e efetividade dessa fração.

Nesse estudo, em razão do volumoso empregado apresentar elevado teor de FDN e ter sido picado, o que reduziria sua efetividade e provavelmente aumentaria sua taxa de passagem pelo trato digestivo, fez com que o valor médio observado no que se refere ao consumo de FDN em razão do peso vivo (CFDN/PV) tenha diferido entre os tratamentos, apresentando valores médios decrescentes em função da quantidade de extrato etéreo da dieta. Contudo, esses foram superiores aos valores de referência segundo NRC (2001).

O consumo de Ca foi crescente ($p>0,0001$), o que era esperado, uma vez que à medida que aumentava a inclusão de óleo nas dietas, foi aumentado também o aporte de Ca, minimizando o risco de hipocalcemia pela formação de sabões com a gordura livre no rúmen. A ausência de efeitos negativos da suplementação lipídica na digestibilidade do FDN provavelmente se deve, entre outros fatores, ao aumento do fornecimento de cálcio nas dietas contendo óleo de girassol, sendo este recomendado (PALMQUIST & JENKINS, 1980), quando se utiliza gordura na dieta. Vários autores (JENKINS & PALMQUIST, 1982; PALMQUIST, 1984; PALMQUIST et al. 1986) referem-se que a adição suplementar de cálcio em dietas contendo suplementação lipídica melhora a fermentação das dietas em nível ruminal, principalmente quanto à

fração fibrosa do alimento. Segundo Roger et al.(1990), a falta de Ca pode ser também um fator limitante para a fixação das bactérias nas partículas do alimento.

O consumo de EE, como esperado em função dos tratamentos, ajustou-se a uma equação linear crescente com a inclusão de óleo de girassol ($Y = 0,16X + 0,12$; $r^2=0,99$).

4.2. Digestibilidade Aparente das frações nutrientes

Houve efeito positivo ($p < 0,05$) para DigPB, DigEE e no NDT quando incluiu-se óleo de girassol nas dietas. Não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) na DigMS, DigMO e DigFDN, entretanto a DigCNF foi reduzida com o incremento de óleo nas dietas.

A DigPB das dietas aumentou linearmente ($p < 0,0001$), com a inclusão de óleo de girassol, como pode ser visto na Tabela 4, ajustando-se a equação $Y = 1,17X + 66,50$; $r^2=0,98$. As diferenças observadas parecem estar relacionadas às diferenças nas digestibilidades da fração proteica do concentrado, uma vez que, a digestibilidade desta fração no farelo de soja, incluído em níveis crescentes para manter as dietas isoproteicas, é maior, segundo dados tabelados (NRC, 2001; VALADARES FILHO, 2006), quando comparada a digestibilidade da mesma fração no farelo de trigo (presente em quantidades decrescentes nas dietas T0, T1, T2 e T3 respectivamente). Este aumento na digestibilidade da proteína é amparado por iguais observações descritas na literatura (NIANOGO et al , 1991; CHRISTENSEN et al , 1994; GOODLING & GRUMMER, 1998).

Palmquist (1993) utilizando quatro dietas experimentais, sendo: dieta controle, dieta com alta inclusão de fonte de gordura, dieta com fonte de proteína não degradável no rúmen, e dieta com inclusão de gordura e fonte de proteína não degradável no rúmen, observou diminuição da degradabilidade ruminal da fração nitrogenada na dieta com alta inclusão de gordura em relação à dieta controle (74,3% e 72,5% respectivamente), enquanto a digestibilidade intestinal da fração nitrogenada aumentou de 94,9% na dieta controle para 97% na dieta com alta inclusão de gordura.

As médias dos coeficientes de digestibilidade aparente do trato digestivo total assim com os nutrientes digestíveis totais são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5. Coeficiente de digestibilidade aparente da matéria seca (DigMS), matéria orgânica (DigMO), proteína bruta (DigPB), fibra insolúvel em detergente neutro (DigFDN), extrato etéreo (DigEE), carboidratos não fibrosos (DigCNF) e nutrientes digestíveis totais (NDT), nas dietas experimentais contendo níveis crescentes de inclusão de óleo de girassol. SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.

Variáveis (%)	T0	T1	T2	T3	CV(%)	p-valor
DigMS	70,78	71,27	72,53	72,42	4,05	0,3324
DigMO	72,98	72,82	73,70	73,67	3,85	0,7379
DigPB	71,14	72,93	76,69	79,01	3,45	<0,0001
DigFDN	59,58	59,76	63,04	65,01	8,36	0,1310
DigEE	73,10	75,50	87,60	89,87	8,49	0,0006
DigCNF	88,91	89,06	86,36	82,11	2,15	<0,0001
NDT	68,09	71,10	75,65	78,73	3,55	<0,0001

T0 – sem inclusão de óleo de girassol; T1 – com inclusão de óleo de girassol até 6,0% de EE; T2 – com inclusão de óleo de girassol até 8,4% EE; T3 – com inclusão de óleo de girassol até 10,7% de EE na MS.

Também a eficiência da síntese microbiana por vezes é aumentada à medida que os lipídios substituem parte do concentrado na dieta, como citado por Nagajara et al., (1997), que observaram efeito defaunatório de protozoários com o uso de óleo de soja, o que viabilizou maior crescimento bacteriano, em virtude da menor predação.

Um dos principais efeitos indesejáveis da suplementação lipídica consiste na redução da digestibilidade dos constituintes da parede celular, porém essa não foi afetada neste estudo, fato esse que poderia comprometer o desempenho produtivo e a disponibilidade energética das dietas, uma vez que a digestão da fração FDN representa uma importante fonte de energia para ruminantes. Neste caso, a inclusão de alfafa como volumoso e a suplementação com Ca podem ter tido importante contribuição para esses resultados (SMITH et al., 1993).

A digestibilidade do extrato etéreo (DigEE), aumentou com a inclusão de óleo de girassol nas dietas, ajustando-se a uma equação linear crescente ($Y = 2,57X + 63,27$; $r^2 = 0,90$). É provável que os valores obtidos para DigEE sejam reflexo do maior coeficiente de digestibilidade para ácidos graxos insaturados, como da fonte utilizada neste estudo, em razão da formação de monoglicerídeos no intestino, que atuam como agentes emulsificantes (CHALUPA et al., 1996), facilitando assim a formação de micelas durante o processo digestivo, facilitando a absorção de gordura. Resultados semelhantes foram encontrados por Souza (2011) utilizando suplementação de vacas em lactação com óleo de girassol em dietas baseadas em cana-de-açúcar.

A DigCNF foi influenciada pelos tratamentos empregados, ajustando-se a uma equação quadrática ($Y = -0,20x^2 + 1,97x + 84,49$; $r^2 = 0,99$). A redução na digestibilidade apresentada nos tratamentos T2 e T3 é provavelmente explicada pela redução da participação de milho nas dietas com maior inclusão de óleo que provavelmente

apresenta digestibilidade da fração CNF superior aos demais ingredientes utilizados nas dietas.

Na Figura 2 é demonstrado o comportamento da digestibilidade aparente das frações proteína bruta (DigPB), extrato etéreo (DigEE), carboidratos não fibrosos (DigCNF) e do teor de nutrientes digestíveis totais em porcentagem da matéria seca (NDT%MS).

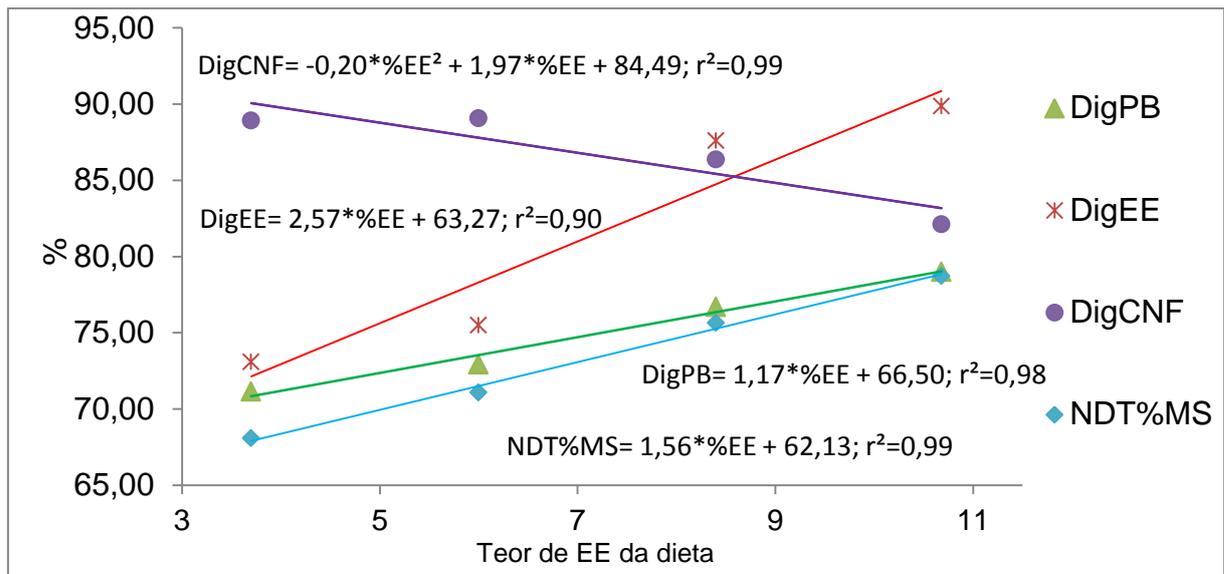


Figura 2 - Digestibilidade aparente das frações proteína bruta (DigPB), extrato etéreo (DigEE), carboidratos não fibrosos (DigCNF) e teor de nutrientes digestíveis totais em porcentagem da matéria seca (NDT%MS).

Os teores de nutrientes digestíveis totais diferiram entre tratamentos ($p < 0,0001$), ajustando-se a uma equação linear crescente ($Y = 1,56x + 62,13$; $r^2 = 0,99$). Explica-se este incremento em razão de que o cálculo de nutrientes digestíveis totais (NDT) leva em consideração a digestibilidade das frações nutrientes. Dessa forma, não tendo havido diferença na digestibilidade da fração fibra (DigFDN), os aumentos lineares da digestibilidade das frações proteína bruta (DigPB) e do extrato etéreo (DigEE), todos estes envolvidos no cálculo do NDT, mesmo com diminuição na participação e digestibilidade dos carboidratos não fibrosos (DigCNF), houve elevação no NDT das dietas, uma vez que a digestão de lipídios é capaz de fornecer 2,25 vezes mais energia do que a digestão de carboidratos, por unidade de massa.

4.3. Composição do leite nos diferentes tratamentos

Houve efeito dos tratamentos sobre o teor e produção de gordura, assim como, sobre o teor de extrato seco total ($p < 0,05$), não tendo sido observado efeitos nos

demais parâmetros avaliados. Os teores e produção dos constituintes do leite são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Médias dos teores (%) e produções (g/dia) de gordura, proteína total, lactose, estrato seco total (EST), estrato seco desengordurado (ESD) e minerais do leite produzido, nos diferentes tratamentos contendo níveis crescentes de inclusão de óleo de girassol. SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.

Variáveis	Tratamentos				CV(%)	p-valor
	T0	T1	T2	T3		
Composição (%)						
Gordura	3,42	3,07	3,66	3,97	13,67	0,0192
Proteína	3,48	3,33	3,29	3,33	4,37	0,0835
Lactose	4,71	4,72	4,67	4,74	1,33	0,1703
EST	12,84	11,89	12,61	13,05	5,32	0,0151
ESD	9,12	9,00	8,95	9,07	2,35	0,4335
Produção (g/dia)						
Gordura	798,32	769,01	883,59	970,07	15,42	0,0438
Proteína	455,68	451,48	435,80	438,23	7,77	0,6335
Lactose	1112,90	1168,71	1131,15	1152,80	8,03	0,6428
EST	2999,22	2930,89	3046,37	3172,68	9,15	0,3845
ESD	2174,32	2219,15	2162,77	2202,60	7,92	0,9134
Minerais	0,992	0,953	0,983	1,001	7,93	0,6477

T0 – sem inclusão de óleo de girassol; T1 – com inclusão de óleo de girassol até 6,0% de EE; T2 – com inclusão de óleo de girassol até 8,4% EE; T3 – com inclusão de óleo de girassol até 10,7% de EE na MS.

