



GILSON SEBASTIÃO DIAS JÚNIOR

**DESEMPENHO DE VACAS LEITEIRAS
SUPLEMENTADAS COM SAL DE CÁLCIO
RICO EM ÁCIDO LINOLÉICO OU GRÃO DE
SOJA TOSTADO**

LAVRAS - MG

2011

GILSON SEBASTIÃO DIAS JÚNIOR

**DESEMPENHO DE VACAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM SAL
DE CÁLCIO RICO EM ÁCIDO LINOLÉICO OU GRÃO DE SOJA
TOSTADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de Produção e Nutrição de Ruminantes, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

DSc. Marcos Neves Pereira

LAVRAS - MG

2011

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Dias Júnior, Gilson Sebastião.

Desempenho de vacas leiteiras suplementadas com sal de cálcio
rico em ácido linoléico ou grão de soja tostado / Gilson Sebastião
Dias Júnior. – Lavras : UFLA, 2011.

74 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2011.

Orientador: Marcos Neves Pereira.

Bibliografia.

1. Ácidos graxos. 2. Linoléico plasmático. 3. Perfil lipídico. 4.
Suplemento lipídico. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 636.2142

GILSON SEBASTIÃO DIAS JÚNIOR

**DESEMPENHO DE VACAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM SAL
DE CÁLCIO RICO EM ÁCIDO LINOLÉICO OU GRÃO DE SOJA
TOSTADO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção e Nutrição de Ruminantes, para obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 04 de agosto de 2011.

DSc. Renata Apocalypse Nogueira Pereira

EPAMIG

DSc. Sandro César Salvador

UFLA

DSc. Gustavo Augusto Andrade

IFSUL DE MINAS/ MACHADO

DSc. Marcos Neves Pereira

Orientador

LAVRAS – MG

2011

À minha mãe, Vilméia; ao meu pai, Gilson; ao meu irmão, Henrique e à minha
irmã, Gisele

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde e sabedoria.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Zootecnia pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Ao CNPQ pela bolsa de estudos.

Aos membros da banca de avaliação: doutores Renata Apocalypse Nogueira Pereira, Gustavo Augusto Andrade, Sandro César Salvador e José Camisão de Souza que aceitou o convite de membro suplente da banca.

À QGN (Química Geral do Nordeste SA, Nova Ponte, MG) e à Cooperalfa (Chapecó, SC) pelo apoio financeiro na condução dos experimentos.

À Professora Ana Vlândia do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Viçosa pela orientação nas análises de perfil de ácidos graxos no sangue.

Ao professor Marcos Neves Pereira pelo aprendizado e por dedicar parte do seu precioso tempo à minha orientação.

Ao professor Dante Pazzanese Lanna e a técnica Maria Antônia Ladamar pela orientação nas análises de perfil de ácidos graxos no leite.

RESUMO

Avaliou-se a suplementação de vacas leiteiras com 1,4% da matéria seca da dieta de extrato etéreo oriundo de sal de cálcio rico em ácido linoléico (SCa) ou soja tostada grosseiramente moída (ST). Vinte e quatro vacas da raça holandesa receberam estes tratamentos e o Controle (C) em oito Quadrados Latinos 3x3, com períodos de 28 dias. A produção diária de leite corrigida para energia foi 27,3kg no SCa, 28,9 no C e 29,8 no ST ($P<0,01$). O SCa deprimiu a gordura do leite, sem afetar a secreção de proteína e lactose, aumentou a secreção de ácido vaccênico (C18:2 t10,c12) e o teor de C18:1 trans na gordura do leite, e reduziu o teor de ácidos graxos de cadeia curta (C4:0 a C14:0). A ST aumentou a secreção de ácidos esteárico, linoléico e linolênico, e não deprimiu a síntese de ácidos graxos de cadeia curta. O teor de ácido linoléico no plasma foi aumento pela suplementação com lípides ($P<0,01$). As dietas com lípido suplementar deprimiram o consumo de matéria seca ($P=0,03$) e induziram ganho na relação entre a produção de leite e o consumo ($P=0,03$). A suplementação com lípides deprimiu a concentração de protozoários no fluido ruminal ($P<0,01$), mas não determinou a eficiência de síntese microbiana ($P=0,94$). A digestibilidade aparente do extrato etéreo foi menor no C ($P<0,01$), sugerindo que os lípides da dieta basal foram saturados no rúmen. Os teores na gordura do leite dos ácidos graxos C12:0, C14:0 e C16:0 foram reduzidos pelo SCa e ambos suplementos lipídicos aumentaram o teor de ácido rumênico (C18:2 c9,t11). O SCa resultou em perfil de ácidos graxos do leite nutraceuticamente desejável, mas deprimiu a síntese mamária de gordura.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Linoléico plasmático. Perfil lipídico.

ABSTRACT

The supplementation of dairy cows with 1.4% of diet dry matter as ether extract from linoleic acid rich calcium salt (SCa) or coarsely ground heated soybeans (ST) was evaluated. Twenty-four Holstein cows received these treatments and the Control (C) in eight 3x3 Latin Squares, with 28-day periods. The daily yield of energy corrected milk was 27.3kg for SCa, 28.9 for C, and 29.8 for ST ($P<0.01$). The SCa depressed milk fat, without affecting protein and lactose secretion, increased the secretion of vaccenic acid (C18:2 t10,c12) and the content of C18:1 trans in milk fat, and reduced the content of short chain fatty acids (C4:0 to C14:0). The ST increased the secretion of stearic, linoleic, and linolenic acids, and did not depress the synthesis of short chain fatty acids. The plasma content of linoleic acid was increased by lipids supplementation ($P<0.01$). The lipid supplemented diets decreased dry matter intake ($P=0.03$) and induced gain in the ratio of milk yield to intake ($P=0.03$). Lipid supplementation decreased rumen fluid protozoa content ($P<0.01$), but did not determine the efficiency of microbial synthesis ($P=0.94$). The apparent digestibility of ether extract was lowest for C ($P<0.01$), suggesting that lipids in the basal diet were saturated in the rumen. The milk fat contents of C12:0, C14:0, and C16:0 fatty acids were reduced by SCa and both lipid supplements increased rumenic acid (C18:2 c9,t11) content. The SCa resulted in milk fatty acid profile nutraceutically desirable, but depressed the mammary synthesis of fat.

Keywords: Fatty acids. Lipid profile. Plasma linoleic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Rotas de biohidrogenação do ácido linoléico no rúmen.....	16
Figura 2 Relacionamento entre vacas no consumo diário de ácido linoléico e o teor no plasma.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das dietas nos tratamentos sal de cálcio (SCa), controle (C) e soja tostada (ST).....	40
Tabela 2	Teor de ácidos graxos na gordura no Megalac, na Alfa Nutrisoja e nas dietas sal de cálcio (SCa), controle (C) e soja tostada (ST).....	42
Tabela 3	Digestibilidade <i>in vitro</i> da fibra em detergente neutro (DIVFDN).....	48
Tabela 4	Digestibilidade aparente de nutrientes no trato digestivo total, ácido linoleico no plasma, excreção de alantoína na urina e protozoários no fluido ruminal nos tratamentos sal de cálcio (SCa), controle (C) e soja tostada (ST).....	50
Tabela 5	Desempenho nos tratamentos sal de cálcio (SCa), controle (C) e soja tostada (ST).....	53
Tabela 6	Atividade mastigatória de vacas leiteiras consumindo dietas à base de Megalac [®] , dieta padrão (Controle) e Soja Tostada (ST).....	54
Tabela 7	Perfil de Ácidos Graxos no Leite (% do Total de Ácidos Graxos).....	58
Tabela 8	Produção de Ácidos Graxos no Leite (Secreção total em gramas/dia).....	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1	Metabolismo de lípidos no rúmen.....	14
2.2	Ácido linoléico.....	17
2.3	Ácido linoléico conjugado.....	18
2.4	Sais de cálcio de ácidos graxos.....	20
2.5	Soja integral tostada.....	27
2.6	Depressão de gordura no leite.....	32
2.6.1	Teoria da deficiência de acetato.....	32
2.6.2	Teoria da deficiência de β -hidroxibutirato.....	33
2.6.3	Teoria glicogênica/insulínica ou teoria da competição entre tecidos.....	33
2.6.4	Teoria do metilmalonato/vitamina B12.....	34
2.6.5	Teoria dos ácidos graxos <i>trans</i>	34
2.6.6	Teoria da biohidrogenação.....	35
2.7	Lípidos e consumo de matéria seca.....	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1	Análise estatística.....	46
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5	CONCLUSÃO.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

1 INTRODUÇÃO

A adição de lípidos à dieta de vacas leiteiras tem sido tradicionalmente feita com o intuito de aumentar a densidade energética, sem os inconvenientes da indução de acidose ruminal e do calor de fermentação decorrentes do suprimento de energia através de carboidratos rapidamente fermentáveis (PALMQUIST; JENKINS, 1980). Entretanto, o uso de lípidos como manipulador do teor e composição da gordura do leite, da imunidade e da reprodução tem suplantado seu uso como fonte energética (SANTOS; GRECO, 2010). Ácidos graxos específicos podem ser incorporados em membranas celulares, ser precursores de compostos capazes de alterar a função celular, e podem estimular ou suprimir a expressão gênica de enzimas (HARVATINE; BOISCLAIR; BAUMAN, 2008; LOOR; HERBEIN, 2003; PIPEROVA et al., 2000). A suplementação dietética de lípidos insaturados pode melhorar a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras (SANTOS et al., 2008), importante, já que falha reprodutiva é a maior causa de descarte em rebanhos leiteiros (SILVA; ALMEIDA, 2008). O aumento induzido pela suplementação lipídica insaturada no teor de ácido linoléico conjugado (CLA) na gordura do leite também pode resultar em produtos lácteos mais desejáveis à saúde humana (BAUMAN; LOCK, 2010).

Microrganismos ruminais hidrogenam ligações duplas em ácidos graxos, para contrapor a toxicidade sobre o ambiente ruminal de formas solúveis de lípidos e suprir a demanda microbiana por intermediários da biohidrogenação (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1988). O uso de suplementos lipídicos de baixa hidrogenação ruminal é necessário quando o objetivo é fomentar a absorção intestinal de ácidos graxos insaturados. Sais de cálcio de ácidos graxos (JENKINS; PALMQUIST, 1984) e oleaginosas processadas grosseiramente (REDDY; MORRIL; NAGARAJA, 1994) são considerados

suplementos lipídicos pouco ativos, ou inertes, capazes de reduzir a hidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados.

Entretanto, a extensão da hidrogenação ruminal dos ácidos linoléico e linolênico da dieta é ao redor de 70 a 95% e 85 a 100%, respectivamente (LOCK et al., 2006). Intermediários da hidrogenação ruminal de lípidos insaturados podem deprimir a síntese mamária de gordura quando absorvidos para o sangue (BAUMAN; GRINARI, 2001). Ácidos graxos poliinsaturados também são hipofágicos (LITHERLAND et al., 2005; RELLING; REYNOLDS, 2007). A magnitude da resposta negativa em teor de gordura do leite e consumo à suplementação lipídica depende do nível de suplementação e do lípido suplementado (ALLEN, 2000), podendo ser maior em dietas baseadas em silagem de milho (ONETTI; GRUMMER, 2004). Mohamed et al. (1988) observaram que o óleo na soja integral não deprimiu o teor de gordura do leite comparativamente a óleo de soja livre, mas foi similarmente indutor de queda no consumo de alimentos. O mecanismo envolvido na resposta negativa em teor de gordura e consumo à suplementação lipídica é distinto e dependente do lípido ingerido (BREMNER et al., 1998).

Os lipídeos da soja são ricos em ácido linoléico (C18:2 n-6), um ácido graxo essencial que deve ser suprido pela dieta e que é capaz de atuar positivamente sobre a função ovariana, uterina, embrionária (STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998) e a imunidade (SILVESTRE et al., 2010) de vacas leiteiras. Sal de cálcio rico em ácido linoléico e oléico, em comparação a sal de cálcio rico em palmítico e esteárico, aumentou a proporção de ácido linoléico dentre os ácidos graxos do plasma e melhorou a qualidade dos folículos ovulatórios e o teor de hormônios esteróides no líquido folicular e no plasma de vacas leiteiras (ZACHUT et al., 2008). Morales, Palmquist e Weiss (2000) avaliaram a suplementação de vacas leiteiras com soja tostada ou sebo bovino. A

soja tostada aumentou os teores plasmáticos e na gordura do leite de ácidos linoléico e linolênico e reduziu o teor na gordura do leite de intermediários da biohidrogenação ruminal de lípidos insaturados, sugerindo que parte dos ácidos graxos insaturados no grão de soja escapa da hidrogenação ruminal, enquanto aqueles liberados no rúmen são eficientemente hidrogenados. A proporção de dissociação ruminal de sais de cálcio de ácidos graxos (SUKHIJA; PALMQUIST, 1990) e de hidrogenação podem determinar o teor de ácido linoléico no sangue em resposta à suplementação com lípidos insaturados.

Objetivou-se avaliar o desempenho, a digestibilidade, o perfil de ácidos graxos do leite e o teor plasmático de ácido linoléico de vacas leiteiras suplementadas com lípidos oriundos de sal de cálcio rico em ácido linoléico ou do grão de soja tostado grosseiramente moído.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metabolismo de lípidos no rúmen

O efeito dos lípidos sobre o animal é influenciado pelo metabolismo de lípidos no rúmen, este determinado por vários fatores, como: tipo da forragem na dieta (silagem de milho ou outras forragens), taxa de fermentação ruminal e capacidade tamponante da dieta (determinantes do pH ruminal), sistema alimentar (consumo distribuído ao longo do dia ou consumo concentrado em tempo restrito), tipo da fonte lipídica (oleaginosas diferindo no processamento, gorduras animais ou formas comerciais de gordura inerte no rúmen), teor de lípidos na dieta e tipo do ácido graxo (insaturação e posição das ligações duplas e comprimento da cadeia de carbono).

O metabolismo ruminal de lipídeos determina o perfil de ácidos graxos disponíveis para os tecidos e órgãos do corpo. Dois processos ocorrem no

metabolismo ruminal de triglicerídeos, fosfolípidos e galactolípidos: lipólise (hidrólise das ligações éster e liberação de ácidos graxos e glicerol) e hidrogenação dos ácidos graxos insaturados (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1988). Lipólise é um pré-requisito à hidrogenação ruminal de ligações duplas em ácidos graxos, já que este processo requer que a terminação carboxil dos ácidos graxos esteja livre. O catabolismo de lípidos no rúmen é praticamente nulo, resultando em produção líquida de gordura, decorrente da síntese microbiana *de novo* de ácidos graxos de cadeia longa a partir de acetato (JENKINS, 1993).