A porcentagem de gordura no leite (GORD%) e conseqüentemente a produção de gordura diferiram entre os tratamentos ($p=0,01$ e $p=0,04$ respectivamente), demonstrando comportamento quadrático ($Y= 0,028x^2 - 0,31x + 4,1$; $r^2=0,99$ e $Y= 6,28x^2 - 66,57x + 973,3$; $r^2=0,99$).

É provável que o aumento no aporte de ácidos graxos de cadeia longa através da suplementação com óleo de girassol, fonte rica em ácido linoleico, principalmente nos tratamentos com níveis superiores de extrato etéreo (8,4 e 10,7%), tenha elevado o teor e produção de gordura do leite por incorporação direta destes compostos provenientes da dieta.

Na dieta T1 (6% de EE), a maior disponibilidade de carboidratos não fibrosos no concentrado, proporcionou maior biohidrogenação ruminal com conseqüente maior formação de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, dentre os quais ácido vacênico (C18:1n11t), precursor dos ácidos linoleico conjugados pela atuação da enzima delta-9 dessaturase.

Dentre os isômeros de CLA passíveis de serem formados está o CLA 2 (C18:2c10t12n6), relacionado a depressão na gordura do leite. Embora a participação de CLA 2 (C18:2c10t12n6) no perfil da gordura do leite não tenha diferido estatisticamente entre os tratamentos (Tabela 7), houve numericamente maior formação no nível de 6% de extrato etéreo na dieta, o que biologicamente poderia contribuir com os menores valores de porcentagem e produção de gordura encontrados no tratamento T2, uma vez que este ácido graxo é atualmente reconhecido pelo seu efeito depressor na gordura do leite (BAUMANN, 2011).

A combinação de níveis considerados elevados pela literatura (6 – 7% de extrato etéreo na MS – NRC, 2001) no que se refere à suplementação lipídica, associado à disponibilidade de carboidratos não fibrosos de fácil fermentação ruminal, em dietas com baixa efetividade da fração fibra do volumoso, situação encontrada na dieta T1, parece proporcionar condições próximas ao do surgimento de depressão na gordura do leite, síndrome extensamente descrita na literatura (GRIINARI et al., 1997; BAUMGARD et al., 2000; BAUMAN & GRIINARI, 2003; MOATE et al., 2008; BAUMAN 2011). No entanto, nas condições deste estudo, o efeito desapareceu quando foram adicionados maiores níveis de óleo nas dietas por provável incorporação direta dos ácidos graxos provenientes da digestão e absorção da gordura suplementar.

Staples (2006) descreve que a gordura do leite é composta por ácidos graxos com comprimento de cadeia carbonada variável, geralmente entre 4 e 24 átomos de carbono (C). Os ácidos graxos de cadeia curta (4 à 8C) e grande parte dos ácidos graxos de cadeia média (10 à 14C) são produzidos na glândula mamária pela *síntese de novo* de ácidos graxos tendo como principais precursores o acetato (2C) e butirato (4C), provenientes da fermentação ruminal. Estes ácidos graxos compõem cerca de 50% da gordura do leite. Os outros 50% da gordura provém diretamente dos ácidos graxos captados pelas células da glândula mamária a partir do sangue, ou seja, a partir de ácidos graxos provenientes da absorção intestinal e da mobilização de tecido adiposo. São principalmente ácidos graxos de cadeia longa (16 à 18C). Segundo Akers (2002) todos os ácidos graxos com 18C, e cerca de 30% dos ácidos graxos com 16C presentes no leite, são provenientes da dieta.

O aumento no teor e produção de gordura produziu conseqüente aumento no teor de extrato seco total, tendo este aumento também se ajustado a um modelo quadrático ($Y = 0,065x^2 - 0,87x + 15,1$, $r^2 = 0,98$).

Os resultados encontrados quanto à porcentagem e produção de gordura divergem da maioria dos resultados encontrados na literatura (MALAFAIA et al., 1996; DE ASSIS PEREIRA et al., 1998; SANTOS et al., 2001; LOPEZ et al., 2007) que trabalhando com inclusão de diferentes fontes e níveis de suplementação lipídica na dieta de vacas em lactação não encontraram efeito na porcentagem de gordura do leite, da mesma forma Schafhäuser (2005) quando avaliou diferentes níveis de farelo e óleo de arroz na dieta de vacas em lactação.

Na Figura 3 é mostrado o comportamento das variáveis teor de gordura (GORD%) e teor de extrato seco total (EST%), nos diferentes tratamentos.

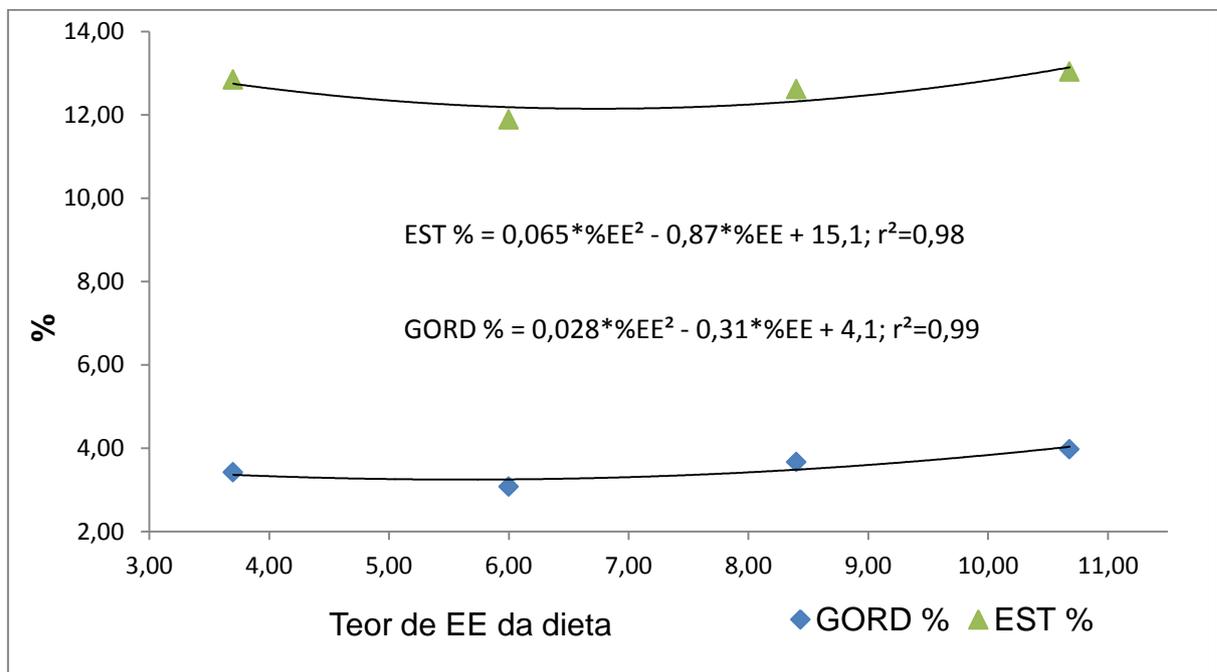


Figura 3 - Comportamento das variáveis teor de gordura (GORD%) e teor de extrato seco total (EST%), nos diferentes tratamentos.

Não houve efeito dos tratamentos utilizados ($p > 0,05$) nos teores e produção de proteína, lactose, extrato seco desengordurado e matéria mineral do leite.

Vargas et al. (2002), trabalhando com vacas em lactação, utilizando gordura de soja, em níveis de 3,0 a 7,0 % de extrato etéreo, na forma de grão ou óleo, não encontrou efeito da adição de gordura dietética sobre a lactose do leite. Resultados semelhantes foram obtidos por Schafhäuser (2005) que não verificou influência da suplementação com gordura (farelo integral e óleo de arroz), em níveis crescentes, nos teores de lactose, assim como na produção diária de lactose. Santos *et al.* (2001), utilizando grãos de soja moídos ou o seu óleo, Vargas *et al.* (2002), suplementando os animais com gordura de soja, Nörnberg (2003), utilizando gordura protegida e farelo de

arroz integral associado a sebo ou óleo de arroz e Schafhäuser (2005), farelo de arroz associado a níveis crescentes de óleo de arroz, não observaram diferença na concentração de lactose entre os tratamentos utilizados.

Utilizando vacas da raça Jersey, López (2001) observou que a suplementação de gordura na dieta na forma de gordura protegida, grãos de soja triturados e sebo aumentou a produção de leite corrigida e melhorou a eficiência alimentar, não tendo, entretanto, efeito nas concentrações de gordura, proteína, e lactose do leite.

ZHENG et al. (2005) em experimento utilizando 12 vacas Holandês de alta produção, em triplo quadrado latino, utilizando três dietas com mesmo extrato etéreo (6,7% na MS), mas diferentes quanto à inclusão de óleos vegetais (dieta com óleo de algodão, com óleo de milho e com óleo de soja) e dieta controle (sem adição de óleo e 4,7% de EE na MS) observou diminuição no percentual de gordura de leite, mas houve poucos efeitos sobre a porcentagem e rendimento de proteína de leite, na produção de gordura do leite, porcentagem e produção de lactose, bem como na produção de leite. Estes resultados corroboram em parte com os encontrados no presente estudo, em razão de não ter sido verificada influência dos tratamentos empregados no que se refere à produção, produção corrigida para teor de gordura (Tabela 6), porcentagem e produção de lactose e proteína de leite. No entanto, divergem dos relatos feitos por Jenkins & McGuire (2005) revisando 25 anos de literatura existente sobre suplementação de gordura na dieta de bovinos de leite que indicam que em média, o teor de proteína no leite diminuiu 0,03% para cada 100 g de ingestão de gordura suplementar, ou cerca de 0,1 a 0,3 unidades percentuais quando utilizados níveis típicos de suplementação com gorduras, ou seja, até 7% de extrato etéreo na matéria seca total da dieta, conforme NRC (2001).

4.4. Produção de leite e eficiência alimentar

Houve melhora na eficiência alimentar nas dietas contendo óleo de girassol no que se refere à quantidade de leite produzido em relação à quantidade de MS consumida da dieta, com comportamento linear crescente, ajustando-se na equação $Y = 0,013x + 1,25$; $r^2 = 0,93$. Observando os valores médios obtidos, verifica-se que a eficiência alimentar para produção de leite aumentou com o aumento da inclusão de óleo até o nível de 8,4% de extrato etéreo na dieta, permanecendo constante entre esse e o nível com maior extrato etéreo (10,7% na MS).

O mesmo não ocorreu quando a eficiência alimentar foi medida em leite corrigido (EA_{3,5%}). Nesse aspecto, houve incremento linear de até 22% na eficiência alimentar na dieta contendo o nível mais elevado de extrato etéreo, quando comparado à dieta controle, ajustando-se na equação $Y = 0,04x + 1,06$; $r^2 = 0,90$.

A produção de leite (PL), produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLC_{3,5%}), eficiência alimentar em kg leite/kg de MS consumida para leite in natura (EA), leite corrigido para 3,5% de gordura (EA_{3,5%}), e eficiência alimentar em kg de leite produzido/kg de FDN (EA FDN), são mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Médias de produção de leite (PL) (kg/dia), produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLC_{3,5%}) (kg/dia) e eficiência alimentar em kg leite/kg de MS consumida para leite in natura (EA), leite corrigido para 3,5% de gordura (EA_{3,5%}), e eficiência alimentar em kg de leite produzido/kg de FDN (EA FDN) nos diferentes tratamentos contendo níveis crescentes de inclusão de óleo de girassol. SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.

Variáveis	Tratamentos				CV(%)	P-valor
	T0	T1	T2	T3		
PL	23,57	24,68	24,20	24,26	7,82	0,7073
PLC _{3,5%}	23,18	23,43	24,79	26,22	10,10	0,1125
EA	1,26	1,36	1,39	1,39	5,08	0,0070
EA _{3,5%}	1,25	1,32	1,40	1,61	12,04	0,0082
EA FDN	3,50	3,74	3,75	3,84	6,35	0,0678

T0 – sem inclusão de óleo de girassol; T1 – com inclusão de óleo de girassol até 6,0% de EE; T2 – com inclusão de óleo de girassol até 8,4% EE; T3 – com inclusão de óleo de girassol até 10,7% de EE na MS.

Os resultados encontrados encontram-se amparados por relatos da literatura (SCHAFHÄUSER, 2005; EIFERT et al, 2006; NÖRNBERG, 2006) quanto à melhora na eficiência alimentar em dietas com inclusão de fontes lipídicas.

Na Figura 4 mostrada a seguir, são apresentados os comportamentos obtidos quanto à eficiência alimentar em kg leite/kg de MS consumida para leite in natura (EA) e leite corrigido para 3,5% de gordura (EA_{3,5%}).

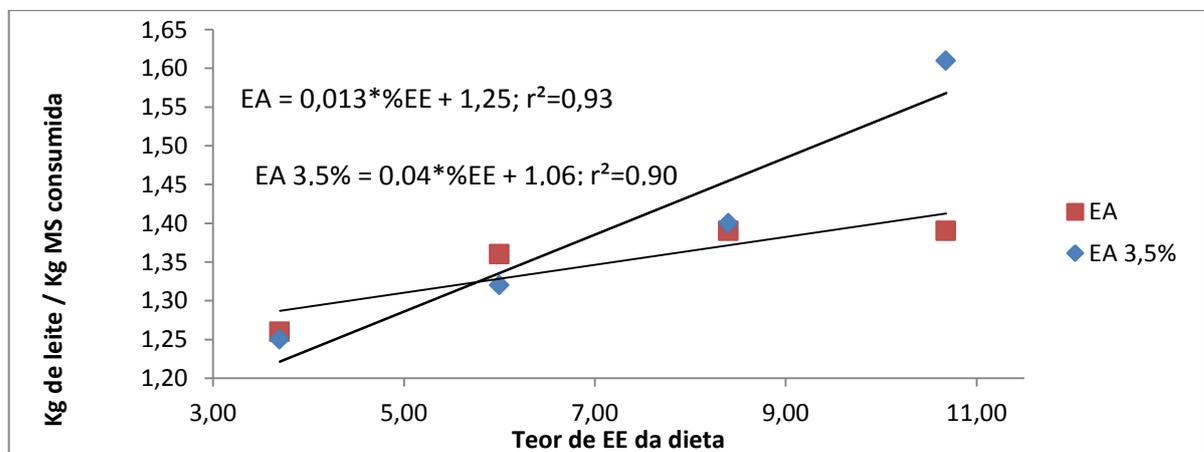


Figura 4 - Eficiência alimentar em kg leite/kg de MS consumida para leite in natura (EA) e leite corrigido para 3,5% de gordura (EA_{3,5%}), nos diferentes tratamentos.

Quanto à eficiência alimentar medida em razão do consumo de fibra em detergente neutro (EA FDN), observou-se tendência ($p=0,06$) de melhora quando da inclusão crescente de fonte lipídica na dieta.

4.5. Parâmetros Bioquímicos e Perfil Hepático nos diferentes tratamentos

Houve influência significativa dos tratamentos empregados nos parâmetros bioquímicos para as concentrações sanguíneas de colesterol total ($p=0,01$), e de ácidos graxos não esterificados ($p=0,03$). Já no que se referem à glicose, as frações de colesterol HDL e LDL, triglicérides, uréia, aspartato aminotransferase (AST) e gama-glutamil transferase, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos ($p>0,05$).

Os teores de glicose não foram afetados pelos tratamentos ($p>0,05$), o que para ruminantes em geral é normal, visto os inúmeros mecanismos homeostáticos que podem contribuir para manutenção da glicemia. Considerando que a glicose é responsável pela síntese de lactose, sendo esta correlacionada diretamente com a quantidade de leite produzido, pode-se inferir que independente da forma de obtenção e/ou síntese estes não foram limitantes, visto a produção de leite entre os diferentes tratamentos não ter diferido, bem como o teor de lactose do leite.

A média geral observada neste estudo foi de 62,78 mg/dL, condizente com os valores normais descritos por Kaneko et al. (2008). Segundo Gagliostro & Chilliard (1992), vários mecanismos de economia de glicose podem explicar a manutenção da glicemia, como a diminuição na oxidação da glicose para produção de NADPH ATP necessário para a síntese de novo de ácidos graxos na glândula mamária, devido a inibição da mesma nos tecidos adiposo e mamário frente ao aporte de lipídeos, diminuição na oxidação de glicose para produção de ATP, que pode ser produzido pela oxidação de ácidos graxos provenientes da dieta, possível aumento na gliconeogênese hepática, como consequência da menor concentração plasmática de insulina circulante.

Os níveis sanguíneos de colesterol total diferiram entre os tratamentos, ajustando-se a uma equação quadrática ($Y= -2,07x^2 + 35,36x + 65,26$; $r^2=0,99$) com o aumento do extrato etéreo da dieta. Os valores médios encontrados podem ser explicados em razão do maior aporte de lipídios nas dietas com adição de óleo, e consequentemente maior produção desta molécula pelo tecido hepático.

Em experimento conduzido por López et al. (2004) avaliando a inclusão de sebo bovino, gordura protegida e grãos de soja como fontes de gordura na dieta para vacas leiteiras em início de lactação, foram verificados níveis séricos de colesterol, triglicerídeos e AGNE superiores para vacas alimentadas com gordura protegida e inferiores naquelas alimentadas com sebo bovino ou que receberam a dieta controle.

Os resultados obtidos para os parâmetros metabólicos e hepáticos estudados estão demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8. Efeito da inclusão em níveis crescentes de óleo de girassol na dieta, nas concentrações sanguíneas de glicose (mg/dL), colesterol total (mg/dL), colesterol HDL (mg/dL), colesterol LDL (mg/dL), triglicerídeos (mg/dL), uréia (mg/dL), e ácidos graxos não esterificados (AGNE) (mmol/L), aspartato amino transferase (AST) (U/L) e gama glutamil transferase (GGT) (U/L). SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.

Variáveis	Tratamentos				CV(%)	P-valor
	T0	T1	T2	T3		
Glicose	62,62	63,38	63,25	61,88	6,18	0,9943
Colesterol total	167,50	203,94	215,56	207,50	13,17	0,0111
Colesterol HDL	149,31	175,38	179,69	180,94	16,84	0,1541
Colesterol LDL	17,50	20,79	25,56	25,50	42,71	0,1331
Triglicerídeos	3,56	3,88	3,06	3,50	31,40	0,3565
Uréia	42,31	45,38	46,06	48,94	13,11	0,1645
AGNE	0,271	0,295	0,300	0,343	13,98	0,0365
AST	100,13	106,19	114,57	111,81	15,42	0,3936
GGT	36,69	39,38	43,06	43,50	13,39	0,3975

T0 – sem inclusão de óleo de girassol; T1 – com inclusão de óleo de girassol até 6,0% de EE; T2 – com inclusão de óleo de girassol até 8,4% EE; T3 – com inclusão de óleo de girassol até 10,7% de EE na MS.

Em estudo realizado por Elliott et al. (1993), utilizando dieta controle (3,8% de EE) e três dietas experimentais contendo óleo de milho e sebo em diferentes proporções, com extrato etéreo de 5,2, 7,8 e 9,6% nos tratamentos de vacas em lactação, observaram aumento da concentração de colesterol total no sangue de vacas com cerca de 64 dias em lactação e suplementadas com gordura, com médias de 180 mg/dL e 246 mg/dL para o grupo controle e com 9,6% de EE na dieta, respectivamente. Os autores consideram que essa elevação nos níveis de colesterol plasmático é resultado da maior necessidade deste metabólito para a absorção e o transporte de ácidos graxos de cadeia longa na dieta.

Em trabalho conduzido por Freitas Júnior et al. (2010), avaliando a inclusão de óleo de soja, grãos de soja, e gordura protegida como fontes de gordura na dieta, todas com 5,5% de extrato etéreo na matéria seca total, em comparação a uma dieta controle (2,5% de EE) e sem adição de gordura suplementar, para vacas da raça holandesa, agrupadas em três quadrados latinos balanceados 4x4 foi constatado aumento nas concentrações de colesterol total e suas frações quando comparadas aos animais

submetidos à ração controle, tendo sido justificado em razão do maior consumo de ácidos graxos nas rações contendo fontes de gordura, o que proporcionou aumento das respectivas frações relativas ao metabolismo de lipídios transportadas no sangue, concordando com as conclusões de Elliot et al. (1993) e Schauff et al. (1992).

Os níveis sanguíneos de triglicerídeos apresentaram como média geral 3,50 mg/dL, estando estes valores dentro da faixa fisiológica (0 a 14 mg/dL) descrita por Kaneko et al. (2008), não diferindo entre os tratamentos utilizados.

Os teores de nitrogênio no sangue foram expressos neste trabalho como ureia, não diferindo entre os tratamentos ($p > 0,05$), e estando dentro dos limites fisiológicos de 42,88 à 64,26 mg/dL descritos por Kaneko et al. (2008).

As concentrações séricas de ácidos graxos não esterificados (AGNE) foram influenciadas pela inclusão de óleo na dieta, ajustando-se a uma equação linear ($Y = 0,007x + 0,24$; $r^2 = 0,97$). Mesmo tendo diferido entre os tratamentos utilizados, os valores de AGNE se encontram dentro da faixa considerada fisiológica para esta variável que, segundo KANEKO et al. (2008) situam-se entre 0,105 à 0,350 mmol/L. As diferenças encontradas entre os tratamentos quanto ao aumento dos AGNE podem estar relacionadas a um maior *turn-over* da gordura corporal, tendo em vista que a suplementação lipídica aumentou o colesterol plasmático.

Relatos encontrados na literatura a respeito da concentração de AGNE plasmático em animais suplementados com lipídeos são bastante variados, apresentando vários trabalhos em que a adição de gordura provocou aumento na concentração de AGNE sanguíneo (BERTICS & GRUMMER, 1999; AVILA et al., 2000), enquanto que outros autores não observaram alteração no teor desse metabólito no sangue (PIRES et al., 1996; BERMUDEZ et al., 2003).

De acordo com Grummer & Carrol (1991), o aumento na concentração plasmática de AGNE de vacas em lactação suplementadas com lipídios se deve a incompleta captura destes pelos tecidos após hidrólise dos triglicerídeos de lipoproteínas de muito baixa densidade (colesterol VLDL) pela lipoproteína lipase e/ou a um aumento na hidrólise de triglicerídeos do tecido adiposo.

As Figuras 5 e 6 ilustram o comportamento das variáveis colesterol total (COLt) e ácido graxos não esterificado (AGNE) nos diferentes tratamentos.