Durante a lipólise, os microrganismos ruminais hidrolizam os lípidos até ácidos graxos e glicerol (CHURCH, 1988). O glicerol liberado pela hidrólise é utilizado pelas bactérias para produção de AGV, entretanto as bactérias não são capazes de utilizar os ácidos graxos para a produção de energia por se tratarem de compostos extremamente reduzidos. Entretanto elas podem incorporar ácidos graxos em seu citoplasma como ácidos graxos livres ou ainda utilizá-los em sua membrana citoplasmática como fosfolípidos.

Após a hidrólise, os ácidos graxos são biohidrogenados e isomerizados. A biohidrogenação consiste na adição de H aos ácidos graxos nos locais de suas duplas ligações por enzimas chamadas redutases (CHURCH, 1988) aumentando o grau de saturação destes. A isomerização ocorre como um passo intermediário da biohidrogenação dos ácidos graxos. Neste ponto, por ação de enzimas chamadas isomerases produzidas pelos microrganismos, os locais e conformação geométrica de algumas ligações *cis* das cadeias lipídicas são convertidas a ligações *trans*. A exemplo de ácidos graxos poliinsaturados, como ácido linoléico (C18:2 *cis* 9, *cis* 12), o primeiro passo no processo de biohidrogenação até ácido esteárico (C18:0) é a isomerização de uma das duplas ligações, o que leva a produção de um ácido graxo conjugado (C18:2 *cis* 9, *trans* 11), e essa reação é considerada rápida no processo de biohidrogenação. O segundo passo envolve a adição de 2 H ao ácido conjugado que resulta na produção do ácido

trans vacênico (C18:1 *trans* 11). O último passo é a conversão deste último a ácido esteárico (C18:0) (SANTOS; GRECO, 2010).

A extensão da hidrogenação ruminal dos ácidos linoléico e linolênico da dieta é ao redor de 70 a 95% e 85 a 100%, respectivamente (LOCK et al., 2006). A hidrogenação completa dos ácidos linoléico (C18:2 c9,c12), linolênico (C18:3 c9,c12,c15) ou oléico (C18:1 c9) resulta em ácido esteárico (C18:0), sendo este o ácido graxo de maior fluxo do rúmen para absorção no intestino delgado (BAUMAN; LOCK, 2010). A hidrogenação de lípidos insaturados é feita por bactérias divididas em grupos A e B (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1988). A variedade de bactérias do grupo A, capazes de converter ácidos graxos poliinsaturados à C18:1 *trans*, é maior que a de microrganismos do grupo B, capazes de converter este intermediário da biohidrogenação a ácido esteárico (Figura 1).

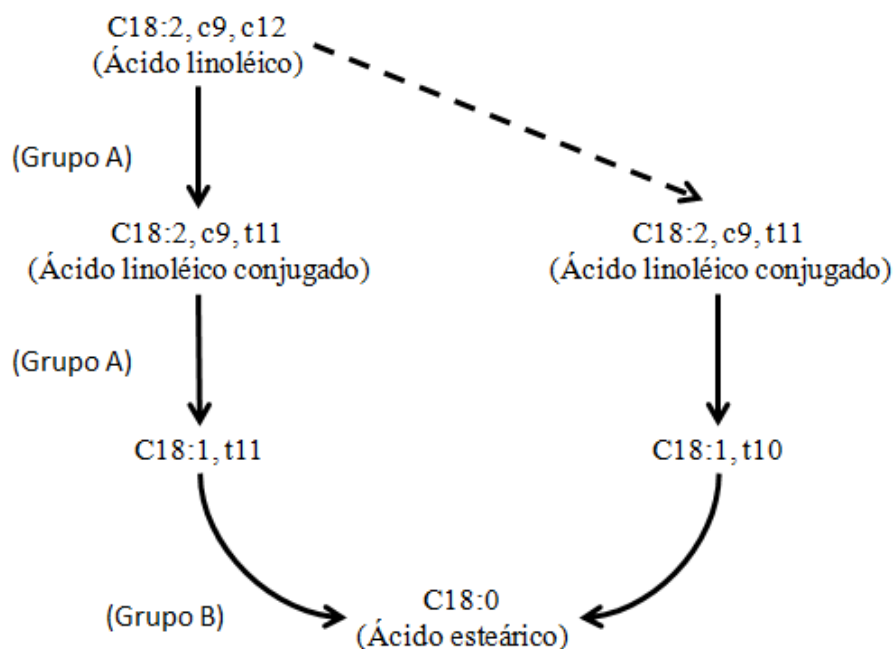


Figura 1 Rotas da biohidrogenação do ácido linoléico no rúmen

Fonte: Bauman e Griinari (2003)

Fatores que reduzem a saturação completa de ácidos graxos insaturados no rúmen são a presença de ionóforos, baixo pH ruminal e alta suplementação de gordura (LOCK et al., 2006). Nestas situações ocorre acúmulo intraruminal de ácidos graxos C18:1 trans e isômeros conjugados do ácido linoléico, os CLA (BAUMAN; GRIINARI, 2003), que podem ser absorvidos para a corrente sanguínea e incorporados à gordura do leite.

2.2 Ácido linoléico

O ácido linoléico é um ácido graxo poliinsaturado que contém duas duplas ligações em conformação *cis* entre o carbono 9 e 10 e entre o carbono 12 e 13 (C18:2 c9,c12). Como as células mamíferas não expressam o gene para dessaturases capazes de adicionar ligações duplas além do carbono 9, a única forma de suprir esses ácidos graxos é a ingestão contínua pela dieta. Assim como outros nutrientes, certos ácidos graxos são considerados essenciais na dieta de ruminantes e humanos.

Produtos lácteos contêm em média 70% de ácidos graxos saturados e 30% de ácidos graxos insaturados. Pesquisadores têm proposto que o aumento na proporção de ácidos graxos insaturados, como ácido linoléico e linolênico, podem aumentar o valor nutricional de derivados lácteos, devido aos potenciais efeitos benéficos sobre o teor de colesterol (REKLEWSKA; BERNATOWICZ, 2003; REKLEWSKA et al., 2002) e a incidência de doenças coronárias e cardiovasculares (WILLIAMS, 2000).

Pesquisas também têm demonstrado o relacionamento positivo entre a suplementação de ácidos graxos insaturados e a eficiência reprodutiva de vacas leiteiras (STAPLES; BURKE; THATCHER, 1998). O mecanismo para o ganho em reprodução pode envolver a modulação da produção de prostaglandinas e a expressão de enzimas responsáveis pelo metabolismo esteroide (WATHES; ABAYASEKARA; AITKEN, 2007). Elmes et al. (2004) verificaram que a suplementação de ácido linoléico elevou a concentração plasmática de ácido araquidônico (C20:4) e prostaglandinas em ovelhas gestantes. A alimentação de vacas com gordura rica em ácido linoléico durante o final da gestação e início da lactação potencializa o crescimento folicular, a secreção de prostaglandina uterina, a taxa de prenhez e a qualidade dos embriões, enquanto a suplementação com fontes de ácido linolênico após o terço médio da lactação

suprime a síntese de prostaglandina uterina e melhora a qualidade embrionária e a manutenção da prenhez (SANTOS et al., 2008). Zeron, Sklan e Arav (2002) verificaram aumento do número de folículos ovarianos e oócitos de alta qualidade com a utilização de sabão de cálcio rico em ácidos graxos poliinsaturados em comparação a uma dieta controle sem adição de óleo suplementar.

Zachut et al. (2008) observaram que a suplementação de vacas leiteiras no pré e pós parto com 215g/d de sal de cálcio rico em ácido linoléico e oléico, em comparação a sal de cálcio rico em palmítico e esteárico, melhorou a qualidade dos folículos ovulatórios e o teor de hormônios esteróides no líquido folicular e no plasma. A produção de leite também foi maior no tratamento com sal de cálcio rico em ácido linoléico, mesmo com similaridade no consumo diário de matéria seca. A proporção de ácido linoléico no plasma foi maior no tratamento com alto nível de ácidos graxos insaturados (56,24 vs. 53,68g/100g de ácidos graxos totais).

2.3 Ácido linoléico conjugado

A incorporação de intermediários da biohidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados a produtos lácteos é uma área de interesse crescente. O ácido rumênico (C18:2 c9,t11) é o principal isômero de CLA presente na gordura do leite e do corpo de ruminantes. Este CLA pode proteger humanos de alguns tipos de câncer, diabetes, imunossupressão, arteriosclerose, crescimento ósseo e obesidade (BELURY, 2002; EVANS; BROWN; MCINTOSH, 2002; MCGUIRE; MCGUIRE, 1999). O ácido vaccênico (C18:1 t11) também foi capaz de inibir lesões malignas em glândulas mamárias de ratos (LOCK et al., 2006) e inibir o crescimento de células cancerígenas na glândula mamária e colón de humanos (IP; BANNI; ANGIONI, 2003) por causa de sua conversão

em ácido rumênico por dessaturases presentes nos tecidos. Entretanto, alguns estudos têm relatado que C18:2 t10,c12, quando consumido em altas doses, como encontrado em suplementos comerciais de CLA, pode causar efeitos nocivos à saúde humana (TRICON et al., 2004). O C18:2 t10,c12 também é um potente inibidor da síntese de ácidos graxos de cadeia curta pela glândula mamária de bovinos (BAUMGARD et al., 2000).

Os CLA encontrados na gordura do leite e na carne de ruminantes têm origem na hidrogenação parcial de ácidos graxos poliinsaturados no rúmen ou na síntese endógena no tecido adiposo e glândula mamária. O aumento da concentração de CLA no leite pode ser obtido por estratégias alimentares capazes de aumentar a concentração ruminal de CLA ou seu precursor C18:1 trans para síntese endógena (BAUMAN; LOCK, 2006). A delta 9 dessaturase, por exemplo, atua adicionando uma insaturação no carbono 9 do ácido vaccênico (C:18:1 t11) formando o CLA C18:2 c9,t11. Griinari et al. (2000) infundiram 10 g/d de óleo de esterculina no abomaso de vacas em lactação, rico em ácido ciclopropenóico, potente inibidor da enzima delta 9 desaturase, e concluíram que 64% do CLA do leite era de origem endógena. Mosley et al. (2006) infundiram ácido vaccênico marcado com C¹³ e observaram que a síntese endógena representou mais de 80% do CLA do leite, a ausência de C¹³ no plasma demonstrou que a glândula mamária foi o principal sítio de ação da delta 9 dessaturase em vacas leiteiras.

Huang et al. (2008) avaliaram diferentes fontes de gordura em 36 vacas leiteiras. Os tratamentos foram: Controle sem óleo suplementar, 5% da matéria seca de óleo de soja, 1% de CLA livre, 1% de CLA como sal de cálcio, 1% de CLA livre + 4% de óleo de soja, 1% de CLA como sal de cálcio + 4% de óleo de soja. Não houve diferença entre tratamentos no consumo de matéria seca e na produção de leite. Todos os tratamentos com óleo suplementar deprimiram a produção e o teor de gordura do leite, sendo que óleo de soja + CLA livre ou na

forma de sal de cálcio foram os mais depressores. Houve aumento na concentração plasmática de CLA e na concentração de ácido linoléico no plasma e na gordura do leite em todos os tratamentos, sendo que o mais estimulador foi óleo de soja + CLA como sal de cálcio.

2.4 Sais de cálcio de ácidos graxos

Sais ou sabões de cálcio são produtos da reação de íons cálcio com o grupamento carboxil de ácidos graxos saturados ou insaturados (JENKINS; PALMQUIST, 1984). Os sais de cálcio são sólidos em temperatura ambiente, possuem baixa solubilidade no fluido ruminal e são supostamente pouco hidrogenados pelos microrganismos do rúmen. Uma proporção do complexo entre ácido graxo e cálcio passa intacta pelo rúmen, se dissociando nas condições ácidas do abomaso, onde são absorvidos como ácidos graxos livres.

Os ácidos graxos podem estar presentes na forma protonada ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$) ou não protonada ($\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_n\text{-COO}^-$). A constante de dissociação (K) do ácido define a proporção entre as formas protonada (AH) e desprotonada (A^-) em um dado valor de pH. Desde que os valores numéricos de K são números exponenciais negativos, é convencional expressar K como pK ($\text{pK} = -\log K$). O pK dos ácidos graxos é normalmente entre 4 e 5. O pK de um ácido é aquele pH em que espécies protonadas e desprotonadas estão presentes em iguais concentrações ($[\text{A}^-]/[\text{AH}] = 1$). A equação de Henderson-Hasselbalch prevê o equilíbrio: $\text{pH} = \text{pK} + \log [\text{A}^-]/[\text{AH}]$. Quando $[\text{A}^-] = [\text{AH}]$, $\text{pH} = \text{pK}$. Em pH abaixo do pK predomina a forma protonada do ácido, enquanto em pH acima do pK predomina a forma desprotonada. Assumindo pK de 5 para determinado ácido graxo, a relação $[\text{A}^-]/[\text{AH}]$ é 100/1 em pH 7; 10/1 em pH 6; 1/1 em pH 5; e 0,1/1 em pH 4. Quanto menor o pK , também é menor a

proporção da forma protonada. Assumindo pK de 4 para determinado ácido graxo, a relação $[A^-]/[AH]$ é 1000/1 em pH 7; 100/1 em pH 6; 10/1 em pH 5; e 1/1 em pH 4.

Queda no pH ruminal ou maior pK do ácido aumentam a proporção do sal de cálcio em forma protonada, reduzindo a proporção na forma de sal. O grupamento carboxil sem o cálcio complexado (-COOH) propicia a hidrogenação dos ácidos graxos insaturados pelos microrganismos ruminais (CHALUPA; KUTCHES, 1968). Misturas de ácidos graxos com baixo pK e manejos alimentares capazes de aumentar o pH ruminal são desejáveis quando a meta é manter maior proporção de sais de cálcio intactos no rúmen, reduzindo a hidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados.

O Megalac foi lançado em 1984, sendo o primeiro sal de cálcio comercial. Os sais de cálcio comerciais variam em suas propriedades nutricionais, caracterizado pelo quanto afetam a fermentação ruminal e pela resistência dos ácidos graxos insaturados à hidrogenação no rúmen (WU; OHAJURUKA; PALMQUIST, 1991). A proporção do sal de cálcio que passa intacta pelo rúmen depende de fatores determinantes do pK da mistura de ácidos graxos, como o grau de insaturação e o comprimento da cadeia de carbono no lípide, e da dieta consumida e o conseqüente pH ruminal (SUKHIJA; PALMQUIST, 1990). Quanto maior o pK do lípide utilizado, menor a proporção de interação entre os ácidos graxos e o cálcio no pH do fluído ruminal, menor a estabilidade do sal, e maior a susceptibilidade de biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados no rúmen (NEVEL; DEMEYER, 1996).