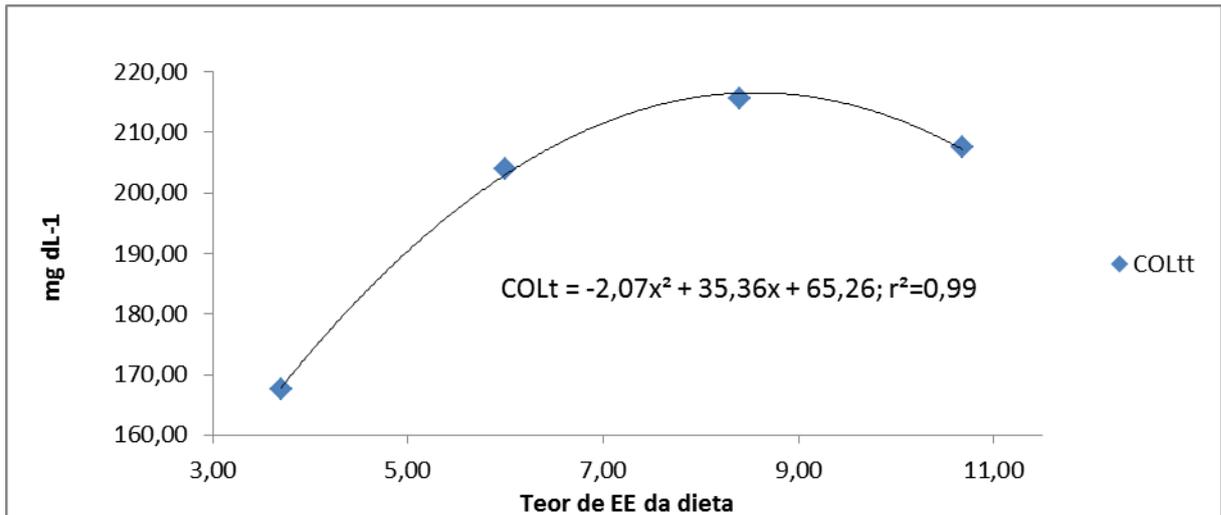


Figura 5 - Concentração plasmática de colesterol total (COLt) em relação aos níveis crescentes de extrato etéreo da dieta.

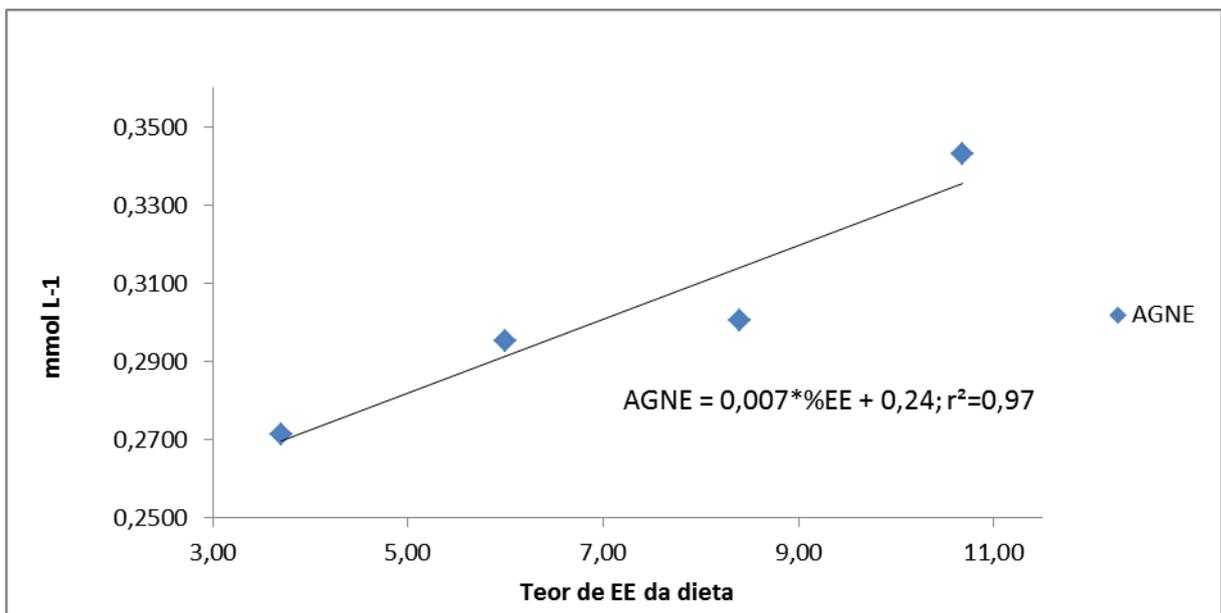


Figura 6 – Concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados (AGNE) em relação aos níveis crescentes de extrato etéreo da dieta.

Não houve diferença nos níveis plasmáticos de AST ($p>0,05$), estando os resultados encontrados dentro dos parâmetros considerados fisiológicos para bovinos, que segundo KANEKO et al. (2008) que vão de 78 a 132 U/L. Igualmente, não foi verificada diferença no que se refere à GGT ($p>0,05$), porém os valores séricos encontrados para essa enzima foram superiores aos considerados fisiológicos para bovinos, segundo KANEKO et al. (2008), que seriam de 6,1 à 17,4U/L.

Freitas Júnior et al. (2010), também não encontraram diferenças nas concentrações plasmáticas de glicose, triglicerídeos e GGT em relação às fontes de gordura empregadas.

4.6. Perfil de ácidos graxos da gordura do leite

Os tratamentos utilizados produziram efeitos no perfil de ácidos graxos da gordura do leite, aumentando a participação dos ácidos esteárico (C18:0), vacênico (C18:1t11) e ácido linoleico conjugado (CLA 1) (C18:2c9t11n6), e diminuindo os teores dos ácidos láurico (C12:0), miristoléico (C14:1n5), palmítico (C16:0) e palmitoléico (C16:1n7), como pode ser observado na Tabela 9.

Tabela 9. Efeito da inclusão de óleo de girassol na participação (mg/g) de ácidos graxos na gordura do leite produzido. SISPEL, Embrapa Clima Temperado, 2013.

Ácido graxo	Tratamentos				CV (%)	p-valor
	T0	T1	T2	T3		
C12:0	28,97	23,10	20,70	23,03	21,72	0,0359
C14:0	83,47	77,40	71,00	76,10	14,02	0,1883
C14:1n5	5,36	4,53	4,05	4,08	16,66	0,0091
C16:0	200,56	180,98	143,38	180,18	14,67	0,0029
C16:1n7	9,510	8,184	6,428	6,798	18,37	0,0020
C18:0	108,440	128,169	116,167	132,461	6,57	<0,0001
Vacênico	27,031	52,296	87,956	100,556	15,71	<0,0001
CLA-1	4,926	10,507	19,505	23,664	14,82	<0,0001
CLA-2	0,282	0,344	0,340	0,312	37,80	0,7277

C12:0 (Ácido Láurico), C14:0 (Ácido Mirístico), C14:1n5 (Ácido Meristoléico), C16:0 (Ácido Palmítico), C16:1n7 (Ácido Palmítico), Vacênico (C18:1n11t), CLA-1 (C18:2c9t11n6), CLA-2 (C18:2t10c12n6); T0 – sem inclusão de óleo de girassol; T1 – com inclusão de óleo de girassol até 6,0% de EE; T2 – com inclusão de óleo de girassol até 8,4% EE; T3 – com inclusão de óleo de girassol até 10,7% de EE na MS.

Verificou-se redução em torno de 28% na produção de ácido láurico e ácido palmítico ($p=0,03$ e $p=0,002$), ambos encaixando-se em equações quadráticas ($Y=0,34x^2 - 5,80x + 45,96$; $r^2=0,98$ e $Y = 2,61x^2 - 41,88x + 324,40$; $r^2=0,75$), respectivamente, sendo que a maior redução observada no T2 (8,4%EE) em relação ao tratamento controle.

A importância desse achado refere-se a que ácidos graxos láurico, mirístico e palmítico são considerados hipercolesterolêmicos, ou seja, associados com o aumento das concentrações plasmáticas de colesterol total e LDL- colesterol (Kris-Etherton & Yu, 1997).

Quanto ao ácido mirístico, não foram verificadas diferenças estatísticas entre os tratamentos. Apesar disso, as médias apresentadas foram numericamente diferentes também no tratamento T2, o que poderia ser um achado de importância biológica dentro do tema. Já a produção de seu isômero, o ácido miristoléico, diferiu

significativamente entre os tratamentos ($p=0,009$), encaixando-se em uma equação quadrática ($Y = 0,045x^2 - 0,82x + 7,78$; $r^2=0,99$), apresentando redução de mais de 20% do T0 para com os demais tratamentos.

Comportamento semelhante foi observado quanto ao ácido palmitoléico, um isômero do ácido palmítico, também diferindo entre os tratamentos empregados e ajustando-se em equação quadrática ($Y = 0,079x^2 - 1,56x + 14,33$; $r^2=0,94$).

A concentração de ácidos graxos considerados de elevado valor nutracêutico, como, os ácidos Vacênico (C18:1n11) e ácido linoléico conjugado CLA 1 (C18:2c9t11n6), apresentaram importantes diferenças entre os tratamentos ($p<0,0001$), ambas encaixando-se em equações lineares crescentes ($Y = 10,99x - 12,13$; $r^2=0,97$ e $Y = 2,79x - 5,47$; $r^2=0,98$), respectivamente. Ambos ácidos graxos sofreram aumento de forma linear conforme quando foi aumentado o nível de extrato etéreo empregado nas dietas experimentais, sendo da ordem de 68% para o ácido vacênico quando comparado o tratamento 3 (10,7%EE) à dieta controle (3,7%EE). Já a produção de CLA aumentou 3,8 vezes quando comparados os resultados obtidos no tratamento controle com a dieta com maior nível de inclusão de óleo de girassol (4,92 mg/g no T0 para 23,66 mg/g no T3, respectivamente).

Em experimento conduzido por Herváz (2008), utilizando 24 ovelhas leiteiras, distribuídas em quatro lotes, sendo dois lotes suplementados com dieta controle (2,25% de EE na MS) e dois com dieta contendo óleo de girassol livre (6,88% de EE na MS), também encontrou uma diminuição no C12:0 e C16:0, e um aumento notável no teor de CLA 1 (0,94 - 3,60 g/100 g de gordura do leite) e ácido vacênico (2,23 - 8,61 g/100 g de gordura do leite). Embora se tratando de espécies diferentes, ambas ruminantes, os resultados encontrados pelo referido autor corroboram com os encontrados neste estudo. ZHENG et al. (2005) em experimento utilizando 12 vacas Holandes de alta produção, em triplo quadrado latino, utilizando três dietas com mesmo extrato etéreo (6,7% na MS), mas diferentes quanto a inclusão de óleos vegetais (dieta com óleo de algodão, com óleo de milho e com óleo de soja) e dieta controle (sem adição de óleo e 4,7% de EE na MS), encontrou quantidades 2 vezes maiores de ácido vacênico (C18:1n11t) no leite produzido por vacas suplementadas com óleo de soja quando comparado a dieta controle (23,8mg/g e 12,6mg/g de gordura respectivamente), enquanto que o teor de CLA 1 (C18:2c9t11n6) encontrado na gordura do leite, aumentou de 3,5 mg/g na dieta controle para 6,0, 7,1, e 10,3 mg/g para as vacas alimentadas com óleo de algodão, milho e soja, respectivamente. O

mesmo autor também encontrou diminuição na produção dos ácidos mirístico e palmítico nos tratamentos utilizados. Esses resultados mostram-se semelhantes aos encontrados neste estudo quanto à diminuição de ácido palmítico, porém não foram verificadas diferenças na produção de ácido mirístico.

O aumento encontrado neste estudo na quantidade de CLA na gordura do leite, em função da suplementação com óleo vegetal rico em ácidos graxos insaturados, é igualmente amparado por afirmações neste sentido encontradas na literatura (McGUIRE et al., 1996; KELLY et al., 1998; YE et al., 2009; SOUZA, 2011).