A utilização de triglicerídeos de palma, sêbo, soja ou canola é comum na indústria de sais de cálcio. Quanto menor o comprimento da cadeia de carbono e

maior o grau de insaturação dos ácidos graxos, maior o pK, o que aumenta a proporção do sal de cálcio que dissocia em um dado pH ruminal. Sukhija; Palmquist (1990) compararam a dissociação de sais de cálcio de óleo de soja, sebo, ácido esteárico (C18:0) e óleo de palma em valores de pH 5, 5,5, 6 e 6,5. Os valores estimados de pK para os sais de cálcio foram 5,6 para óleo de soja, 4,5 para sebo, 4,5 para ácido esteárico e 4,6 para óleo de palma. A máxima dissociação ocorreu em pH 5 e a mínima em pH 6,5. Parte do sal de óleo de palma permaneceu estável em pH 5,5 e o óleo de soja em pH 5 estava 100% dissociado. Em pH ruminal entre 6,5 e 7 cerca de 60 a 90% dos sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma podem permanecer intactos e passar pelo rúmen. A dissociação lenta dos sais de cálcio de ácidos graxos no pH ruminal e a passagem com a digesta ruminal justificam o conceito de ácidos graxos inertes no rúmen (FOTOUHI; JENKINS,1992).

Ward et al. (1957) observaram que a adição de gordura em dietas de vacas leiteiras reduziu a digestibilidade da fibra, e que a adição de cinzas de alfafa, rica em cálcio, reduziu este efeito negativo. Estudos *in vitro* realizados por Henderson (1973) demonstraram que a presença de ácidos graxos de cadeia longa reduz o crescimento e metabolismo dos microrganismos ruminais digestores de fibra. A adição de cátions metálicos, especialmente cálcio, pode melhorar a digestibilidade de dietas suplementadas com gordura (EL HAG; MILLER, 1972; WHITE et al., 1958). Grainger et al. (1957) postularam que a digestibilidade da fibra foi melhor porque a formação de sais de cálcio removeu a inibição do crescimento microbiano por ácidos graxos de cadeia longa.

Estudos posteriores confirmaram que a atividade antimicrobiana de ácidos graxos de cadeia longa foi reduzida pela presença de certos metais alcalinos terrosos (GAIBRAITH; MILLER, 1973; GALBRAITH et al., 1971). Palmquist e Jenkins (1982), estudando a resposta sobre a digestibilidade *in vitro*

de forragens da associação entre gordura e cálcio, observaram aumento da formação de sabão insolúvel com a adição de cloreto de cálcio, induzindo aumento na digestibilidade das forragens. Os autores concluíram que quanto maior e mais saturada a cadeia de ácidos graxos, maior foi a formação de sais de cálcio.

Pesquisas realizadas na década de 1980, avaliaram a suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos de palma e fornecidos até 10% da matéria seca da dieta. A digestibilidade da fibra no rúmen não foi reduzida, demonstrando a inércia ruminal dos sais de cálcio em inclusões dietéticas acima das rotineiramente utilizadas em rebanhos comerciais. A pesquisa de Jenkins e Palmquist (1984) é considerada clássica ao demonstrar que a digestibilidade da fibra foi maior quando 4,5% de gordura foi suplementada na forma de sabão de cálcio de ácidos graxos de sebo comparativamente a sebo livre.

Foi observada uma correlação positiva entre o grau de insaturação e a digestibilidade intestinal dos ácidos graxos. Pantoja et al. (1994) e Pantoja, Firkins e Eastridge (1995, 1996) observaram que a digestibilidade intestinal e a produção de leite caiu quanto maior foi o grau de saturação da gordura. Segundo Doreau e Chilliard (1997), ácidos graxos saturados, como o ácido esteárico, têm baixa digestibilidade intestinal comparativamente a ácidos graxos insaturados. A hidrogenação ruminal faz com que o ácido esteárico seja a principal fonte de ácidos graxos no intestino delgado. Isso ocorre principalmente se a fonte de gordura alimentar for óleo de soja. A liberação de ácidos graxos insaturados no rúmen é reduzida quando estes são suplementados como sais cálcio (WU; OHAJURUKA; PALMQUIST, 1991), o que pode aumentar a digestibilidade intestinal de ácidos graxos, comparativamente à de ácidos graxos saturados (FIRKINS; EASTRIDGE, 1994).

Lundy et al. (2004) compararam duas formas de proteção do óleo de soja da hidrogenação ruminal. Os quatro tratamentos foram: Óleo de soja livre ou na forma de sais de cálcio, de amida (encapsulação protéica) ou de uma mistura de sais de cálcio com amida. O nível de suplementação foi de 2,45% da matéria seca de óleo suplementar no tratamento com óleo de soja e 2,75% nos outros tratamentos. Todas as formas de proteção diminuíram a hidrogenação ruminal do ácido linoléico e do ácido oléico. Entretanto houve diminuição no consumo de matéria seca e aumento de C18:1 trans no leite no tratamento com amida comparado aos outros tratamentos. A proteção dos ácidos graxos na forma de sabão de cálcio e amida foi eficiente em aumentar o fluxo posruminal de ácidos graxos insaturados, sendo que o tratamento com amida foi mais eficiente do que o tratamento com sabão de cálcio para o ácido oléico.

Weiss e Wyatt (2004) compararam Megalac rico em ácidos graxos insaturados e ácido palmítico (C16:0) com gordura de palma hidrogenada, rica em ácidos palmítico e esteárico, relativamente a uma dieta controle sem adição de gordura. Dois teores de gordura na dieta, 1,7 e 3,4% da matéria seca, foram avaliados. O tratamento com Megalac aumentou a digestibilidade intestinal da gordura, reduzida com a gordura hidrogenada de palma.

Petit (2002) comparou semente de linhaça integral, Megalac de palma e soja micronizada para vacas em início de lactação. O Megalac resultou em teor de gordura no leite de 4,14%, enquanto os teores foram 3,81% na linhaça e 3,70% na soja. As vacas recebendo linhaça tiveram maior produção de leite comparado ao Megalac (35,7 vs. 33,5kg/d) e não foi detectada diferença do tratamento com soja (34,4 kg/d). As digestibilidades da matéria seca, fibra em detergente neutro e fibra em detergente ácido foram menores no tratamento com linhaça. Petit (2003) avaliou sementes integrais de linhaça e girassol, com ou sem tratamento com 2% de formaldeído, para vacas em terço médio da lactação.

A produção diária de leite foi 2,65kg superior nos tratamentos com formaldeído, apesar deste tratamento não ter atuado sobre a hidrogenação ruminal da gordura, a se julgar pela ausência de diferença em produção e composição da gordura do leite entre tratamentos. As vacas alimentadas com girassol tiveram menor consumo de matéria seca e maior eficiência da produção de leite.

Cortês et al. (2010) avaliaram o desempenho de vacas leiteiras alimentadas com 4,2% da matéria seca de linhaça integral ou 1,9% de sal de cálcio de óleo de linhaça, comparativamente a um tratamento controle sem óleo suplementar e outro contendo 2,3% de linhaça integral e 0,8% de sal de cálcio. O teor de gordura no leite foi menor nos tratamentos com sal de cálcio. A concentração de C18:1 c9 e de intermediários da biohidrogenação, como o C18:1 t9 e ácido rumênico (C18:2 c9,t11), foram maiores no sal de cálcio. Estes dados sugerem que a oleaginosa foi mais inerte no rúmen que o sal de cálcio.

Abel-Caines et al. (1998) avaliaram a suplementação de soja caramelizada tratada não enzimaticamente (Reação de *Maillard*) pelo método de Cleale et al. (1987). Foram utilizados cinco tratamentos: 1) adição de 4,5% de óleo de soja, 2) adição de 1,5% de soja caramelizada mais 3,0% de óleo de soja, 3) adição de 3,0% de soja caramelizada mais 1,5% de óleo de soja, 4) adição de 4,5% de soja caramelizada, 5) adição de 4,5% de sal de cálcio de óleo de palma. O óleo de soja foi utilizado como controle negativo e o sal de cálcio como controle positivo. A ingestão de matéria seca e a produção de gordura no leite foram inferiores no tratamento com óleo de soja. Os teores de ácido linoléico (C18:2 c9, c12) e ácido linolênico (C18:2 c9, c12, c15) na gordura do leite foi maior nos tratamentos com soja caramelizada, sugerindo que a caramelização foi mais eficaz na proteção dos ácidos graxos insaturados da fermentação ruminal.

Theurer et al. (2009) avaliaram a adição de 450g/d de sal de cálcio de óleo de palma (Megalac) ou a mesma quantidade de sal de cálcio rico em ácidos graxos poliinsaturados (Megalac R). A suplementação com sal de cálcio rico em ácidos graxos poliinsaturados diminuiu o teor de ácido palmítico e aumentou a concentração de ácido linoléico e ácido linoléico conjugado na gordura do leite, indicando que os lípides estavam parcialmente protegidos da hidrogenação ruminal. Não houve diferença significativa no consumo de matéria seca, produção e constituição do leite entre tratamentos.

Chouinard, Girard e Brisson (1998) avaliaram a adição de sais de cálcio com diferentes graus de insaturação em dietas de vacas em início da lactação. Os tratamentos foram: 1) controle sem suplementação de gordura, 2) sal de cálcio de ácidos graxos de colza (rico em ácido oléico), 3) sal de cálcio de soja (rico em ácido linoléico) e 4) sal de cálcio de linhaça (rico em ácido linolênico). A inclusão dos sais foi de 4% na matéria seca. A digestibilidade aparente no trato digestivo total da matéria seca, da proteína bruta, do extrato etéreo e da fibra em detergente neutro foi maior nos tratamentos com óleo suplementar, sugerindo que os lípides da dieta basal tiveram menor digestibilidade intestinal que os lípides nos sais de cálcio, provavelmente o resultado da saturação pela hidrogenação ruminal. A produção de leite aumentou linearmente com o aumento da insaturação dos ácidos graxos nos sais de cálcio. A adição de sais de cálcio reduziu o teor de ácidos graxos de cadeia curta e aumentou o de ácidos graxos C18:0, C18:1 c9 e C18:1 t11 na gordura do leite. Os autores concluíram que sais de cálcio de ácidos graxos insaturados foram parcialmente efetivos na proteção da hidrogenação ruminal de ácidos graxos, já que a secreção no leite de ácidos linoléico e linolênico foi levemente aumentada pela suplementação com gordura insaturada.

Allred et al. (2006) avaliaram a suplementação de vacas leiteiras com sal de cálcio composto por óleo de palma e óleo de peixe com ou sem adição de soja extrusada ou óleo de soja na composição do leite e queijo. Os tratamentos foram: 1) Controle sem adição de óleo suplementar; 2) 2,7% de sabão de cálcio de óleo de palma e óleo de peixe; 3) 5% de soja extrusada e 2,7% de sabão de óleo palma e óleo de peixe; 4) 0,75% óleo de soja + 2,7% de sabão de óleo palma e óleo de peixe na matéria seca da dieta. Os tratamentos comparados ao controle aumentaram a incorporação de CLA, ácido vacênico, total de ômega-3 e ácidos graxos insaturados na gordura do leite e no queijo, sem alterar o consumo de matéria seca, a produção e a composição do leite.

Mandebvu et al. (2003) estudaram o efeito da suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos de palma ou soja para vacas leiteiras em início da lactação. O teor dietético de gordura suplementar foi 1,7% da matéria seca. O consumo de matéria seca e a produção de leite não diferiram entre os tratamentos e foram em média 21,8 e 40,6kg/d, respectivamente. O sal de soja induziu maior concentração de C18:2 c9,c12 na gordura do leite comparado ao sal de óleo de palma.

2.5 Soja integral tostada

A soja integral contém cerca de 20% de lipídeos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC, 2001), na forma de triglicerídeos. Nutricionalmente, esta oleaginosa é considerada um suplemento lipídico parcialmente protegido da hidrogenação ruminal, já que as gotículas de gordura em sementes de oleaginosas se encontram inseridas na matriz protéica dos grãos, que confere proteção natural (REDDY; MORRIL; NAGARAJA, 1994).

Recomendações da quantidade de soja integral em dietas para vacas leiteiras variam de 1,8 a 2,5kg/d (PALMQUIST; JENKINS, 1980). No entanto,

Deresz et al. (1996) observaram que até 5,1kg/vaca/d, divididos em três fornecimentos, não afetaram a produção e a composição do leite. Uma recomendação clássica, originada de Donald Palmquist, da Universidade de Ohio nos EUA, é de que vacas de leite deveriam consumir quantidade similar de gordura àquela secretada no leite. Isso significa que para uma vaca produzindo 35kg de leite com 3,5% de gordura (1,23kg de gordura secretada/d) e consumindo 23 kg de matéria seca/d, o teor de gordura na dieta deveria estar ao redor de 5,3% (1,23kg/23kg). Considerando que o teor basal de extrato etéreo em dietas para vacas leiteiras é normalmente ao redor de 3%, o teor de óleo suplementar seria ao redor de 1,3%, equivalente a 6,5% de soja integral com 20% de extrato etéreo, ou 1,5kg do grão integral por dia neste animal consumindo 23kg de matéria seca.

Além da utilização da soja *in natura*, existem outras formas de utilização da soja, como a extrusão, a micronização e a tostagem. A tostagem é o processo de tratamento térmico que induz reações do tipo *Maillard*, que consiste na condensação de resíduos de açúcares com aminoácidos, seguido por polimerização que forma uma substância amarronzada contendo cerca de 10% de nitrogênio e que possui muitas das propriedades físicas da lignina (SOEST, 1994). O calor gera proteína insolúvel por redução da taxa de hidrólise proteolítica, não apenas por redução da acessibilidade ao substrato, mas também por formação de ligações resistentes ao ataque enzimático. A extensão destas reações é determinada pela duração do aquecimento, temperatura, umidade e quantidade de açúcares presentes. A tostagem, além de inativar os fatores antinutricionais termolábeis presentes na soja (ENSMINGER; OLDFIELD; HEINEMANN, 1990), a justificativa para a tostagem da soja crua para animais não ruminantes, também reduz a degradabilidade ruminal da proteína neste alimento.

Mielke e Schingoethe (1981) avaliaram a adição de 2,2% de óleo suplementar oriundo de soja crua ou tostada comparativamente a uma dieta controle com farelo de soja como fonte predominante de proteína e silagem e milho como forragem predominante. A produção de leite foi 28,6, 29,1 e 28,3kg/d nos tratamentos controle, soja tostada e soja crua, respectivamente, sugerindo que adicionar óleo à dieta, mas aumentando a degradabilidade ruminal da proteína na soja crua, não foi efetivo. Não foi detectado efeito de tratamento sobre o consumo, a produção de sólidos do leite. Porém, a proporção de ácidos graxos de cadeia longa na gordura do leite foi maior nas dietas com óleo suplementar, sugerindo que o óleo insaturado na soja integral foi hidrogenado no rúmen.

Mohamed et al. (1988) avaliaram a adição de óleo de algodão ou soja em dietas baseadas em silagem de milho para vacas leiteiras. O delineamento experimental foi do tipo quadrado latino duplo 4 x 4, com períodos de 21 dias. Oito tratamentos foram avaliados: 1) farelo de algodão como controle 1; 2) farelo de soja como controle 2; 3) óleo de algodão; 4) óleo de soja; 5) semente de algodão integral; 6) semente de soja integral; 7) semente de algodão tostada; 8) semente de soja tostada. O teor de óleo suplementar foi de 4% da matéria seca. Não foi detectada diferença na produção de leite, mas o teor de gordura no leite foi menor nos tratamentos com óleo livre de algodão ou soja. O consumo de matéria seca foi reduzido nas dietas com óleo livre, grãos crus ou tostados. A digestibilidade aparente do trato digestivo total da matéria seca foi reduzida pelo óleo livre. A contagem de protozoários foi menor nos tratamentos com óleo suplementar, com exceção do tratamento com soja tostada. Estes dados sugerem que o óleo em oleaginosas não afeta a fermentação ruminal tanto quanto óleo livre.

Chouinard, Girard e Brisson (1998) avaliaram a performance e o perfil de ácidos graxos do leite de vacas recebendo grão de soja integral diferindo no

processamento. Os tratamentos foram soja crua triturada grosseiramente, soja extrusada, micronizada ou tostada. A inclusão de soja nas dietas foi 17,5% da matéria seca, sendo a silagem de milho a forragem predominante. A produção e composição do leite não diferiu entre tratamentos. O consumo de matéria seca foi maior no tratamento com soja crua triturada. A concentração de ácidos graxos de cadeia curta foi menor e a concentração de C18:1 t11 foi maior nos tratamentos com soja extrusada, intermediária nos tratamentos com soja micronizada e tostada e menor nos tratamentos com soja crua. As concentrações de ácidos linoléico e linolênico foram maiores no tratamento com soja tostada e micronizada comparado ao tratamento com soja crua. Estes dados sugerem que óleo de soja tostada e micronizada aumentaram o fluxo de ácidos graxos poliinsaturados para o sangue e foram menos hidrogenados no rúmen que soja extrusada, sugerindo ser uma maneira efetiva de proteger ácidos graxos insaturados da hidrogenação ruminal. A soja crua aparentemente não supriu ácidos insaturados nem ao rúmen e nem ao sangue, sugerindo que estes passaram intactos pelo trato digestivo.

Tice, Eastridge e Firkins (1993) avaliaram soja tostada diferindo no tamanho de partícula para vacas leiteiras. A inclusão de soja nas dietas foi 19,5% da matéria seca. Os tratamentos foram: 1) Controle com 4,25% da matéria seca de Megalac. 2) Soja integral crua. 3) Soja integral tostada. 4) Soja tostada quebrada. 5) Soja tostada moída. A adição de soja tostada aumentou a produção de leite, mas não afetou a composição do leite independentemente do processamento. Tice, Eastridge e Firkins (1994) também observaram que a adição de soja tostada aumentou a digestibilidade dos ácidos graxos e a concentração de ácidos graxos poliinsaturados na gordura do leite, principalmente ácido linoléico (C18:2 c9,c12), independentemente do tamanho de partícula. Estes resultados sugerem que o óleo na soja tostada não é

totalmente hidrogenado no rúmen, e que podem ser mais inertes que o óleo no Megalac.

Reddy, Morril e Nagaraja (1994) avaliaram a taxa de hidrólise, a extensão da hidrogenação e o efeito do óleo sobre a digestão fibrosa *in vitro*. Os seis tratamentos foram: 1) Controle com farelo e óleo de soja. 2) Soja grão crua. 3) Soja integral extrusada. 4) Soja tostada a 132 °C. 5) Soja tostada a 146°C. 6) Soja tostada a 163°C. Os tempos de incubação foram de 2, 4, 6, 12 e 24 horas. A tostagem da soja reduziu a hidrólise dos ácidos graxos, sendo o efeito mais pronunciado na temperatura de 163°C. Foi também avaliado o efeito dos tratamentos sobre a digestibilidade da fibra de alfafa. A digestibilidade da fibra foi maior nos tratamentos com soja crua e tostada, comparada ao óleo livre do controle.

Morales, Palmquist e Weiss (2000) avaliaram a suplementação de vacas leiteiras com soja tostada ou sebo bovino. A soja tostada aumentou os teores plasmáticos e na gordura do leite de ácidos linoléico e linolênico e reduziu o teor de intermediários da biohidrogenação ruminal como C18:1 trans, indicando que parte dos ácidos graxos insaturados no grão de soja escapa da hidrogenação ruminal, enquanto aqueles liberados no rúmen são eficientemente biohidrogenados.

Dhiman et al. (1999, 2000) avaliaram a incorporação de CLA na gordura do leite de vacas recebendo dieta rica em ácidos linoléico e linolênico. As fontes de óleo foram grãos de soja e linhaça, ou o óleo puro das duas oleaginosas. As dietas continham 18% da matéria seca das oleaginosas. O teor de óleo puro foi 3,6% para o óleo de soja e nos dois tratamentos com óleo de linhaça os níveis foram 2,2 e 4,4%. No experimento 2, foram avaliados seis tratamentos, sendo: 1) Controle sem adição de óleo suplementar; 2) 0,5%; 3) 1,0%; 4) 2,0%; 5) 4,0% de óleo de soja e 6) 1% de óleo de linhaça na dieta. Todos tratamentos aumentaram a concentração de CLA na gordura do leite, mas apenas o

tratamento com soja tostada foi eficiente em aumentar CLA sem deprimir a produção de gordura do leite.

2.6 Depressão da gordura do leite

A secreção mamária de gordura é grandemente afetada pela composição da dieta. Por depressão na gordura do leite, se define a redução de até 50% na secreção mamária de gordura, enquanto a produção de leite e de outros componentes permanece inalterada. Soest (1994) citou o trabalho de Boussingault em 1845, que documentou a baixa secreção de gordura em vacas alimentadas com baixa fibra e alto amido de beterraba, enfatizando o conhecimento já antigo do tópico. A ocorrência deste distúrbio decorre de dois cenários nutricionais: Fermentação ruminal alterada e/ou presença de ácidos graxos insaturados na dieta. Várias teorias tentam explicar o evento.

2.6.1 Deficiência de acetato

Esta teoria se baseia no fato de que o acetato é o principal ácido graxo volátil utilizado como substrato para a síntese de ácidos graxos de cadeia curta pela glândula mamária. Em dietas com alta inclusão de concentrados ou baseadas em forrageiras com pequeno tamanho de partícula, nas quais ocorre queda na relação entre acetato e propionato no fluido ruminal, haveria queda no fluxo de acetato do rúmen para o sangue. Entretanto, estudos utilizando radioisótopos demonstraram que a produção de acetato não cai em dietas depressoras da gordura do leite, ocorrendo aumento na produção de propionato, responsável pela queda na relação entre acetato e propionato no fluido ruminal (BAUMAN; BROWN; DAVIS, 1970). A infusão de acetato também foi usada experimentalmente para evidenciar que sua deficiência não é uma explicação

plausível para a baixa secreção de gordura em vacas leiteiras (DAVIS; BROWN, 1970).

2.6.2 Deficiência de β -hidroxibutirato

Esta teoria propõe que a causa da depressão da gordura no leite seria uma deficiência de β -hidroxibutirato, utilizado pela glândula mamária na síntese de gordura. Entretanto, ocorre pouca queda na concentração plasmática de β -hidroxibutirato em vacas com depressão na gordura do leite e Palmquist et al. (1969, 2005) verificaram que a proporção de carbonos de β -hidroxibutirato dentre o total de carbonos nos ácidos graxos do leite seria de no máximo 8%.

2.6.3 Teoria glicogênica/insulínica ou teoria da competição entre tecidos

Esta teoria se baseia na suposição que dietas com alto teor de concentrados, indutoras da síntese de propionato no rúmen, elevariam os teores plasmáticos de glicose e insulina. Conseqüentemente, o tecido adiposo aumentaria a captação dos precursores lipogênicos acetato e β -hidroxibutirato e diminuiria a disponibilidade destes substratos no sangue. Como a glândula mamária não é responsiva a insulina, haveria um desvio de precursores lipogênicos da glândula mamária para outros tecidos, responsivos à insulina.

Dietas indutoras de baixa gordura no leite reduzem especialmente ácidos graxos de cadeia curta e média. Entretanto, quando ocorre depressão da gordura por elevação induzida experimentalmente na glicose ou insulina circulantes, ocorre queda nos ácidos graxos de cadeia longa, sugerindo que insulina pode regular a lipólise, mas tem efeito mínimo sobre a síntese mamária de gordura (BALMAN; GRIINARI, 2003). McGuire et al. (1995), ao

infundirem insulina em animais com glicose constante no sangue também não observaram efeito deste hormônio sobre a síntese mamária de gordura.

2.6.4 Teoria do metilmalonato/vitamina B12

Esta teoria se fundamenta na observação de que dietas indutoras de baixa gordura no leite aumentam a concentração ruminal de propionato e reduzem a de vitamina B12. O metilmalonil-CoA é um metabólito do propionato que requer vitamina B12 como coenzima para sua conversão a succinil-CoA. Deficiência de vitamina B12 poderia induzir excesso de metilmalonil-CoA. Devido às similaridades estruturais entre metilmalonil-CoA e malonil-CoA, ocorreria inibição competitiva no sítio de ligação da enzima ácido graxo sintetase, resultando em redução na síntese de ácidos graxos pela glândula mamária. Entretanto, injeções intramusculares de vitamina B12 não tiveram efeito sobre a síntese de gordura em vacas recebendo dietas depressoras da gordura do leite (CROOM et al., 1981).

2.6.5 Teoria dos ácidos graxos trans

Esta teoria propõe que a produção de ácidos graxos trans tem efeito depressor sobre o teor de gordura do leite. A síntese mamária de gordura é inibida por alguns ácidos graxos produzidos na hidrogenação de lípidos da dieta no rúmen. Os primeiros trabalhos relacionando ácidos graxos trans com depressão da gordura do leite foram feitos por Davis e Brown (1970). Estes autores observaram que o aumento dos ácidos graxos insaturados com 18 carbonos, observados em animais com baixa gordura no leite, era devido a C18:1 trans, especialmente C18:1 t11.

2.6.6 Teoria da biohidrogenação

Esta teoria é uma evolução da teoria dos ácidos graxos trans. Um dos estudos pioneiros relacionando CLA a baixa gordura no leite foi conduzido por Chouinard et al. (1999). Através da infusão abomasal de uma mistura de CLAs em vacas leiteiras com cânula ruminal foi evidenciada a queda na secreção de gordura, revertida com a interrupção da infusão. A identificação do isômero de CLA C18:2 t10,c12 como fator ativo na redução da gordura do leite foi feita por Baumgard et al. (2000). Bauman e Griinari (2001) postularam que “sob certas condições dietéticas o ambiente ruminal é alterado e isso resulta em mudanças na biohidrogenação de ácidos graxos insaturados e formação de um ácido graxo que inibe diretamente a síntese de gordura pela glândula mamária”.

Baumgard, Sangster e Bauman (2001) observaram que a infusão abomasal de doses variando de 3,5 a 14g/d de C18:2 t10,c12 reduziu 25 a 50% na secreção láctea de gordura. Este estudo foi confirmado por Peterson, Baumgard e Bauman (2002), os quais verificaram que infusões abomasais de 1,25, 2,5 e 5,0 g/d deste CLA reduziu em 7, 16 e 29% a secreção de gordura, respectivamente. Segundo Piperova et al. (2000) a redução na secreção de gordura do leite em resposta a C18:2 t10,c12 pode ser explicada, pelo menos em parte, pela inibição da atividade das enzimas lipogênicas acetil-CoA carboxilase e ácido graxo sintetase. Looor e Herbein (2003) verificaram que C:18 t10,c12 também inibiu a enzima delta-9 desaturase. Bauman e Lock (2006) concluíram que a inibição da delta-9 desaturase esta associada a dosagens de C:18 t10,c12 capazes de promover queda superior a 20% na secreção de gordura do leite.

2.7 Lípides e consumo de matéria seca

Lípides podem deprimir o consumo (ALLEN, 2000). Potenciais mecanismos pelo qual a suplementação lipídica deprime a ingestão de matéria seca seriam por maior enchimento ruminal devido a uma menor digestibilidade da fibra induzida por dietas com teor excessivo de óleo, decréscimo na palatabilidade da dieta com algumas fontes de gordura, especialmente sais de cálcio, regulação metabólica da ingestão de matéria seca por estímulo dos centros cerebrais da saciedade induzido por hormônios intestinais, e aumento na taxa de oxidação hepática. Como alguns ácidos graxos insaturados, principalmente o linolênico, têm a capacidade de induzir aumento na taxa de oxidação no tecido hepático (MASHEK; BERTICS; GRUMMER, 2005; MASHEK; GRUMMER, 2003), tem sido sugerido que o aumento na sua ingestão pode reduzir o apetite por aumento na taxa de oxidação hepática (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009).

O tipo da gordura que chega ao intestino delgado determina o efeito da suplementação lipídica sobre o consumo. Allen (2000) revisou vinte e quatro experimentos avaliando o efeito de fontes de gordura sobre o consumo. As fontes de gordura foram sais de cálcio de óleo de palma, oleaginosas, gordura hidrogenada ou sebo. O teor dietético de óleo suplementar foi de até 6% da matéria seca e todos os experimentos possuíam todos tratamentos. Houve depressão do consumo por sais de cálcio em 11 de 24 experimentos, sendo que em 22 de 24 experimentos houve diferença numérica. As outras fontes de gordura exerceram pouco efeito sobre o consumo de matéria seca. Entretanto, em muitos destes estudos a inclusão de ácidos graxos suplementares foi exagerada, em muitos casos acima de 4 a 5% da matéria seca da dieta.