Quanto a produção de CLA 2 (C18:2t10c12n6), este não diferiu entre os tratamentos empregados, sendo os valores médios encontrados superiores aos achados por Souza (2011) suplementando óleo de girassol em dietas a base de cana de açúcar, justificado pelo maior nível de inclusão de óleo no presente estudo. Na Figura 7 é mostrado o comportamento dos teores de ácido vacênico e ácido linoleico conjugado (CLA 1) frente aos níveis crescentes de extrato etéreo das dietas experimentais. Em experimento conduzido por Huang et al. (2008), utilizando dietas com diferentes fontes de lipídios e diferentes combinações entre as fontes na alimentação de vacas leiteiras (óleo de soja; CLA livre; óleo de soja + CLA; sais cálcicos de CLA; óleo de soja +sais cálcicos de CLA; CLA + óleo de soja), observou que as dietas com óleo de soja, CLA livre ou mistura de ambos, bem como de sais cálcicos de CLA produziram redução significativa no teor de ácidos graxos de cadeia curta e média (C4:0-C14:0), bem como C16:0 na gordura do leite em comparação com a dieta controle.

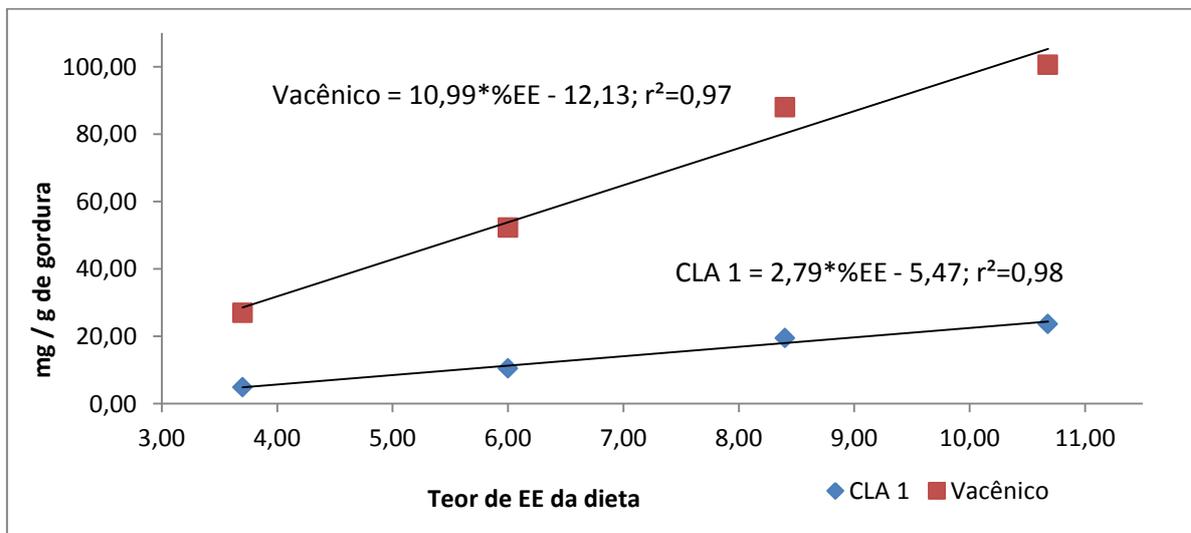


Figura 7 – Teores de ácido vacênico e ácido linoleico conjugado (CLA 1) frente aos níveis crescentes de extrato etéreo das dietas experimentais.

A extensão da redução foi maior para aquelas dietas que continham a maior quantidade de gordura (óleo de soja e óleo de soja + CLA). A diminuição nas concentrações de C4:0 - C14:0 e C16:0 no leite causado pelo CLA ou suplementação de óleo de soja são consistentes com relatos anteriores da literatura (CHOUGINARD et al., 1999;. DHIMAN et al., 2000;. PERFIELD et al., 2002). Huang et al., (2008) concluiu que a suplementação com CLA livre ou sais cálcicos de CLA, aumentaram a concentração de CLA na gordura do leite sendo que, a dieta com 5% de óleo de soja ou 4% de óleo de soja + 1% de CLA causou um teor ainda maior de CLA no leite e aumentou a produção diária de CLA no leite.

5. Conclusões

É possível incluir níveis crescentes de óleo de girassol na dieta de vacas da raça Jersey em lactação até 10,7% de extrato etéreo na matéria seca total, sem incorrer em prejuízos a saúde dos animais, obtendo maior aporte de energia através da dieta, com melhora da eficiência alimentar, melhorando a composição do leite e perfil de ácidos graxos da gordura do leite, sem afetar o volume de produção.

A adição de óleo de girassol melhorou a relação volumoso:concentrado das dietas, aportando mais energia em menor volume de alimento, situação essa favorável a sua utilização em períodos em que a capacidade de consumo esteja diminuída, como no período inicial da lactação.

6. Considerações Finais

Os resultados obtidos nesse estudo demonstram a possibilidade de alterar a composição da gordura láctea através da suplementação com óleo de girassol, diminuindo a participação de ácidos graxos saturados, e aumentando consideravelmente o teor de ácido linoleico conjugado (CLA) e ácido vacênico em sua composição. Estes resultados provavelmente darão origem a outros questionamentos e investigações, principalmente no que se refere à elaboração de derivados lácteos com intuito de concentrar estes ácidos graxos de importante valor nutracêutico, como manteiga e creme de leite. Nesse aspecto, pesquisas ainda deverão ser realizadas até que um produto final com qualidades nutracêuticas esteja disponível ao consumidor final.

7. Referências Bibliográficas

AKERS, R. Michael et al. **Lactation and the mammary gland**. Iowa State Press, 2002.

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.

ARRIAGA, H.; SALCEDO, G.; MARTÍNEZ-SULLER, L.; CALSAMIGLIA, S.; MERINO P.. Effect of dietary crude protein modification on ammonia and nitrous oxide concentration on a tie-stall dairy barn floor. **Journal of dairy science** v.93, n.7, p.3158-3165. 2010.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. **Official methods of analysis**. 16.ed. Arlington, 1996. 1137p.

AVILA, C. D., DE PETERS, 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, n.7, p.1505-1519, 2000.

BAUCHART, D. Lipid absorption and transport in ruminants. **J. Dairy Sci.**, v.76, p.3864-3881, 1993.

BAUMAN D.E.; HARVATINE K. J.; LOCK A. L. Nutrigenomics, Rumen-Derived Bioactive Fatty Acids, and the Regulation of Milk Fat Synthesis. **Annu. Rev. Nutr.** 31:299-319. 2011.

BAUMAN, D. E. et al. Major advances associated with the biosynthesis of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 4, p. 1235-1243, 2006.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v. 70, n. 1, p. 15-29, 2001.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M., Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annu. Rev. Nutr.** 23:203–27, 2003.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M., Regulation and Nutritional Manipulation of Milk Fat Low-Fat Milk Syndrome. In: **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 480, 2000.

BAUMAN, Dale E.; LOCK, Adam L.; PERFIELD II, James W. The role of trans fatty acids in the regulation of milk fat synthesis. In: **Proc. Intermountain Nutr. Conf.**, Salt Lake City, UT. 2005. p. 85-96.

BAUMGARD, Lance H. et al. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v. 278, n. 1, p. R179-R184, 2000.

BAUMGARD, Lance H.; SANGSTER, Jodi K.; BAUMAN, Dale E. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). *The Journal of Nutrition*, v. 131, n. 6, p. 1764-1769, 2001.

BEN SALEM, H.; KRZEMINSKI, R.; FERLAY, A.; DOREAU, M.. Effect of lipid supply on in vivo digestion in cows: comparison of hay and corn-silage diets. *Can. J. Anim. Sci.* v.73, p.547–557. 1993.

BENJAMIN, S.; SPENER, F. Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits. *Nutrition&Metabolism*, v. 6, n. 36, p. 1743-7075. 2009.

BERMUDES, R. F. **Gordura protegida na dieta de vacas de alta produção à campo, em alfafa verde ou pré-secada, na fase inicial da lactação.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. 294p. 1999. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado em Zootecnia)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BERMUDES, R. F.; LÓPEZ, J.; GALLARDO, M.; SILVA, J. H. S. D.; CUATRIN, A. Protected fat to high producing dairy cows, under grazing, supplemented with fresh or haylage alfalfa, in early lactation: blood parameters. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, n.2, p. 405-410, 2003.

BERTICS, SANDRA J.; GRUMMER, RIC R. Effects of fat and methionine hydroxy analog on prevention or alleviation of fatty liver induced by feed restriction. *Journal of dairy Science*, v. 82, n. 12, p. 2731-2736, 1999.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, v.37, n.8, p. 911-917, 1959.

BOBE, G.; YOUNG, J. W.; BEITZ, D. C. Pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, Champaign, v. 87, p. 3105-3124, 2004.

BRASIL. Instrução Normativa nº.15, de 17 de julho de 2001. Proíbe a importação de ruminantes, embriões e produtos derivados destas espécies, quando procedentes e/ou originários de países que registraram casos autóctones da encefalopatia espongiforme bovina e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 18 jul. 2001.

BROCKMAN, R.P. Glucose and short-chain fatty acid metabolism. Pages 249–265 In: **Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism**. J. M. FORBES AND J. FRANCE, ed. CAB International, Wallingford, UK, 1993.

BRUSS, M. L. Lipids and ketones, p.83-115, 1997. In: KANEKO, J. J., HARVEY, J. W., e BRUSS, M. L. (Eds.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. 2008. 986p.

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. **J. Dairy Sci.** 76, 762–774. 1993.

CHALUPA, W.; GALLIGAN, D. T.; FERGUSON, J. D.. Animal nutrition and management in the 21st century: dairy cattle. **Animal feed science and technology**, v. 58, n. 1, p. 1-18, 1996.

CHALUPA, W.; VECCIARELLI, B.; ELSER, E. et al. Ruminal fermentation "in vitro" of long chain fatty acids. **J. Dairy Sci.**, v. 69, n. 5, p. 1293-1303, 1986.

CHILLIARD, Y.; FERLAY A.; MANSBRIDGE R.M.; DOREAU M. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. **Ann. Zootech.** 49:181–205, 2000.

CHILLIARD, Yves; FERLAY, Anne; DOREAU, Michel. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. **Livestock Production Science**, v. 70, n. 1, p. 31-48, 2001

CHOI, B.R.; PALMQUIST, D. L.; ALLEN, M. S. Cholecystokinin mediates depression of feed intake in dairy cattle fed high fat diets. **Domestic animal endocrinology**, v. 19, n. 3, p. 159-175, 2000.

CHOI, N. J.; ENSER, M.; WOOD, J. D.; SCOLLAN, N. D.. Effect of breed on the deposition in beef muscle and adipose tissue of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids. **Animal Science**, v. 71, n. 3, p. 509-519, 2000.

CHOUINARD, P. Y. et al. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 82, n. 12, p. 2737-2745, 1999.

CHRISTENSEN, R. A., CAMERON, M. R., CLARK, J. H., DRACKLEY, J. K., LYNCH, J. M., & BARBANO, D. M.. Effects of amount of protein and ruminally protected amino acids in the diet of dairy cows fed supplemental fat. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n.6, p.1618-1629, 1994.

CHRISTIE, W.W.. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol steers. **Journal of Animal Science**, v.23: p.1072-1077. 1982.

CHURCH D. C. **El Ruminat: Fisiología Digestiva y Nutrición**. 3ª edição. Acribia (Zaragoza, Espanha). 1988.

CHURCH, D.C.; POND, W.G. **Bases científicas para la nutrición y alimentación de los animales domésticos**. Zaragoza: Acríbia, 1977.

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

- CORL, B.A.; LACY, S.H.; BAUMGARD, L.H.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; PHILLIPS, S.; BAUMAN, D.E. Examination of the importance of Δ -9 desaturase and endogenous synthesis of conjugated linoleic acid in lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**, 77, 118. 1999.
- COSTA, M. G. **Rações com diferentes fontes de gordura para vacas em lactação**. Tese – Título de Doctor Scientiae. UFV, Minas Gerais, 2008.
- COSTA, R.G.; QUEIROGA, R.C.R.E.; PEREIRA, R.A.G., Influência do alimento na produção e qualidade do leite de cabra. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 38, 307-321. 2009.
- DAI, X. J.; WANG, C.; ZHU, Q.. Milk performance of dairy cows supplemented with rapeseed oil, peanut oil and sunflower seed oil. **Czech J Anim Sci**, v.56, n.4, p.181-191. 2011.
- DAVIS, C. L. et al. Low-fat milk syndrome. In: **Physiology of digestion and metabolism in the ruminant**. Proceedings of the third international symposium, Cambridge, England; August 1969. Newcastle-upon-Tyne: Oriel Press, 1970. p. 545-565.
- DE ASSIS PEREIRA, C. M., DA SILVA, J. F. C., DE CAMPOS, S., VALADARES FILHO, J. M. D. S. C., CECON, P. R. Grão de Soja Moído na Ração de Vaca em Lactação. 1. Consumo e Digestibilidade dos Nutrientes. **R. Bras. Zootec**, v.27, n.6, p.1218-1224, 1998.
- DE FREITAS JÚNIOR, J. E.; PRADA, F. P. R. L. F.; MATURANA, S. J. R. G. M.; VENTURELLI, F. C. F. B. C.. Parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras suplementadas com diferentes fontes de gordura. **Ciência Rural**, v.40, n.4, p. 950-956, 2010.
- DEMEYER, D. and DOREAU, M. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. **Proceedings of the Nutrition Society**, 58, 593–607.1999.
- DHIMAN, T. R. 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, n. 5, p. 1016-1027, 2000.
- DIRKSEN, G. Sistema digestivo. In: DIRKSEN, G.; GRUNDER, H. D.; STÖBER, M.. **Exame clínico dos bovinos**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, p. 166-288.
- DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, Suppl. 1,78: 15-35. 1997.
- DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Influence d'unesupplémentation de la ration en lipidessur la qualité du lait chez la vache. **INRA Prod. Anim**, v. 5, n. 2, p. 103-111, 1992.
- DRACKLEY, J. K.; ELLIOTT, J. P. Milk composition, ruminal characteristics, and nutrient utilization in dairy cows fed partially hydrogenated tallow. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 1, p. 183-196, 1993.

EIFERT, E.C.; LANA, R.P.; LANNA, D.P.D. et al. Perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e monensina no início da lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.1, p.231-240, 2006.

ELLIOTT, J. P. et al. Diets containing high oil corn and tallow for dairy cows during early lactation. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 3, p. 775-789, 1993.

EMERY, R. S. Feeding for increase milk protein. **Journal of Dairy Science**, v. 61, n. 6, p. 825-828, 1978.

FAO - Food and Agriculture Organization. Disponível em:
<http://www.fao.org/index_en.htm>. Acesso em: 12 mar. 2014.

FIRKINS, J.L.; HRISTOV, A.N.; HALL, M.B. et al. Integration of ruminal metabolism in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.89, n.1, E31-E51, (E. Suppl.) 2006.

GAAFAR, Khalid Mahmoud Mohamed. **Effect of fat in comparison to starch in an isoenergetic diet on the metabolism of high yielding dairy cows**. 2004. Tese de Doutorado. Ph. D Thesis, Institute of Physiology, Faculty of Veterinary Medicine. Leipzig.

GAGLIOSTRO, G. & CHILLIARD, Y. Duodenal rapeseed oil infusion in early and mid-lactation cows. 2. Voluntary intake, milk production, and composition. **Journal of Dairy Science**, v.74, p. 499-509. 1991.

GONZALES, F. H. D. Uso do perfil metabólico para determinar o status nutricional em gado de corte. In: Gonzáles, F. H. D.; Barcellos, J. O.; Ospina, H.; Ribeiro, L. A. O. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre: Gráfica UFRGS, 2000.106p.

GONZÁLES, F. H. D., SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre, 2003.

GONZALEZ, F. H. D., ROCHA, J. A. Metabolic profile variations and reproduction performance in Holstein cows of different milk yields in southern Brazil. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 26, p. 52-64, 1998.

GONZÁLEZ, F.H.D.; SILVA, S.C. **Patologia clínica veterinária: Texto introdutório**. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, 2008. 358 p.

GOODLING, L. E.; GRUMMER, R. R. Effects of postruminal protein on fatty acid digestibility in dairy cows. **Journal of dairy science**, v.81, n.6, p.1624-1629, 1998.

SOUZA, SHIRLEY MOTTA de. **Desempenho e perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de girassol em dietas à base de cana-de-açúcar**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.

GREGORY, L., BIRGEL JUNIOR, E. H., MIRANDOLA, R. M. S., ARAÚJO, W. P., & BIRGEL, E. H. Reference values of the enzymatic activities of the aspartate

aminotransferase and gamma glutamyltransferase of Jersey breed. The influence of age and sexual factors, and of the infection by the bovine leukosis virus. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.6, p.515-522, 1999.

GRIINARI, J. M.; BAUMAN, D. E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. **Advances in conjugated linoleic acid research**, v. 1, n. 1, 1999.

GRIINARI, J. M.; CHOUINARD, P. Y.; BAUMAN, D. E. Trans fatty acid hypothesis of milk fat depression revised. **Proceedings of the Cornell nutrition conference for feed manufacturers**, Cornell University, Ithaca, NY, pg. 208–216, 1997.

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

GRIINARI, J.M.; DWYER, D.A.; MCGUIRE, M.A. et al. Partially hydrogenated fatty acid and milk fat depression. **J. Dairy. Sci.**, v.79, n.1, p.177. 1996.

GRUMMER R.R. Gordura da dieta: Fonte energética e/ou regulador metabólico? In: **Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos**. 8ª edição. Anais. Conapec Jr. Unesp - Botucatu, 83-108. 2004.

GRUMMER, R. R. et al. Effect of feed on the composition of milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. Supplement 1, 1990

GRUMMER, R. R.; CARROLL, D. J. Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 9, p. 3838-3852, 1991.

HALL, M.B. Challenges with non-fiber carbohydrate methods. **Journal of Animal Science**, v.81, n.12, p.3226-3232, 2003.

HARFOOT, C. G.; HAZLEWOOD, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In: **The rumen microbial ecosystem**. Springer Netherlands, 1997. p. 382-426.

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M.S.. Effects of fatty acid supplements on feed intake, and feeding and chewing behavior of lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** v. 89, p. 1104–1112. 2006.

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M.S.. The effect of production level on feed intake, milk yield, and endocrine responses to two fatty acid supplements in lactating cows. **J. Dairy Sci.** v. 88, p. 4018–4027. 2005.

HAYASHI, A.A. **Efeito do ácido linoléico conjugado na atividade de enzimas reguladoras da lipogênese em ratas durante a lactação e suas implicações no metabolismo e na composição do leite**. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.

- HERVÁS, Gonzalo et al. Effect of diet supplementation with sunflower oil on milk production, fatty acid profile and ruminal fermentation in lactating dairy ewes. **Journal of Dairy Research**, v. 75, n. 4, p. 399, 2008.
- HUANG, Y. 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, n. 1, p. 260-270, 2008.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Pecuária Municipal**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 12 mar. 2014.
- ÍTAVO, Luís Carlos Vinhas et al. Substituição da silagem de milho pela silagem do bagaço de laranja na alimentação de vacas leiteiras: consumo, produção e qualidade do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 5, p. 1498-1503, 2000.
- JENKINS, T. C.; JENNY B.C.. Effect of hydrogenated fat on feed intake, nutrient digestion, and lactation performance of dairy cows. **J. Dairy Sci.** 72:2316–2324. 1989.
- JENKINS, T. C.; PALMQUIST, D. L. Effect of added fat and calcium on in vitro formation of insoluble fatty acid soaps and cell wall digestibility. **Journal of Animal Science**, v. 55, n. 4, p. 957-963, 1982.
- JENKINS, T.C. Lipid metabolism in the rumen. Symposium: Advances in ruminant lipid metabolism. **J. Dairy Sci.**, v.79, p.3851-3863,1993.
- JENKINS, T.C. Lipid metabolism in the rumen.**J. Dairy Sci.**,v.76, p.3851-3863,1993.
- JENKINS, THOMAS C.; MCGUIRE, MARK A. Effects of nutrition on milk composition. A 25-year review of research reported in the Journal of Dairy Science. In: **Tri-State Dairy Nutrition Conference**. 2005. p. 51-60.
- JENKINS, Tom; LUNDY, F. Feeding various fat sources to lactating dairy cows and their effects on milk quality. 2001.
- JENKIS, T.C.; JENNY, B.F. Effect of hydrogenated fat on feed intake, nutrient digestion, and lactation performance of dairy cow. **J. Dairy Sci.**, v.72, p.2316-2324, 1989.
- JORRITSMA, R. et al. Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro. **Anim. Reprod. Scien.** [S.l.], v. 81, p. 225–235, 2004.
- KANEKO, J.J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M.L. (Ed.). **Clinical biochemistry of domestic animals**. Access Online via Elsevier, 2008.
- KELLY, M. L.; BERRY, J. R.; DWYER, D. A.; GRIINARI, J. M.; CHOUINARD, P. Y.; VAN AMBURGH, M. E.; BAUMAN, D. E.. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. **The Journal of nutrition**, v. 128, n. 5, p. 881-885. 1998.

KELLY, M.L.; BERRY, J.R.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; CHOUINARD, P.Y.; VAN AMBURGH, M.E.; BAUMAN, D.E. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *Journal of Nutrition*, 128, 881-885. 1998.

KENNELLY, J. J.; ROBINSON, B.; KHORASANI, G. R. Influence of carbohydrate source and buffer on rumen fermentation characteristics, milk yield, and milk composition in early-lactation Holstein cows. *Journal of dairy science*, v. 82, n. 11, p. 2486-2496, 1999.

KOZLOSKI G.V., **Bioquímica dos ruminantes**. 3ª edição. Ed. da UFSM (Santa Maria, RS). 140p. 2012.

KRIS-ETHERTON, Penny M.; YU, Shaomei. Individual fatty acid effects on plasma lipids and lipoproteins: human studies. *The American journal of clinical nutrition*, v. 65, n. 5, p. 1628S-1644S, 1997.

KRUIP, T. A. M. et al. Characteristics of abnormal puerperium in dairy cattle and the rationale for common treatments. In: Diskin, M.G. (Ed.), Fertility in the High Producing Dairy Cow. Occasional Publication No. 26. *Brit. Soc. of Anim. Scien.*, Edinburgh, p.63–79, 2001.

LAGO, Ernani Paulino et al. Parâmetros Metabólicos em vacas leiteiras durante o período de transição pós-parto. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 11, n. 1-2, 2004.

LICITRA, G.; HERNANDEZ, T.M.; VAN SOEST, P.J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminant feed. *Animal Feed Science Technological*, v.57, n4, p.347-358, 1996.

LOCK, A. L.; HARVATINE, K. J.; DRACKLEY, J. K.; BAUMAN, D. E.. Concepts in fat and fatty acid digestion in ruminants. In *Proc. Intermountain Nutr. Conf* . p. 85-100. 2006.