O relacionamento entre consumo de matéria seca e o tipo e grau de saturação dos ácidos graxos da dieta tem sido avaliado (LITHERLAND et al., 2005). Ácidos graxos insaturados parecem ser mais depressores do consumo, aumentando a concentração plasmática de peptídeos intestinais, como a

colecistocinina (CCK) (CHOI; PALMQUIST, 1996) e amida peptídica semelhante a glucagon 1-(7-36) (GLP-1) (BENSON; REINOLDS, 2001). A CCK é um hormônio intestinal secretado pelas células enteroendócrinas da parte proximal do intestino delgado. O aumento da secreção se dá em resposta a presença de gordura no intestino delgado. Em doses fisiológicas a CCK provoca saciedade e o final das refeições. Este hormônio regula a ingestão por ativação dos aferentes vagais que estimulam os centros da saciedade, reduzindo a motilidade intestinal e consequentemente a taxa de passagem da digesta e o esvaziamento gástrico (CHOI; PALMQUIST, 1996; REIDELBERGER; CASTELLANOS; HULCE, 2003). Choi e Palmquist (1996) demonstraram que a administração de MK-329, um antagonista com ação nos receptores de CCK, aumentou em 92% a ingestão de matéria seca de novilhas alimentadas com dietas de alta gordura. A GLP-1, outro peptídeo intestinal, também parece estar relacionado à regulação do consumo (BENSON; REYNOLDS, 2001). Este hormônio é produzido pelas células L da porção final do intestino delgado e atua sobre o centro da saciedade no hipotálamo, também inibindo a motilidade intestinal, especialmente quando o estímulo ocorre na porção inicial do íleo (RELLING et al., 2009).

Trabalhos realizados por Bremmer et al. (1998) com infusão abomasal de ácidos graxos diferindo no grau de saturação demonstraram que quanto maior o grau de insaturação, maior o efeito depressor da gordura sobre o consumo de matéria seca, sem ser observado efeito sobre a produção e composição do leite e a digestibilidade. Relling e Reynolds (2007), trabalhando com sais de cálcio diferindo no grau de saturação, também verificaram que óleos vegetais com maior grau de insaturação reduziram mais o consumo de matéria seca e aumentaram a concentração plasmática dos peptídeos intestinais GLP-1 e CCK em vacas leiteiras. Litherland et al. (2005) infundiram triglicerídeos (forma em oleaginosas) ou ácidos graxos livres (forma em sais de cálcio) de soja no

abomaso de vacas leiteiras, as quantidades foram 0, 200, 400 e 600 g/d. A depressão no consumo por ácidos graxos livres foi duas vezes maior que a depressão induzida por triglicerídeos, sendo a resposta dependente da dose infundida e a resposta aparentemente mediada por GLP-1.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Vinte e quatro vacas Holandês, nove primíparas, com 160 ± 45 dias em lactação no início do período experimental, formaram oito grupos de três animais com base na ordem de parto e produção de leite. Dentro de cada grupo, os animais foram aleatoriamente alocados a uma sequência de três tratamentos, em quadrados latinos 3x3, conduzidos simultaneamente, e com períodos de 28 dias. Os tratamentos foram (Tabela 1): Controle, sal de cálcio rico em ácido linoléico (Megalac, Química Geral do Nordeste SA, Nova Ponte, MG) ou soja tostada grosseiramente moída (Alfa Nutrisoja, Cooperalfa, Chapecó, SC). A proporção da matéria seca da soja tostada retida na peneira de 4mm foi 49%, na de 2mm foi 42%, na de 1,2mm foi 7%, e na de 0,6mm foi 2% (ZANOTTO; BELLAVER, 1996).

As vacas foram alimentadas individualmente em confinamento total do tipo *tie stall* com camas de areia. Os ingredientes dietéticos foram misturados e oferecidos duas vezes por dia em quantidade suficiente para prover no mínimo 10% do oferecido como sobra diária. A quantidade de dieta oferecida e as sobras de cada vaca foram mensuradas diariamente, e o consumo de matéria seca (CMS) entre os dias 19 a 24 comparou tratamentos. Amostras diárias da silagem de milho, dos ingredientes concentrados e das sobras de cada vaca foram congeladas e amostras compostas foram formadas por período. Os compostos foram pré-secos em estufa ventilada a 55°C por 72 horas, triturados em moinho do tipo Thomas-Willey com peneira com crivo de 1mm e uma sub-amostra foi

desidratada a 100°C por 24 horas para determinação do teor de matéria seca (MS). A proteína bruta (PB) foi analisada por um destilador a vapor do tipo Microkjeldhal (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC, 1975). As cinzas foram determinadas por incineração da amostra a 550°C por 8 horas. O teor de fibra em detergente neutro (FDN) foi determinado por um determinador de fibra TE-149 (Tecnal, Piracicaba, SP), usando amilase e sulfito de sódio. O extrato etéreo (EE) foi analisado segundo a AOAC (1990) após hidrólise ácida com solução de ácido clorídrico.

Tabela 1 Composição das dietas nos tratamentos sal de cálcio (SCa), controle (C) e soja tostada (ST)

	SCa	C	ST
Alimento	% da matéria seca		
Silagem de milho	42,3	42,3	42,4
Farelo de soja	22,5	22,1	18,4
Polpa cítrica	16,8	18,6	16,9
Milho ensilado (35% de umidade)	14,2	14,2	14,2
Soja tostada (22,5% de extrato etéreo)			5,4
Megalac (87,3% de extrato etéreo)	1,4		
Óxido de magnésio	0,2	0,2	0,2
Bicarbonato de sódio	0,9	0,9	0,9
Calcário calcítico	0,9	0,9	0,9
Sal	0,4	0,4	0,4
Minerais e vitaminas ¹	0,4	0,4	0,4
Princípio nutritivo			
Proteína bruta	16,6	16,3	16,7
Fibra em detergente neutro (FDN)	32,3	33,3	33,0
FDN de forragem	20,5	21,8	21,5
Extrato etéreo (EE)	6,0	4,3	6,0
EE dos suplementos lipídicos	1,4		1,4
Cinzas	8,4	8,1	8,2
CNF ²	36,7	37,9	36,1
	% da matéria natural		
Matéria seca	47,7	48,1	47,9

¹ Minerais e Vitaminas: 18,5% de Ca; 15% de P; 3,0% de Mg; 3,0% de S; 240 ppm de Co; 3000 ppm de Cu; 8000 ppm de Mn; 12000 ppm de Zn; 90 ppm de Se; 180 ppm de I; 1.000.000 UI/kg Vit. A; 250.000 UI/kg Vit. D; 6.250 UI/kg Vit E. ²CNF: Carboidratos não fibrosos = 100 - (Proteína bruta + Extrato etéreo + Fibra em detergente neutro + Cinzas)

As vacas foram ordenhadas três vezes por dia e a produção entre os dias 19 a 24 comparou tratamentos. Amostras de nove ordenhas consecutivas foram obtidas nos dias 22 a 24 em frascos contendo 2-bromo-2-nitropropano-1-3-diol e os teores de proteína, gordura, lactose e nitrogênio uréico foram analisados no Laboratório Centralizado da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH, Curitiba, PR). O teor de gordura das amostras também foi analisado pelo método de Gerber (BRASIL, 2006). Para cálculo das secreções diárias de energia no leite (Enleite), leite corrigido para energia (Leite E) e leite corrigido para 4% de gordura (Leite 4%) o teor de gordura utilizado foi a média das duas mensurações. As equações baseadas no NRC (1989, 2001) foram: $\text{Enleite} = (0,0929 \times \% \text{gordura} + 0,0547 \times \% \text{de proteína} + 0,0395 \times \% \text{de lactose}) \times \text{kg de leite}$. $\text{Leite E} = \text{Enleite}/0,70$, sendo 0,70 Mcal/kg o conteúdo de energia em leite com 3,7% de gordura, 3,2% de proteína e 4,6% de lactose. $\text{Leite 4\%} = (0,4 + 15 \times \% \text{de gordura}/100) \times \text{kg de leite}$.

Uma amostra composta de leite proporcional às nove ordenhas dos dias 22 a 24 foi formada para isolamento da gordura e determinação do perfil de ácidos graxos. Os lipídeos do leite foram extraídos com uma mistura de solventes hexano e isopropanol (HARA; RADIM, 1978) e foram metilados com solução básica de metóxido de sódio (CHOUINARD; GIRARD; BRISSON, 1997, 1998; CHRISTIE, 1982). Os ácidos graxos foram analisados por cromatografia gasosa utilizando coluna capilar de 200m de sílica fundida (Varian CP-2571), hidrogênio como gás de arraste (1,8mL/min), detector de ionização de chama (FID), temperatura do injetor de 250°C e do detector de 300°C, e razão de injeção das amostras de 20:1. O protocolo de corrida iniciou com 100°C e foi mantido por sete minutos, depois elevou 10°C/min até 165°C e manutenção por cinco minutos, seguido por outra elevação de 5°C/min até 240°C e manutenção por cinco minutos. A secreção diária de ácidos graxos no

leite foi calculada considerando que a produção diária de gordura era composta por 93% de ácidos graxos e 7% de glicerol (JENKINS, 2004).

Para determinação do perfil de ácidos graxos das fontes lipídicas e das dietas experimentais (Tabela 2), os ácidos graxos foram metil esterificados (RODRIGUES-RUIZ et al., 1998) e a cromatografia gasosa utilizou coluna capilar de 100m de sílica fundida (CP-sil 88), hidrogênio como gás de arraste (1,0mL/min), detector de ionização de chama (FID), temperatura do injetor de 250°C e do detector de 300°C, e razão de injeção das amostras de 50:1. O protocolo de corrida iniciou com 70°C e foi mantido por quatro minutos, depois elevou 13°C/min até 175°C e manutenção por vinte e sete minutos, seguido por mais uma elevação de 4°C/min até 215°C e manutenção por nove minutos, e finalmente nova elevação de 7°C/min até 230°C e manutenção por mais cinco minutos.

Tabela 2 Teor de ácidos graxos na gordura no Megalac, na Alfa Nutrisoja e nas dietas sal de cálcio (SCa), controle (C) e soja tostada (ST)

	Megalac	Nutrisoja	SCa	C	ST
	% dos ácidos graxos totais				
C4:0-C14:0	1,76	0,16	1,45	0,74	0,87
C15:0	0,06	0,05	0,19	0,60	0,28
C16:0	19,95	8,50	23,55	25,25	21,32
C16:1 c9	nd	0,62	0,23	0,33	0,22
C17:0	0,14	Nd	0,31	0,33	0,25
C17:1	0,03	0,06	0,07	nd	nd
C18:0	5,46	3,67	5,92	4,58	4,64
C18:1 t6,7,8,9	0,65	Nd	0,16	nd	nd
C18:1 t10,11,12	6,02	Nd	1,70	0,42	0,32
C18:1 t16	nd	Nd	nd	nd	nd
C18:1 c9	21,85	21,55	25,87	28,43	26,71
C18:1 c11	1,46	1,21	1,68	1,93	1,82
C18:1 c12	0,24	0,12	0,14	0,22	0,16
C18:1 c13	0,08	Nd	0,05	nd	nd
C18:1 c15	nd	Nd	nd	nd	nd
C18:2 t11,c15	0,03	Nd	0,11	nd	0,03
C18:2 c9,c12	37,69	55,20	34,51	33,61	38,90
C18:2 c9,t11	0,26	Nd	0,14	nd	nd
C18:2 t10,c12	0,88	Nd	0,13	nd	nd
C18:3	2,59	6,87	2,78	2,83	3,40
C20:0	0,26	0,21	0,24	0,29	0,21
C20:4	nd	0,06	0,2	0,25	0,29
C20:5	nd	0,2	0,18	0,18	0,29
C22:0	0,47	0,32	0,30	nd	0,28
C22:5	nd	Nd	nd	nd	nd

nd = não detectado.

A identificação dos ácidos graxos se deu pelo padrão 18919-1AMP-SUPELCO, metil-éster da mistura de 37 ácidos graxos, e de manteiga padrão (CRM 164- Commission of the European Community Bureau of Reference, Bruxelas, Bélgica). Os ácidos graxos também foram identificados através de padrões comerciais puros: 05632-SIGMA, metil-éster da mistura C18:2 c9,t11 e C18:2 t10,c12; V1381-SIGMA, metil-éster do ácido vaccênico.

O peso vivo e a condição corporal foram mensurados no dia 27 para descrever as unidades experimentais. A condição corporal foi mensurada em escala de 1 a 5 (WILDMAN et al., 1982) por três avaliadores independentes e o escore médio de cada vaca foi utilizado.

No dia 22 amostras de sangue para dosagem da concentração de ácido linoléico foram obtidas dos vasos coccígeos. As amostras foram obtidas $12 \pm 0,13$ horas após a oferta matinal de alimentos. O sangue foi colhido em tubos vacuolizados contendo 0,1g de EDTA e foram imediatamente armazenados sob refrigeração. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a $2500 \times g$ por 10 minutos e temperatura de 27°C e posteriormente congelado a -20°C . A extração dos lípides plasmáticos foi feita com clorofórmio:metanol (2:1) pelo método de Folch, Less e Sloane-Stanley (1957), seguida por esterificação dos ácidos graxos livres (HARTMAN; LAGO, 1973). A técnica utilizou um cromatógrafo a gás Shimadzu, com detector por ionização em chama (FID) equipado com coluna capilar de sílica fundida (100 m x 0,25 mm id). A rampa de aquecimento partiu de 80°C a $10^\circ\text{C}/\text{min}$ até alcançar 150°C , e $4^\circ\text{C}/\text{min}$ até alcançar 250°C . A temperatura do injetor foi mantida a 240°C e a do detector a 260°C , o gás de arraste foi hidrogênio ultra puro, a razão split foi 5 e o fluxo da coluna de 1,6 mL/min.

As digestibilidades aparentes no trato digestivo total da MS, da matéria orgânica, da FDN, da matéria orgânica não-FDN e do EE foram determinadas por mensuração da produção fecal por coleta total realizada por oito horas ininterruptas nos dias 25 a 27. A coleta de fezes foi iniciada em cada dia com oito horas de atraso com relação ao dia anterior, visando obter uma amostra representativa das 24 horas do dia. As fezes de cada vaca foram congeladas e formaram uma amostra composta ao final de cada período. Os compostos fecais foram desidratados e os teores de FDN, EE e cinzas determinado como previamente descrito.

Simultaneamente à coleta total de fezes, foi executada coleta total de urina para mensuração da excreção diária de alantoína e estimativa da síntese relativa de proteína microbiana no rúmen. Ao volume de urina coletado foram imediatamente adicionados 2% de ácido sulfúrico a 20% e a amostra foi armazenada a 4°C. Uma amostra composta foi formada para cada vaca no final de cada período. As amostras compostas foram diluídas com água destilada na proporção 1:4, urina:água, e congeladas a -20°C até a realização das análises de alantoína (CHEN; GOMES, 1995).