LOCK, A. L.; HORNE, C. A.; BAUMAN, D. E.; SALTER, A. M.. Butter naturally enriched in conjugated linoleic acid and vaccenic acid alters tissue fatty acids and improves the plasma lipoprotein profile in cholesterol-fed hamsters. *The Journal of nutrition*, v. 135, n. 8, p. 1934-1939. 2005.

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

LOCK, A.L.; GARNSWORTHY, P.C. Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cow's milk. *Animal Science*, v.74, p.163- 176, 2002.

LOCK, A.L.; SHINGFIELD, K.J., Optimising milk composition. In *Dairying: Using Science to Meet Consumers' Needs*, ed. E. Kebreab; J. Mills; D.E. Beever, pp. 107–188. Nottingham, UK: Nottingham Univ. Press, 2004

LÓPEZ, S. E.; LÓPEZ, J.; STUMPF, W. **Parâmetros séricos de vacas leiteiras na fase inicial de lactação suplementadas com diferentes fontes de gordura.** 2004.

LÓPEZ, S.E. et al., 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, 2007.

LÓPEZ, S.E., **Suplementação com Diferentes Fontes de Gordura para Vacas Jersey de Alta Produção na Fase Inicial de Lactação.** Porto Alegre. 242p. Tese de Doutorado em Zootecnia - Produção Animal, Faculdade de Agronomia, UFRGS. 2001.

LÓPEZ, SUSANA ESTER; LÓPEZ, JORGE. Suplementação lipídica para vacas leiteiras. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 11, p. 97-106, 2005.

LÓPEZ, Susana Ester; LÓPEZ, Jorge; STUMPF JUNIOR, Waldyr. Production, milk yield and composition, and feed efficiency in Jersey cows supplemented with fat. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, v. 15, n. 1, 2007.

LORGERIL, M. De; SALEN, P. Fish and n-3 fatty acids for the prevention and treatment of coronary heart disease: nutrition is not pharmacology. **The American Journal of Medicine**, v.112, n.4, p.316-319, 2002.

LUCAS, H. L. Extra-period latin-square change-over designs. **Journal of Dairy Science**, v. 40, n. 3, p. 225-239, 1957.

MACHMÜLLER, A.; KREUZER, M. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 79, n. 1, p. 65-72, 1999.

MACHMÜLLER, A.; KREUZER, M.. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. **Canadian Journal of Animal Science**. v.79, p. 65-72.1999.

MALAFAIA, P.A.M.; VALADARES FILHO, S.C.; COELHO DA SILVA, J.F. et al. Sebo bovino em rações para vacas em lactação. 1. Consumo dos nutrientes, produção e composição do leite. **R. Soc. Bras. Zootec.**, v. 25 n. 1, p. 153-163, 1996.

MARTIN, C. et al. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 10, p. 2642-2650, 2008.

MARTÍNEZ, M. A. L.; PÉREZ, H.M.; PÉREZ, A.L.; GÓMEZ, C.G.; GARZÓN, S.A.I. Efecto de la grasa de la dieta sobre la grasa láctea de los rumiantes: una revisión. **Interciencia** . v.35, p. 723 - 729. 2010.

MCGUIRE, M.A.; MCGUIRE, M.K.; GUY, M.A. et al. Effect of dietary lipid concentration on content of conjugated linoleic acid (CLA) in milk from dairy cattle. **J. Anim. Sci.**, v.74, supl.1: 266, 1996.

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

MILLER, W. F.; SHIRLEY, J. E.; TITGEMEYER, E. C.; BROUK, M. J. Comparison of full-fat corn germ, whole cottonseed, and tallow as fat sources for lactating dairy cattle. ***Journal of dairy science***, v.92, n.7, p. 3386-3391. 2009.

MOATE, P. J.; CHALUPA, W.; BOSTON, R. C.; LEAN, I. J.. Milk fatty acids II: Prediction of the production of individual fatty acids in bovine milk. ***Journal of dairy science***, v. 91, n. 3, p. 1175-1188. 2008.

MÜHLBACH, P.R.F.; OSPINA, H.; PRATES, E.R. et al. Aspectos nutricionais que interferem na qualidade do leite. In: **Encontro Anual da UFRGS sobre Nutrição de Ruminantes**. Porto Alegre: UFRGS p.73-102, 2000.

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Manipulation of ruminal fermentation. In: **The rumen microbial ecosystem**. Springer Netherlands, 1997. p. 523-632.

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

NELSON, David L.; LEHNINGER, Albert L.; COX, Michael M. **Lehninger principles of biochemistry**. Macmillan, 2008.

NIANOGO, A. J.; AMOS, H. E.; FROETSCHER, M. A.; KEERY, C. M. Dietary fat, protein degradability, and calving season: effects on nutrient use and performance of early lactation cows. ***Journal of dairy science***, v.74, n.7, p.2243-2255, 1991.

NÖRNBERG, J. L. **Efeito de diferentes fontes de gordura na dieta de vacas Jersey na fase inicial de lactação**. 2003. 199p. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em Zootecnia – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre-RS. 2003.

NÖRNBERG, J.L. et al., Desempenho de vacas Jersey suplementadas com diferentes fontes lipídicas na fase inicial da lactação. ***Revista Brasileira de Zootecnia***, v. 35, n. 4, p. 1431-1438, 2006.

NÖRNBERG, J.L.; STUMPF JR., W.; LÓPEZ, J. et al. Valor do farelo de arroz integral como fonte de gordura na dieta de vacas Jersey na fase inicial da lactação: digestibilidade aparente de nutrientes. ***Revista Brasileira de Zootecnia***, v.33, n.6, p.2412-2421, 2004.

NÖRNBERG, J.L.; STUMPF JR., W.; LÓPEZ, J. et al. Valor do farelo de arroz integral como fonte de gordura na dieta de vacas Jersey na fase inicial da lactação: digestibilidade aparente de nutrientes. ***Revista Brasileira de Zootecnia***, v.33, n.6, p.2412-2421, 2004.

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

OLIVEIRA, S.G.; SIMAS, J.M.C.; SANTOS, F.A.P.; IMAIZUMI, H. Suplementação com diferentes fontes de gordura em dietas com alta e baixa inclusão de concentrado para vacas em lactação. **Arsveterinaria**, v. 2, p. 160-168. 2004.

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, n.1-2, p.65-82, 2004.

PALMQUIST, D. L. et al. Glucose and insulin metabolism in conventional (ruminating) and veal calves. In: **FEDERATION PROCEEDINGS**. 9650 ROCKVILLE PIKE, BETHESDA, MD 20814-3998: FEDERATION AMER SOC EXP BIOL, 1986. p. 900-900.

PALMQUIST, D. L. Fat in dairy rations [dairy cattle nutrition related to feed composition and milk fat content]. **Bulletin National Renderers Association**, 1982.

PALMQUIST, D. L. The feeding value of fats. **Feed science**, v. 12, p. 293-311, 1988.

PALMQUIST, D. L. Utilización de lípidos en dietas de rumiantes. **Anales XII Curso de especialización FEDNA**, 1996.

PALMQUIST, D. L., AND T. C. JENKINS. Fat in lactation rations . **J. Dairy Sci.** v. 63, p. 1-14. 1980.

PALMQUIST, D. L.; GRIINARI, J. M. Milk fatty acid composition in response to reciprocal combinations of sunflower and fish oils in the diet. **Animal feed science and technology**, v. 131, n. 3, p. 358-369, 2006.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in Lactation Rations< sup> 1, 2</sup>: Review. **Journal of dairy science**, v. 63, n. 1, p. 1-14, 1980.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C.; JOYNER JR, A. E. Effect of dietary fat and calcium source on insoluble soap formation in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 4, p. 1020-1025, 1986.

PALMQUIST, D. L.; WEISBJERG, Martin Riis; HVELPLUND, Torben. Ruminant, intestinal, and total digestibilities of nutrients in cows fed diets high in fat and undegradable protein. **Journal of dairy science**, v. 76, n. 5, p. 1353-1364, 1993.

PALMQUIST, D. L.; WEISS, W. P., Blood and hydrolyzed feather meals as sources of undegradable protein in high fat diets for cows in early lactation. **J. Dairy Sci.**, v. 77, p.1630-1643, 1994.

PALMQUIST, D.L., Effects of calcium salts of isoacids and palm fatty acid distillate on feed intake, rumen fermentation, and milk yield in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v.71, n.1, p.254, 1988.

PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, A.D.; BARBANO, D.M. Feed and animal factors influencing milk fat composition. **J. Dairy Sci.** v. 76, p. 1753–71, 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. **J. DairySci.**, v.63, p.1-14, 1980.

PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELLI, T.T. et al. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, Cap.10, p.287-310. 2006.

PALMQUIST, DONALD L. Use of fats in diets for lactating dairy cows. **Proceedings-Easter School in Agricultural Science**, University of Nottingham, 1984.

PANTOJA, J.; FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L; HULL, B. L.. Effects of fat saturation and source of fiber on site of nutrient digestion and milk production by lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** v. 77, p. 2341–2356. 1994.

PARIZA, M.W. The biological activities of conjugated linoleic acid. In: **Advances in Conjugated Linoleic Acid Research**. Editores: Yurawencz MP, Mossoba MM, Kramer JKG, Pariza MW, Nelson GJ AOCS (Champaign, IL), p. 12-20. 1999.

PARODI, P.W. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. **J. Dairy Sci.**, Champaign, v. 82, n. 6, p. 1339-1 349, 1999.

PAYNE, J. M.; PAYNE, S. The metabolic profile test. Oxford: **Oxford Press**, 1987.

PERFIELD II, J. W. et al. Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 10, p. 2609-2617, 2002.

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

PETIT, H.V.; DEWHURST, R.J.; SCOLLAN, N. et al. Milk production and composition, ovarian function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats1. **J. Dairy Sci.**, v.85, p.889-899, 2002

PETIT, H.V.; TWAGIRAMUNGU, H. Conception rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources. **Theriogenology**, v.66, p.1316-1324, 2006.

PIPEROVA, Liliana S. et al. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat–depressing diet. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 10, p. 2568-2574, 2000.

PIRES, A. V.; EASTRIDGE, M. L.; FIRKINS, J. L. Roasted soybeans, blood meal, and tallow as sources of fat and ruminally undegradable protein in the diets of lactating cows. **Journal of dairy science**, v. 79, n. 9, p. 1603-1610, 1996.

- RABIEE A.R.; BREINHILD K.; SCOTT W.; GOLDBER H.M.; BLOCK E.; LEAN I.J.. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. **Journal of dairy science**. v. 95, n. 6, p.3225-3247. 2012.
- RELLING, A. E.; REYNOLDS, C. K. Feeding rumen-inert fats differing in their degree of saturation decreases intake and increases plasma concentrations of gut peptides in lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 3, p. 1506-1515, 2007.
- ROGER, V., FONTY, G., KOMISARCZUK-BONY, S., & GOUET, P. Effects of physicochemical factors on the adhesion to cellulose avicel of the ruminal bacteria *Ruminococcus flavefaciens* and *Fibrobacter succinogenes* subsp. *succinogenes*. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n.10, p. 3081-3087, 1990.
- RUEGG, P. L.; MILTON, R. L. Body condition scores of Holstein cows on Prince Edward Island, Canada: relationships with yield, reproductive performance, and disease. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 3, p. 552-564, 1995.
- RUPPERT, L. D.; DRACKLEY, J. K.; BREMMER, D. R.; CLARK, J. H.. Effects of tallow in diets based on corn silage or alfalfa silage on digestion and nutrient use by lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 2, p. 593-609. 2003.
- SALEM, H. BEN et al. Effect of lipid supply on in vivo digestion in cows: Comparison of hay and corn silage diets. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 73, n. 3, p. 547-557, 1993.
- SANTOS, C. A. J.; RIET-CORREA, F.; DANTAS, A. F. M.; BARROS, S. S.; MOLYNEUX, R. J.; MEDEIROS, R. M. T.; SILVA, D. M.; OLIVEIRA, O. F. Toxic hepatopathy in sheep associated with the ingestion of the legume *Tephrosia cinerea*. **Journal Veterinary. Diagnosis Investigation**. v.19, p.690-694. 2007.
- SANTOS, F. L., SILVA, M. T. C., LANA, R. D. P., BRANDÃO, S. C. C., VARGAS, L. H., & ABREU, L. R. D. Efeito da suplementação de lipídios na ração sobre a produção de ácido linoléico conjugado (CLA) e a composição da gordura do leite de vacas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30,n.6, p.1931-1938. 2001.
- SANTOS, J. **Derivados da Extração do Óleo de Girassol para Vacas Leiteiras**. Tese de Doutorado. UNESP - Jaboticabal – São Paulo. Fevereiro, 2008.
- SANTOS, J.E.P.. Feeding for Milk Composition. In Proc. **VI Intern. Cong. on Bovine Medicine. Spanish Association of Specialists in Bovine Medicine (ANEMBE)**, Santiago de Compostela, Spain. p. 163-172. 2002.
- SANTOS, J.E.P.; BILBY, T.R.; THATCHER, W.W.; et al. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.23-30. 2008.
- SARRUGE, J.R.; HAAG, H.P. **Análise química em plantas**. Piracicaba: ESALQ, Departamento de Química, 1974. 56p.

SCHAFHÄUSER JR., J. **Níveis crescentes de gordura de arroz para vacas leiteiras de alta produção no início da lactação.** Porto Alegre. UFRGS. 140 p. Tese de Doutorado em Zootecnia - Produção Animal, Faculdade de Agronomia, UFRGS. 2005.

SCHAUFF, D.J.; CLARK, J.H. Effects of feeding diets containing calcium salts of long-chain fatty acids to lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.75, n.12, p.2990-3002.1992.

SHAUFF, D.; CLARK, J.; DRACKLEY, J. Effects of feeding lactating dairy cows containing extruded soybeans and calcium salts of long chain fatty acids. *J. Dairy Sci.* v. 75, n. 7, p. 3003-3019. 1992.

SHINGFIELD KJ, *et al.*, Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.* 77: 165-79, Part 1, August 2003.

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

SILVA, P.H.F.; PEREIRA, D.B.C.; OLIVEIRA, L.L. et al. **Físico-química do leite e derivados – métodos analíticos.** Juiz de Fora: Oficina de Impressão Gráfica e Editora Ltda, 1997. 190p.

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

SMITH, W.A.; HARRIS, JR. B.; VAN HORN, V.V.; WILCOX, J.C., Effects of forage type on production of dairy cows supplemented with whole cottonseed, tallow, and yeast. *J. Dairy Sci.* v.76, p. 205–215. 1993.

SNIJDERS, S. E. M. et al. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on in vitro oocyte development in dairy cows. *Theriogenology*, [S.l.], v. 53, p. 981–989, 2000.

SONG, MAN K.; KENNELLY, JOHN J. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into ruminant's products. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 16, n. 2, p. 306-314. 2003.

STAPLES, C.R.; WILTBANK, M.C.; GRUMMER, R.R. et al. Effect of long chain fatty acids on lactation performance and reproductive tissues of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v.83, p.278. 2000.

STAPLES, Charles R. Milk fat depression in dairy cows-Influence of Supplemental fats. In: *Florida Ruminant Nutrition Symposium*, Gainesville, Florida. 2006.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **The SAS system for windows.** v.9.0 Cary: SAS Institute Inc., 2002.

STEGMAN, G. A. Lactation of dairy cows fed unsaturated dietary fat and receiving bovine somatotropin. *J. Dairy Sci.* Champaing. v. 75, n. 7, p. 1936-1945, 1992.

STERN, L. S. et al. The effects of gallium nitrate on osteopenia induced by ovariectomy and a low-calcium diet in rats. **Bone Miner.** v. 25, p. 59–69. 1994.

STEWART, Catriona. 8 Authenticity of edible oils and fats: the legal position. *Oils and Fats Authentication*, p. 181, 2002.

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

TANAKA, K. Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. **J. Animal Sci.**, v.76, n.4, p.291-303, 2005.

THATCHER, W.W.; MEYER, M.D.; Danet-Desnoyers, G. Maternal recognition of pregnancy. **Journal of Reproduction and Fertility**, supplement, v.49, p.15-28, 1995.

UEDA, K.; FERLAY, A.; CHABROT, J.; LOOR, J.J.; CHILLIARD, Y.; DOREAU, M., Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage: concentrate ratios. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n.12, p. 3999-4007. 2003.

VALADARES FILHO, S. de C. **Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos**. UFV, 2006.

VALADARES FILHO, S.C.; PINA, D.S., Fermentação ruminal. In: **Nutrição de ruminantes**. Editores: Berchielli, T. T.; Pires, A. V.; Oliveira, S. G. Funep. (Jaboticabal-SP), 51- 178, 2006.

VAN NEVEL, C.; DEMEYER, D., Feed additives and other interventions for decreasing methane emissions. In: Wallace, R.J., Chesson, A. (Eds.), **Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding**. VCH Publishers, New York, p. 329–349, 1995.

VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Science**, Champaign, v.74, n. 10, p. 3583- 3597, 1991

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 476 p. 1994.

VAN SOEST, P.J., ROBERTSON, J.B., LEWIS, B.A. . Symposium: carbohydrate methodology, metabolism, and nutritional implications in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v.74, n.10, p.3583-3597, 1991.

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

VISENTAINER, J.V. e FRANCO, M.R.B. **Ácidos Graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação**. Ed. Varela, São Paulo, 2006.

- WACHIRA, A.M. et al. Effects of dietary fat source and breed on the carcass composition, n-3 polyunsaturated fatty acid and conjugated linoleic acid content of sheep meat and adipose tissue. *Br. J. Nutr.*, v.88, p. 697-709, 2002.
- WATHES, D. C. et al. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol. of Reprod.*, [S.I.], v. 77, p. 190-201, 2007.
- WEISS, W.P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: **CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS**, 61., 1999, Ithaca. Proceedings... Ithaca: Cornell University, 1999. p.176-185.
- WEST, H. J.. Evaluation of total serum bile acids concentrations for the diagnosis of hepatobiliary disease in cattle. *Res. Vet. Sci.*, v. 51, p. 133 – 140. 1991.
- WILDMAN, E. E. et al. 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.
- WITTWER, F. Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: GONZÁLEZ, F.H.D.; BARCELLOS, J.O.; OSPINA, H. et al. (Eds.) Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000. p.9-22
- WITTWER, F., BÖHMWALD, H., CONTRERAS, P. A., FILOZA, J., Analisis de los resultados de perfiles metabólicos en rebaños lecheros en Chile. *Arch. Med. Vet.*, 1987.
- WITTWER, F., Diagnóstico dos desequilíbrios metabólicos de energia em rebanhos bovinos. In: González, F. H.D., Barcellos, J.O., Ospina, H., Ribeiro, L. A. O. **Perfil metabólico em ruminantes: seu uso em nutrição e doenças nutricionais**. Porto Alegre, Brasil, Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2000.
- WU, Zu; 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, 1994.
- YE, J. A.; WANG, C.; WANG, H. F.; YE, H. W.; WANG, B. X.; LIU, H. Y.; LIU, J. X.. Milk production and fatty acid profile of dairy cows supplemented with flaxseed oil, soybean oil, or extruded soybeans. *Acta Agriculturae Scand Section A*, v. 59, n. 2, p. 121-129. 2009.
- ZACHUT, M. et al. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. *Reproduction*, [S.I.], v. 135, p. 683- 692, 2008.
- ZHENG, H. C. 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*, v. 88, n. 6, p. 2037-2042, 2005.

Anexos

Composição de ácidos graxos da gordura do leite nos diferentes tratamentos, expresso em miligramas por grama de gordura do leite (mg/g de ácidos graxos)

Ácidos Graxos	T0	T1	T2	T3	p-valor	CV
Ácido Butírico C4:0	21,976	22,750	21,671	23,179	0,8534	17,17
Ácido Capróico C6:0	16,547	14,936	13,401	14,601	0,1316	16,81
Ácido Caprílico C8:0	10,975	9,478	9,011	8,886	0,1004	17,78
Ácido Cáprico C10:0	25,656	21,119	19,015	20,806	0,0643	21,75
Ácido Undecanóico C11:0	2,027	1,981	1,533	1,615	0,1022	25,66
Ácido Láurico C12:0	28,97	23,10	20,70	23,03	0,0359	21,72
Ácido Tridecanóico C13:0	1,191	1,006	0,960	0,953	0,2335	24,44
Ácido Mirístico C14:0	83,47	77,40	71,00	76,10	0,1883	14,02
Ácido Miristoléico C14:1n5	5,358	4,527	4,051	4,083	0,0091	16,66
Ácido Pentadecílico C15:0	7,577	7,276	6,651	6,558	0,1343	13,60
Ácido Palmítico C16:0	200,56	180,98	143,38	180,18	0,0029	14,67
Ácido Palmitoléico C16:1n7	9,510	8,184	6,428	6,798	0,0020	18,37
Ácido Margárico C17:0	5,313	4,924	4,134	4,207	0,0029	13,29
Ácido Margaroleico C17:1n7c	1,237	1,141	1,020	1,044	0,3077	20,78
Ácido Esteárico C18:0	108,44	128,16	116,16	132,46	<0,0001	6,57
Ácido Elaídico C18:1n9t	6,269	8,581	8,864	10,552	0,0002	16,35
Ácido Vacênico C18:1	27,03	52,29	87,95	100,55	<0,0001	15,71
Ácido Oleico C18:1n9c	152,43	165,68	143,83	143,97	0,1605	13,83
Ácido Linolelaídico C18:2n6t9t12	0,788	0,992	1,141	1,302	0,0005	16,49
Ácido Linoleico C18:2n6c	17,542	18,445	18,568	16,718	0,5800	16,73
Ácido Araquídico C20:0	1,316	1,337	1,248	1,269	0,4104	8,56

Continua.

Anexos – continuação

Composição de ácidos graxos da gordura do leite nos diferentes tratamentos, expresso em miligramas por grama de gordura do leite (mg/g de ácidos graxos)

Ácido Linolênico C18:3n6	0,915	0,920	0,930	0,870	0,7995	14,42
Ácido Gadoléico C20:1n9c11	0,423	0,505	0,480	0,468	0,4566	21,59
Ácido α - Linolênico C18:3n3	3,455	2,661	2,643	2,838	0,0122	16,44
CLA-1	4,926	10,507	19,505	23,664	<0,0001	14,82
CLA-2	0,282	0,344	0,340	0,312	0,7277	37,80
CLA-3	0,158	0,268	0,211	0,276	0,1654	49,05
Ácido Linolênico C18:3n6	0,915	0,920	0,930	0,870	0,7995	14,42
Ácido γ - Linolênico C20:2n6c	0,376	0,405	0,458	0,383	0,3351	23,58
Ácido Behênico C22:0	0,601	0,657	0,681	0,607	0,2402	13,86
Ácido Homo - γ - Linolênico C20:3n6c	0,637	0,716	0,557	0,684	0,1149	19,43
Ácido Araquidônico C20:4n6	0,682	0,655	0,528	0,628	0,2795	25,89
Ácido Docosadienoico C22:2n6c	0,107	0,065	0,050	0,099	0,0732	57,48
Ácido Lignosérico C24:0	0,840	0,673	0,543	0,752	0,0736	30,91
Ácido Eicosapentaenoico (EPA) C20:5n3	0,071	0,108	0,116	0,075	0,2620	56,23
Ácido Docosaexaenoico (DHA) C22:6n3c	0,102	0,091	0,085	0,079	0,5112	33,56