O consumo diário de matéria orgânica digestível (CMOD) foi calculado multiplicando o consumo de matéria orgânica mensurado entre os dias 19 a 24 pela digestibilidade da matéria orgânica mensurada entre os dias 25 a 27. A eficiência alimentar 1 (EFI 1) foi calculada pela relação entre a produção de leite e o CMS. A eficiência alimentar 2 (EFI 2) foi calculada pela relação Leite E e o CMS. A eficiência alimentar 3 (EFI 3) foi calculada pela relação entre a Enleite e o CMOD.

No dia 27 foram obtidas amostras de fluido ruminal através de sonda flexível oro-gástrica com auxílio de uma bomba de sucção a vácuo. As amostras foram coletadas 12±0,25 horas após a alimentação matinal, sendo os animais amostrados aleatoriamente dentro de grupo. O fluido foi homogeneizado e diluído 1:2, fluido:formaldeído, para contagem de protozoários em microscópio óptico, utilizando amostras de 1mL de fluido formalizado alocadas em câmara de Neubauer com 0,1mm de profundidade (DEHORITY, 1984).

No dia 28 foi avaliada a atividade mastigatória por observação visual da atividade bucal a cada cinco minutos por 24horas. As atividades bucais consideradas foram de ingestão de alimento, de ruminação e de ócio. O tempo de mastigação em minutos por dia foi definido como a soma dos tempos de ingestão e de ruminação. Os tempos de mastigação, ingestão e ruminação por unidade de CMS foram calculados utilizando-se o CMS mensurado no dia da

mensuração da atividade mastigatória. A duração da primeira refeição diária foi cronometrada para cada animal.

A capacidade do sal de cálcio de afetar a digestibilidade da FDN foi avaliada *in vitro* (TILLEY; TERRY, 1963). Uma amostra de capim elefante (*Pennisetum purpureum*, 24% de MS, 70,9% de FDN, 12,5% de PB) foi desidratada a 55°C por 72 horas e triturada em peneira de 1mm em moinho do tipo Thomas-Willey. Os seis tratamentos foram: Elefante (Controle positivo): 100% de capim elefante. Óleo de soja (Controle negativo): 75% de capim elefante + 25% de óleo de soja. Sêbo (Óleo saturado inerte no rúmen): 75% de capim elefante + 25% de sêbo bovino. Megalac fino: 75% de capim elefante + 25% de Megalac com granulometria fina. Megalac médio: 75% de capim elefante + 25% de Megalac com granulometria média. Megalac grosso: 75% de capim elefante + 25% de Megalac com granulometria grossa. Seis tubos foram incubados com cada tratamento, além dos seis brancos. A primeira etapa da digestão foi realizada em banho-maria a 39°C por 48 horas em solução composta por 1 volume de fluido ruminal filtrado e 4 volumes de solução tampão de McDougall, gaseificada com CO₂ até obter pH 6,7 a 6,9. Na segunda etapa, foi acrescentado aos tubos HCl 0,1N e pepsina, e os tubos foram novamente incubados por 48 horas. O resíduo das incubações foi filtrado em papel de filtro, desidratado a 55°C por 72 horas, e o teor de FDN mensurado.

3.1 Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo procedimento GLM do Statistical Analysis System Institute - SAS Institute (1988) com o modelo: $Y_{ijkl} = \mu + Q_i + V_{j(i)} + P_k + T_l + e_{ijkl}$. Onde: μ = Média geral. Q_i = Efeito de quadrado ($i = 1$ a 8). $V_{j(i)}$ = Efeito de vaca dentro de quadrado ($j = 1$ a 24). P_k = Efeito de período ($k = 1, 2, 3$). T_l = Efeito de tratamento ($l =$ controle, sal de cálcio, soja tostada). e_{ijkl}

= erro experimental assumido independente e identicamente distribuído em uma distribuição normal com média zero e variância σ^2 . As médias de quadrado mínimo foram comparadas pela opção PDIFF. A digestibilidade *in vitro* da FDN foi analisada como um delineamento inteiramente casualizado e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Houve diferença no perfil de ácidos graxos entre o sal de cálcio e a soja tostada, demonstrando que óleo de soja não foi a única fonte de gordura no Megalac avaliado (Tabela 2). O teor de oléico e de linoléico em Megalac R (CHURCH & DWIGHT C.O., Princeton, EUA), o equivalente norte-americano ao produto aqui avaliado, é ao redor de 30% do total de ácidos graxos (AGRICULTURAL MODELING AND TRAINING SYSTEMS - AMTS, 2011), enquanto que no sal experimental o teor de ácido oléico foi ao redor de 20% e o de linoléico 40%. O sal de cálcio deste experimento teve teor de ácido palmítico ao redor de 20%, abaixo do teor de 26% em Megalac R, o uso de gordura saturada de palma proporcionalmente a óleo de soja é maior em Megalac R. Devido ao perfil mais insaturado dos ácidos graxos no sal experimental, a resposta animal a este sal de cálcio pode diferir da resposta a Megalac R (THEURER et al., 2009). O teor de ácidos oléico, linoléico e palmítico na soja tostada foi em torno de 20, 55 e 10% do total de ácidos graxos, respectivamente.

O óleo na soja teve perfil de ácidos graxos mais insaturado que o óleo no sal de cálcio (Tabela 2). O maior grau de insaturação aumenta o pK e a proporção dos ácidos graxos em forma protonada (SUKHIJA; PALMQUIST, 1990). A terminação carboxil livre é necessária à hidrogenação ruminal de

ácidos graxos insaturados (HARFOOT; HAZLEWOOD, 1988). Um sal de cálcio de maior pK, comparativamente a um sal mais estável no fluido ruminal, pode induzir maior produção de intermediários da hidrogenação ruminal de lípidos, sabidamente depressores da síntese de gordura pela glândula mamária, apesar de desejáveis para a saúde humana (BAUMAN; LOCK, 2010). O sal experimental também continha C18:1 trans e CLA, especialmente C18:2 t10,c12 (Tabela 2), um potente inibidor da síntese de gordura láctea (BAUMGARD et al., 2000).

A estabilidade do sal de cálcio no rúmen foi avaliada por mensuração do efeito da adição de gordura sobre a digestibilidade *in vitro* da fibra de capim elefante (Tabela 3). Comparativamente ao tratamento controle sem óleo, o sal de cálcio foi tão inibidor da digestão fibrosa quanto sêbo, e menos inibidor que triglicerídeos livres de soja, sugerindo que o sal de cálcio, independentemente do tamanho de partícula, foi tão inerte no rúmen quanto gordura saturada. Apesar de sais de cálcio ricos em óleo de soja terem maior dissociação ruminal que sais de cálcio com perfil mais saturado de ácidos graxos (SUKHIJA; PALMQUIST, 1990), estes dados sugerem que a totalidade dos ácidos graxos no sal de cálcio não se dissociou neste sistema *in vitro*. Contudo, a proporção de dissociação *in vivo* pode ser maior que a mensurada neste ensaio *in vitro*, já que o pH ruminal das vacas em lactação é plausivelmente menor que o valor próximo da neutralidade no fluido incubado (NEVEL; DEMEYER, 1996; SALVADOR et al., 2008). Considerando que a proporção do sal de cálcio que permanece intacta no rúmen nunca é 100% (LOCK et al., 2006), ácido linoléico em forma protonada estaria mais presente no fluido em dietas suplementadas com sais de cálcio ricos em óleo de soja, comparativamente a sais de cálcio de óleo de palma, rico em ácidos palmítico e oléico (AMTS, 2011).

Tabela 3 Digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN)

Tratamentos	DIVFDN % do original
Elefante puro	38,9 ^A
Elefante + Óleo de soja	13,6 ^C
Elefante + Sêbo	27,7 ^B
Elefante + Megalac fino	31,1 ^B
Elefante + Megalac médio	32,7 ^B
Elefante + Megalac grosso	30,1 ^B
<i>P</i> para o efeito de tratamento	<0,01
Erro padrão das médias	1,7

Letras diferindo na coluna são diferentes a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey.

Ácidos graxos insaturados têm maior digestibilidade intestinal que ácidos graxos saturados (PANTOJA et al., 1994). Como o perfil de ácidos graxos, na dieta controle e naquelas suplementadas com lípides era similar e predominantemente insaturado (Tabela 2), valores de digestibilidade aparente do EE acima de 80% do ingerido era esperado em todos os tratamentos (DOREAU; CHILLIARD, 1997). Entretanto, o valor de digestibilidade do EE ao redor de 75% no controle (Tabela 4), sugere que alta proporção dos ácidos graxos insaturados foi hidrogenada a ácido esteárico neste tratamento, provavelmente afetando a formação de micelas e a absorção intestinal dos ácidos graxos (DRACKLEY, 2000). Parece ser incorreto assumir que óleo vegetal insaturado, quando em baixo teor dietético, tem alta digestibilidade intestinal. Nestes casos, a rápida taxa de aporte ao rúmen de ácidos graxos insaturados pode não exceder a capacidade hidrogenadora dos microrganismos. Aumento no consumo diário de EE de cerca de 900g no controle para cerca de 1200g nas dietas com óleo suplementar foi aparentemente capaz de suplantar a capacidade hidrogenadora de lípides dos microrganismos ruminais.

A digestibilidade do EE no tratamento soja tostada teve valor próximo de 85%, superior ao mensurado na dieta com sal de cálcio (Tabela 4), sugerindo que o óleo insaturado no grão integral pode ter sido menos hidrogenado a esteárico que o óleo no sal de cálcio. Morales, Palmquist e Weiss (2000) sugerem que parte dos ácidos graxos insaturados da soja escapa intacta da hidrogenação ruminal, por estarem naturalmente protegidos da hidrogenação ruminal em estruturas celulares no grão (REDDY; MORRIL; NAGARAJA, 1994). A tendência ($P=0,09$) de menor depressão na concentração ruminal de protozoários no tratamento soja tostada (Tabela 4), também indica que a oleaginosa foi mais inerte no rúmen. O efeito defaunador da gordura é conhecido (HRISTOV; IVAN; MCALLISTER, 2004), e pode ser desejável como forma de aumentar a eficiência de síntese microbiana no rúmen (IKWUEGBU; SUTTON, 1982), por reduzir a fagocitose bacteriana por protozoários. Entretanto, não foi detectado efeito de tratamento sobre o fluxo de proteína microbiana do rúmen, mensurado pela excreção diária de alantoína na urina, ou sobre a eficiência de síntese microbiana, estimada pela relação entre alantoína e CMOD (Tabela 4). Contudo, a capacidade defaunadora do rúmen de sais de cálcio ricos em ácido linoléico ou soja integral pode ter uso prático, como em dietas ricas em cana-de-açúcar, sabidamente indutoras de alta concentração de protozoários no rúmen (LUDOVICO; MATOS, 1997).

Tabela 4 Digestibilidade aparente de nutrientes no trato digestivo total, teor de ácido linoléico no plasma, excreção de alantoina na urina e protozoários no fluido ruminal nos tratamentos sal de cálcio (SCa), controle (C) e soja tostada (ST)

	SCa	C	ST	EPM ¹	Trat	SCavsC	SCavsST	STvsC
	% do ingerido							
DMS ²	66,4	66,4	67,0	1,09	0,90	0,96	0,67	0,71
DMO	69,4	69,0	69,7	1,02	0,88	0,82	0,79	0,62
DFDN	36,8	35,2	36,0	1,97	0,84	0,56	0,76	0,78
DMOnFDN	88,2	88,1	88,9	0,72	0,69	0,92	0,49	0,43
DEE	81,3	75,5	85,1	0,40	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
	mg/100mL							
Linoleico	3,22	2,41	3,42	0,111	<0,01	<0,01	0,21	<0,01
	moles/d							
Ala ³	316,6	339,9	336,4	25,29	0,78	0,52	0,58	0,92
	moles/kg							
Ala/CMOD ⁴	25,9	24,8	25,5	2,09	0,94	0,73	0,83	0,89
	x10 ⁴ /mL							
Protozoários	5,6	18,3	8,3	1,05	<0,01	<0,01	0,09	<0,01

¹EPM: Erro padrão das médias. Trat: *P* para tratamento. SCavsC: *P* SCa vs. C. SCavsST: *P* SCa vs. ST. STvsC: *P* ST vs. C. ²Digestibilidades da DMS: matéria seca. DMO: matéria orgânica. DFDN: fibra em detergente neutro. DMOnFDN: matéria orgânica não-FDN. DEE: extrato etéreo. ³Ala: Alantoina na urina. ⁴Ala/CMOD: Ala/Consumo de matéria orgânica digestível.

A suplementação tanto com sal de cálcio quanto com soja tostada foram efetivas na indução de aumento na concentração plasmática de ácido linoléico (Tabela 4). Abughazaleh et al. (2003) e Looor e Herbein (2003) também detectaram aumento no teor plasmático de ácido linoléico em vacas leiteiras alimentadas com semente de girassol, semelhante ao observado por Huang et al. (2008) ao suplementar associações entre óleo insaturado em sais de cálcio e oleaginosas.

O consumo diário de ácido linoléico foi estimado pela composição das dietas experimentais (Tabelas 1 e 2) multiplicado pelo consumo de matéria seca

(Tabela 5), e assumindo que 90% do EE ingerido era ácidos graxos, exceto para o EE oriundo de sal de cálcio, assumido como 100% de ácidos graxos (NRC, 2001). O coeficiente de correlação linear foi 0,99 entre a ingestão média de ácido linoléico de cada tratamentos e o teor no plasma (Tabela 4). O acúmulo plasmático de ácido linoléico, quando avaliado entre vacas (Figura 1), também respondeu linearmente ao ingerido. Por este mecanismo, estratégias alimentares não depressoras do consumo de matéria seca podem aumentar o teor plasmático de ácido linoléico, tornando a suplementação com lípides insaturados mais benéfica à eficiência reprodutiva de vacas leiteiras (SANTOS et al., 2008). A regressão (Figura 1) sugere que a síntese de ácido linoléico pelo tecido adiposo seria capaz de manter teor plasmático ao redor de 0,96mg/dL, evidenciando a necessidade de suplementação deste ácido graxo essencial.

O consumo diário de matéria seca foi máximo no tratamento controle (Tabela 5). Queda no consumo em resposta à suplementação lipídica tem sido relatado na literatura (ALLEN, 2000). Entretanto, em muitos destes estudos a inclusão dietética de EE suplementar tem sido acima de 4% da matéria seca, superior aos 1,4% deste experimento (Tabela 1). A resposta negativa em consumo, mesmo em baixo nível de suplementação lipídica, pode ter sido induzida pela natureza da forrageira utilizada. Parece que a resposta negativa de vacas leiteiras à suplementação lipídica é mais propensa em dietas baseadas em silagem de milho que em alfafa (ONETTI; GRUMMER, 2004).

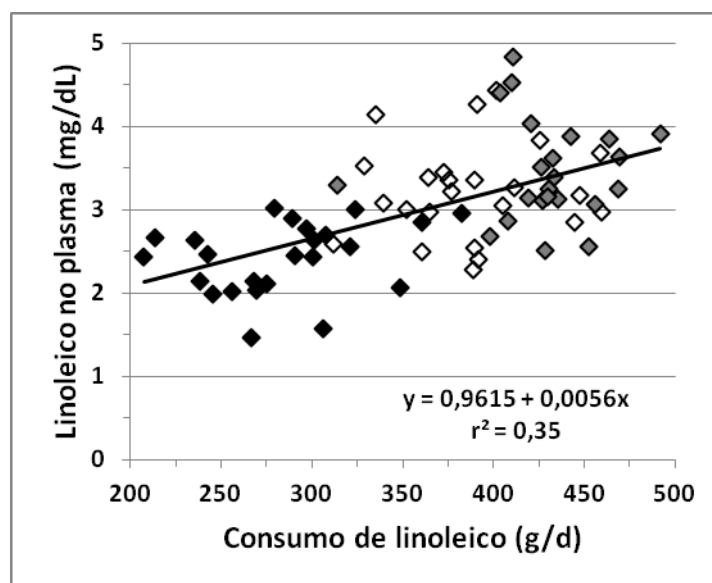


Figura 2 Relacionamento entre vacas no consumo diário de ácido linoléico e o teor no plasma. Símbolos por tratamento: negros=controle, brancos=sal de cálcio, cinzas=soja tostada

Vários mecanismos têm sido propostos para a depressão no consumo induzida por lípidos. Ácidos graxos insaturados são depressores do consumo, aumentando a concentração plasmática de peptídeos intestinais, como a colecistocinina (CHOI; PALMQUIST, 1996) e amida peptídica semelhante a glucagon 1-(7-36) (BENSON; REINOLDS, 2001), capazes de modular a motilidade intestinal e a taxa de passagem da digesta (CHOI; PALMQUIST, 1996; REIDELBERGER; CASTELLANOS; HULCE, 2003) por ação aferente vagal sobre o centro da saciedade no hipotálamo (RELLING et al., 2009). Ácidos graxos insaturados, principalmente linolênico, também têm a capacidade de induzir aumento na taxa de oxidação no tecido hepático (MASHEK; BERTICS; GRUMMER, 2005; MASHEK; GRUMMER, 2003), potencialmente capaz de reduzir o apetite (ALLEN; BRADFORD; OBA, 2009).

Tabela 5 Desempenho nos tratamentos sal de cálcio (SCa), controle (C) e soja tostada (ST)

	SCa	C	ST	EPM ¹	Trat	SCavsC	SCavsST	STvsC
	kg/d							
CMS ²	20,4	21,4	20,6	0,30	0,03	0,01	0,39	0,08
CMOD ³	13,0	13,6	13,3	0,31	0,41	0,18	0,57	0,45
Leite	31,8	31,7	32,8	0,59	0,34	0,85	0,25	0,18
Leite 4% ⁴	25,2	27,2	28,2	0,49	<0,01	<0,01	<0,01	0,16
Leite E ⁵	27,3	28,9	29,8	0,53	<0,01	0,03	<0,01	0,24
Gordura G ⁶	0,829	0,980	0,999	0,0196	<0,01	<0,01	<0,01	0,48
Gordura	0,830	0,963	1,013	0,0333	<0,01	<0,01	<0,01	0,29
Proteína	1,028	0,999	1,010	0,0262	0,74	0,44	0,64	0,76
Lactose	1,457	1,455	1,515	0,0271	0,22	0,96	0,14	0,12
	%							
Gordura G	2,64	3,10	3,05	0,055	<0,01	<0,01	<0,01	0,46
Gordura	2,60	3,03	3,10	0,090	<0,01	<0,01	<0,01	0,60
Proteína	3,25	3,17	3,11	0,071	0,39	0,42	0,18	0,57
Lactose	4,59	4,61	4,63	0,027	0,57	0,69	0,30	0,51
	Mcal/d							
Enleite ⁷	19,1	20,2	20,9	0,37	<0,01	0,03	<0,01	0,24
	kg							
Peso vivo	640	638	638	3,6	0,92	0,76	0,72	0,96
	1 a 5							
C.C. ⁸	3,3	3,2	3,3	0,03	0,26	0,20	0,13	0,20
	mg/dL							
NUL ⁹	14,3	14,4	14,4	0,50	0,99	0,96	0,90	0,94
	Mcal/kg							
EFI 1 ¹⁰	1,58	1,47	1,59	0,033	0,03	0,03	0,77	0,01
EFI 2 ¹¹	1,35	1,35	1,45	0,030	0,03	0,99	0,02	0,02
EFI 3 ¹²	1,50	1,49	1,60	0,044	0,18	0,90	0,12	0,10

¹EPM: Erro padrão das médias. Trat: *P* para tratamento. SCavsC: *P* SCa vs. C. SCavsST: *P* SCa vs. ST. STvsC: *P* ST vs. C. ²CMS: Consumo de matéria seca. ³CMOD: Consumo de matéria orgânica digestível. ⁴Leite 4%: Produção de leite ajustada para 4,0% de gordura. ⁵Leite E: Produção de leite ajustada para energia. ⁶Gordura G: Gordura pelo método de Gerber. ⁷Enleite: Secreção de energia no leite. ⁸C.C.: Escore de condição corporal. ⁹NUL: Nitrogênio uréico no leite. ¹⁰EFI 1: Leite/CMS. ¹¹EFI 2: Leite E/CMS. ¹²EFI 3: Enleite/CMOD.

Maior enchimento ruminal, por queda na degradação ruminal da fibra induzida por lípidos, não foi um mecanismo plausível para a queda no consumo,

já que não houve efeito de tratamento sobre a digestibilidade da FDN (Tabela 4). A baixa palatabilidade de sais de cálcio tem sido citada como fator depressor do consumo (ALLEN, 2000). Entretanto, este mecanismo não parece ter sido prevalente neste experimento, já que menor consumo foi observado nas duas dietas com lipíde suplementar (Tabela 5). A ausência de efeito da suplementação lipídica sobre a taxa de ingestão (Tabela 6) também sugere que palatabilidade não foi um mecanismo importante na resposta aos tratamentos. Entretanto, a tendência fraca ($P=0,14$) de menor tempo da primeira refeição no sal de cálcio que na soja tostada, pode refletir diferenças sutis na modulação do consumo pelas fontes lipídicas. A resposta em consumo a ácidos graxos livres na digesta intestinal pode diferir da resposta a triglicerídeos (LITHERLAND et al., 2005), distinguindo sais de cálcio de oleaginosas.

Tabela 6 Atividade mastigatória e tempo da primeira refeição nos tratamentos sal de cálcio (SCa), controle (C) e soja tostada (ST)

	SCa	C	ST	EPM ¹	Trat	SCavsC	SCavsST	STvsC
	min/d							
Ingestão	259	273	276	9,0	0,37	0,26	0,20	0,86
Ruminação	399	408	416	17,3	0,77	0,70	0,48	0,74
Mastigação ²	658	681	692	22,5	0,54	0,45	0,29	0,74
	min/kg de consumo							
Ingestão	12,7	13,7	13,6	0,59	0,44	0,25	0,30	0,90
Ruminação	19,8	20,4	20,2	1,06	0,90	0,67	0,72	0,92
Mastigação	32,4	34,1	33,8	1,50	0,71	0,45	0,52	0,90
	min							
1 ^a refeição	27,4	32,6	29,6	2,43	0,33	0,14	0,52	0,38

¹EPM: Erro padrão das médias. Trat: *P* para tratamento. SCavsC: *P* SCa vs. C. SCavsST: *P* SCa vs. ST. STvsC: *P* ST vs. C. ²Mastigação: Ingestão + Ruminação.

O sal de cálcio rico em ácido linoléico induziu menor secreção mamária de gordura e de energia, sem afetar a secreção de leite, proteína e lactose (Tabela 5). Neste tratamento, o teor de gordura no leite foi inferior a 3%, o mínimo exigido pela legislação brasileira (BRASIL, 2002). Como a ingestão diária de

matéria seca foi menor nas dietas suplementadas com lípidos, ambas induziram ganho na relação entre o leite produzido e o consumo. Em sistemas de pagamento de leite com baixa valorização da secreção mamária de gordura, a suplementação lipídica com sal de cálcio rico em ácido linoléico pode melhorar a eficiência alimentar e o teor plasmático de ácido linoléico, sem induzir impacto financeiro negativo. Contudo, quando existe valorização da secreção de gordura, o uso do suplemento na totalidade do rebanho em lactação pode não ser indicado, principalmente em dietas baseadas em silagem de milho (ONETTI; GRUMMER, 2004). Nestes casos, a suplementação estratégica do sal de cálcio apenas para as vacas não gestantes ou em periparto pode ser a indicada, para obter ganho em eficiência reprodutiva e saúde (SANTOS; GRECO, 2010), sem penalizar o teor de gordura do rebanho. Lopes et al. (2005) observaram que o mesmo sal de cálcio deste estudo, suplementado apenas durante um protocolo de sincronização de ovulação, induziu ganho na taxa de concepção de novilhas, demonstrando a rapidez do efeito benéfico da suplementação lipídica sobre a reprodução.

O acúmulo de intermediários da hidrogenação ruminal de lípidos insaturados, especialmente C18:2 t10,c12, é uma explicação plausível para a resposta negativa em secreção mamária de gordura à suplementação com o sal de cálcio (BAUMAN; GRIINARI, 2001; GRIINARI et al., 1998; PIPEROVA et al., 2000). Vale ressaltar, que além da possibilidade de produção do C18:2 t10,c12 no ambiente ruminal, o sal de cálcio continha este isômero de CLA e C18:1 trans (Tabela 2). A inibição da secreção mamária de ácidos graxos de cadeia curta, sem afetar a secreção dos de cadeia longa (Tabela 8), é coerente ao efeito inibitório destes compostos sobre a expressão de enzimas lipogênicas (HARVATINE; ALLEN, 2005).

O perfil de ácidos graxos da gordura do leite sugere que a soja tostada foi mais inerte no rúmen que o sal de cálcio (Tabela 7). O sal de cálcio reduziu o teor de ácidos graxos de cadeia curta (C4:0 a C14:0), aumentou C18:2 t10,c12 (vaccênico) e C18:1 trans, e não aumentou os teores dos ácidos linoléico e linolênico na gordura (Tabela 8). A maior secreção diária de ácido esteárico na soja tostada (Tabela 8) também sugere que os lípides na oleaginosa foram mais hidrogenados no rúmen para incorporação ao leite, provavelmente devido à menor taxa de liberação ruminal. Entretanto, maior hidrogenação de insaturados na dieta soja não reduziu o acúmulo plasmático de ácido linoléico (Tabela 4) ou a secreção diária de linoléico e linolênico no leite (Tabela 8). A soja tostada, além de não deprimir a síntese mamária de ácidos graxos de cadeia curta, aumentou a secreção láctea de ácidos graxos insaturados de cadeia longa (Tabela 8). A maior hidrogenação ruminal dos lípides insaturados da soja foi compensada pelo maior conteúdo de ácidos graxos inertes na dieta com soja (Tabela 2), resultando em maior fluxo de linoléico e linolênico em triglicerídeos do grão para o intestino. Resultado similar foi observado por Morales, Palmquist e Weiss (2000), ao avaliar a suplementação de vacas leiteiras com soja tostada ou sebo bovino. Estes autores observaram que a soja tostada aumentou os teores plasmáticos e na gordura do leite de ácidos linoléico e linolênico e reduziu o teor de intermediários da biohidrogenação ruminal como C18:1 trans. Estes resultados sugerem que parte dos ácidos graxos insaturados no grão de soja escaparam da hidrogenação ruminal, enquanto que aqueles liberados no rúmen foram eficientemente biohidrogenados.

A qualidade nutracêutica da gordura foi maior no sal de cálcio, por redução de C12:0, C14:0 e C16:0, enquanto soja tostada não teve efeito negativo tão acentuado sobre estes saturados, relacionados à hipercolesteremia e distúrbios cardíacos em humanos (REKLEWSKA et al., 2002; WILLIAMS, 2000), apesar da diferença numérica sutil entre tratamentos. Os dois suplementos

lipídicos aumentaram em cerca de 20% o teor de C18:2 c9,t11 (rumênico) na gordura, desejável no controle do câncer, diabete, imunossupressão, arteriosclerose e obesidade (BELURY, 2002; EVANS; BROWN; MCINTOSH, 2002; MCGUIRE; MCGUIRE, 1999).

Apesar da similaridade no teor de ácido rumênico na gordura do leite (Tabela 7), a secreção diária deste ácido graxo foi maior na soja tostada (Tabela 8), resultado da ausência de efeito deste tratamento sobre a secreção mamária de gordura (Tabela 5). Entretanto, a secreção diária de ácido vaccênico foi aumentada pelo sal de cálcio (Tabela 8). Esta observação é coerente ao potente efeito inibidor do segundo sobre a síntese mamária de gordura (BAUMGARD et al., 2000). Aumento na secreção de ácido vaccênico em resposta ao sal de cálcio, sugere que houve maior disponibilidade ruminal de ácidos graxos com a terminação carboxil livre neste tratamento, mesmo com menor teor dietético de ácido linoléico que na soja tostada (Tabela 2). Não houve diferença entre tratamentos em fatores capazes de inibir os passos finais da hidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados e induzir acúmulo ruminal de vaccênico, em detrimento de rumênico, como baixo pH e ionóforos (LOCK et al., 2006). Esta premissa se justifica pela similaridade na composição das dietas (Tabela 1), no consumo diário de matéria seca (Tabela 5) e na atividade mastigatória (Tabela 6). A resposta negativa em secreção de gordura do leite, ditada pela rota metabólica de hidrogenação ruminal de ácido linoléico a esteárico (BAUMAN; GRIINARI, 2003), foi aparentemente definida pela disponibilidade ruminal de substrato lipídico saturável.

Tabela 7 Perfil de ácidos graxos da gordura do leite nos tratamentos sal de cálcio (SCa), controle (C) e soja tostada (ST)

	SCa	C	ST	EPM ¹	Trat	SCavsC	SCavsST	STvsC
	g/100 g							
C4:0-C14:0	24,34	27,20	26,46	0,406	<0,01	<0,01	<0,01	0,21
C12:0	3,07	3,74	3,59	0,091	<0,01	<0,01	<0,01	0,28
C14:0	11,32	12,11	11,86	0,169	<0,01	<0,01	0,03	0,29
C15:0	1,66	1,79	1,64	0,032	<0,01	<0,01	0,54	<0,01
C16:0	30,92	32,01	30,04	0,431	<0,01	0,08	0,15	<0,01
C16:1 c9	1,80	1,72	1,60	0,096	0,32	0,60	0,14	0,33
C17:0	0,87	0,84	0,81	0,025	0,24	0,42	0,10	0,38
C17:1	0,19	0,18	0,17	0,008	0,31	0,57	0,13	0,34
C18:0	8,51	7,82	8,43	0,169	0,01	<0,01	0,74	0,01
C18:1 t6,7,8,9	0,72	0,49	0,61	0,038	<0,01	<0,01	0,05	0,03
C18:1 t10,11,12	1,81	1,32	1,45	0,168	0,11	0,05	0,14	0,58
C18:1 t16	0,30	0,25	0,29	0,010	<0,01	<0,01	0,76	<0,01
C18:1 c9	22,85	20,65	21,72	0,460	<0,01	<0,01	0,09	0,11
C18:1 c11	0,95	0,97	0,98	0,034	0,87	0,72	0,60	0,87
C18:1 c12	0,45	0,38	0,46	0,020	0,02	0,02	0,67	<0,01
C18:1 c13	0,06	0,05	0,05	0,004	0,10	0,14	0,04	0,53
C18:1 c15	0,09	0,08	0,09	0,004	0,05	0,02	0,13	0,35
C18:2 t11,c15	0,03	0,01	0,02	0,006	0,11	0,04	0,27	0,30
C18:2 c9,c12	2,66	2,63	3,31	0,137	<0,01	0,89	<0,01	<0,01
C18:2 c9,t11	0,67	0,57	0,69	0,023	<0,01	<0,01	0,68	<0,01
C18:2 t10,c12	0,08	0,02	0,04	0,012	<0,01	<0,01	<0,01	0,26
C18:3	0,30	0,31	0,39	0,020	<0,01	0,77	<0,01	<0,01
C20:0	0,07	0,07	0,07	0,006	0,74	0,79	0,62	0,45
C20:4	0,15	0,18	0,18	0,007	<0,01	<0,01	<0,01	0,88
C20:5	0,02	0,02	0,03	0,002	0,06	0,08	0,03	0,61
C22:0	0,11	0,12	0,13	0,005	0,02	0,14	<0,01	0,17
C22:5	0,04	0,05	0,09	0,018	0,21	0,66	0,09	0,21

¹EPM: Erro padrão das médias. Trat: *P* para tratamento. SCavsC: *P* SCa vs. C. SCavsST: *P* SCa vs. ST. STvsC: *P* ST vs. C.

Tabela 8 Secreção diária de ácidos graxos no leite nos tratamentos sal de cálcio (SCa), controle (C) e soja tostada (ST)

	SCa	C	ST	EPM ¹	Trat	SCavsC	SCavsST	STvsC
	g/d							
C4:0-C14:0	191,43	245,47	249,66	5,803	<0,01	<0,01	<0,01	0,61
C12:0	24,36	33,79	33,95	1,035	<0,01	<0,01	<0,01	0,91
C14:0	88,70	108,77	111,56	2,694	<0,01	<0,01	<0,01	0,47
C15:0	12,83	15,92	15,38	0,405	<0,01	<0,01	<0,01	0,35
C16:0	240,35	290,60	283,71	7,302	<0,01	<0,01	<0,01	0,51
C16:1 c9	13,23	15,36	14,83	0,706	0,10	0,04	0,12	0,60
C17:0	6,74	7,54	7,56	0,272	0,06	0,04	0,04	0,96
C17:1	1,40	1,62	1,61	0,069	0,06	0,04	0,04	0,92
C18:0	66,91	69,52	79,24	2,295	<0,01	0,43	<0,01	<0,01
C18:1 t6,7,8,9	5,26	4,25	5,46	0,297	0,01	0,02	0,64	<0,01
C18:1 t10,11,12	12,34	11,40	12,63	0,897	0,60	0,47	0,82	0,34
C18:1 t16	2,30	2,19	2,74	0,104	<0,01	0,47	<0,01	<0,01
C18:1 c9	175,13	183,04	203,54	5,762	<0,01	0,34	<0,01	0,02
C18:1 c11	7,19	8,55	9,12	0,316	<0,01	<0,01	<0,01	0,21
C18:1 c12	3,48	3,41	4,34	0,191	<0,01	0,80	<0,01	<0,01
C18:1 c13	0,41	0,43	0,42	0,030	0,93	0,71	0,88	0,82
C18:1 c15	0,70	0,71	0,78	0,031	0,12	0,77	0,06	0,10
C18:2 t11,c15	0,24	0,11	0,18	0,049	0,24	0,09	0,41	0,38
C18:2 c9,c12	20,13	23,31	30,60	1,301	<0,01	0,09	<0,01	<0,01
C18:2 c9,t11	5,16	5,02	6,42	0,237	<0,01	0,66	<0,01	<0,01
C18:2 t10,c12	0,57	0,16	0,31	0,101	0,02	<0,01	0,07	0,30
C18:3	2,29	2,72	3,58	0,174	<0,01	0,09	<0,01	<0,01
C20:0	0,55	0,60	0,67	0,059	0,32	0,51	0,14	0,40
C20:4	1,18	1,62	1,72	0,064	<0,01	<0,01	<0,01	0,31
C20:5	0,14	0,20	0,23	0,160	<0,01	0,01	<0,01	0,21
C22:0	0,85	1,07	1,21	0,053	<0,01	<0,01	<0,01	0,06
C22:5	0,31	0,45	0,71	0,134	0,11	0,47	0,04	0,17
Total	770,60	895,13	936,37	18,140	0,01	<0,01	<0,01	0,12

¹EPM: Erro padrão das médias. Trat: *P* para tratamento. SCavsC: *P* SCa vs. C. SCavsST: *P* SCa vs. ST. STvsC: *P* ST vs. C.

5 CONCLUSÃO

A suplementação com 1,4% da matéria seca da dieta de extrato etéreo oriundo de sal de cálcio rico em ácido linoléico ou soja tostada grosseiramente moída aumentou a concentração plasmática de ácido linoléico, deprimiu o consumo de matéria seca, e não exerceu efeito detectável sobre o volume diário de leite. O sal de cálcio resultou em perfil de ácidos graxos do leite nutraceuticamente desejável, mas deprimiu a síntese mamária de gordura.

REFERÊNCIAS

ABEL-CAINES, S. F. et al. Influence of nonenzymatically browned soybeans on ruminal fermentation and lactational performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 4, p. 1036-1045, Apr. 1998.

ABUGHAZALEH, A. A. et al. Conjugated linoleic acid and vaccenic acid in rumen, plasma, and milk of cows fed fish oil and fats differing in saturation of 18 carbon fatty acids. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 11, p. 3648-3660, Nov. 2003.

AGRICULTURAL MODELING AND TRAINING SYSTEMS. **Cattle type fresh cow high cow low cow far-off dry close-up dry**. Disponível em: <<http://www.agmodelsystems.com/AMTS/files/DairyEvalMatrix.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2011.

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 7, p. 1598-1624, July 2000.

ALLEN, M. S.; BRADFORD, B. J.; OBA, M. Board invited review: the hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 87, n. 12, p. 3317-3334, Dec. 2009.

ALLRED, S. L. et al. Milk and cheese from cows fed calcium salts of palm and fish oil alone or in combination with soybean products. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 1, p. 234-248, Jan. 2006.

ALMEIDA, R. de; SILVA, D. F. F. da. **Por que vacas leiteiras deixam seus rebanhos**. Piracicaba: Milkpoint, 2008. Disponível em: <<http://www.milkpoint.com.br/artigos-tecnicos/sistemas-de-producao/por-que-vacas-leiteiras-deixam-seus-rebanhos-50906n.aspx>>. Acesso em: 15 mar. 2011.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. Washington: Association of Analytical Chemistry, 1975. 1094 p.

_____. _____. 15th ed. Arlington, 1975. 1094 p.

BAUMAN, D. E.; BROWN, R. E.; DAVIS, C. L. Pathways of fatty acid synthesis and reducing equivalent generation in mammary gland of rat, sow and cow. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 140, p. 237-240, 1970.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Biosynthesis of CLA and its incorporation into meat and milk of ruminants. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 1, p. 117-121, Jan. 1999.

_____. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 23, p. 203-227, Sept. 2003.

_____. Regulation and nutritional regulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science, Amsterdam**, v. 70, n. 1/2, p. 15-29, Apr. 2001.

BAUMAN, D. E.; LOCK, A. L. Conjugated linoleic acid: biosynthesis and nutritional significance. In: LIPIDS, P. F.; FOX, P. L. H. (Ed.). **Advanced dairy chemistry**. New York: Springer, 2006. p. 93-135.

_____. Milk fatty acid composition: challenges and opportunities to human health. In: WORLD BUIATRICS CONGRESS, 26., 2010, Santiago. **Proceedings...** Santiago: Universidad del Santiago, 2010. p. 278-289.

BAUMAN, D. E.; LOCK, A. L.; PERFIELD, J. W. The role of trans fatty acids in the regulation of milk fat synthesis. In: INTERMOUNTAIN NUTRITION CONFERENCE, 1., 2005, Salt Lake City. **Proceedings...** Salt Lake City: University of Salt Lake, 2005. p. 85-96.

BAUMGARD, L.; CORL, B.; DWYER, D. Identification of CLA isomer responsible for Milk fat depression. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 1, p. 118-124, Jan. 1999.

BAUMGARD, L. H. et al. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 278, n. 1, p. 179-184, 2000.

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

BELURY, M. A. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 22, p. 505-531, Sept. 2002.

BENSON, J. A.; REYNOLDS, C. K. Effects of abomasal fat infusion on splanchnic metabolism of pancreatic and gut hormones in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 84, n. 6, p. 1488-1500, June 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 51**, de 18 de setembro de 2002. Regulamentos técnicos de produção, identidade e qualidade do leite cru refrigerado. Brasília, 2002. Disponível em: <<http://www.mapa.gov.br>>. Acesso em: 10 mar. 2011.

_____. **Instrução Normativa nº 68**, de 12 de dezembro de 2006. Métodos analíticos oficiais físico-químicos para controle de leite e produtos lácteos. Brasília, 2006. Disponível em: <<http://www.mapa.gov.br>>. Acesso em: 10 mar. 2011.

BREMMER, D. R. et al. Effects of chain length and unsaturation of fatty acid mixtures infused into the abomasum of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 1, p. 176-188, Jan. 1998.

CHALUPA, W.; KUTCHES, A. J. Biohydrogenation of linoleic-1-14C acid by rumen protozoa. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 27, p. 1502-1508, 1968.

CHEN, X. B.; GOMES, M. J. **Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives: an overview of technical details**. Aberdeen: Rowett Research Institute, 1992. 21 p.

CHOI, B. R.; PALMQUIST, D. L. High fat diets increase plasma cholecystokinin and pancreatic polypeptide, and decrease plasma insulin and feed intake in lactating cows. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 126, n. 11, p. 2913-2919, Nov. 1996.

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

CHOUINARD, P. Y.; GIRARD, V.; BRISSON, G. J. Fatty acid profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 2, p. 471-481, Feb. 1998.

_____. Lactational response of cows to different concentrations of calcium salts of canola oil fatty acids with or without bicarbonates. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 80, n. 6, p. 1185-1193, June 1997.

CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 23, n. 6, p. 1072-1075, Dec. 1982.

CHURCH, D. C. **El rumiante: fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Acribia, 1998. 630 p.

CLEALE, R. M. et al. Induced nonenzymatic browning of soybean meal: II., ruminal escape and net portal absorption of soybean protein treated with xylose. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 65, n. 5, p. 1319-1326, May 1987.

CÔRTEZ, C. et al. Milk composition, milk fatty acid profile, digestion, and ruminal fermentation in dairy cows fed whole flaxseed and calcium salts of flaxseed oil. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 7, p. 3146-3157, July 2010.

CROOM, W. J. et al. Vitamin B12 administration for milk fat synthesis in lactating dairy cows fed a low fiber diet. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, n. 6, p. 1555-1560, June 1981.

DAVIS, C. L.; BROWN, R. E. Low-fat milk syndrome. In: PHILLIPSON, A. T. (Ed.). **Physiology of digestion and metabolism in the ruminant**. Newcastle Upon Tyne: Oriel, 1970. p. 545-565.

DEHORITY, B. A. Evaluation of subsampling and fixation procedures used for counting rumen protozoa. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 48, n. 1, p. 182-185, Jan. 1984.

DEPETERS, E. J.; CANT, J. T. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 75, n. 8, p. 2043-2070, Aug. 1992.

DERESZ, F. et al. Utilização de soja grão crua na alimentação de vacas leiteiras de alta produção. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 25, n. 1, p. 113-124, 1996.

DHIMAN, T. R. et al. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows fed different diets. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 82, n. 10, p. 2146-2156, Oct. 1999.

_____. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 5, p. 1016-1027, May 2000.

DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 78, n. 1, p. 15-35, Jan. 1997.

DOREAU, M.; FERLAY, A. Digestion and utilization of fatty-acids by ruminants. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 45, n. 2, p. 379-396, Apr. 1994.

DRACKLEY, J. K. Lipid metabolism. In: MELLO, J. P. F. d' (Ed.). **Farm animal metabolism and nutrition**. Edinburg: CAB International, 2000. p. 97-119.

EL HAG, G. A.; MILLER, T. B. Evaluation of whisky distillery by-products. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 23, n. 2, p. 247-258, 1972.

ELMES, M. et al. The effect of dietary supplementation with linoleic acid to late gestation ewes on the fatty acid composition of maternal and fetal plasma and tissues and the synthetic capacity of the placenta for 2-series prostaglandins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, v. 1686, n. 1/2, p. 139-147, 2004.

ENSMINGER, M. E.; OLDFIELD, J. E.; HEINEMANN, W. W. Protein supplements. In: _____. **Feeds and nutrition**. Davis: Ensminger, 1990. p. 15-44.

EVANS, M. E.; BROWN, J. M.; MCINTOSH, M. K. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 13, n. 9, p. 508-516, Sept. 2002.

FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L. Assessment of the effects of iodine value on fatty acid digestibility, feed intake, and milk production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 8, p. 2357-2366, Aug. 1994.

FOLCH, J.; LESS, M.; SLOANE-STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FOTOUHI, N.; JENKINS, T. C. Ruminal biohydrogenation of linoleoyl methionine and calcium linoleate in sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3607-3614, Nov. 1992.

GALBRAITH, H. et al. Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. **Journal of Applied Bacteriology**, Bethesda, v. 34, p. 803-813, 1971.

GALBRAITH, H.; MILLER, T. B. Effect of long chain fatty acids on bacterial respiration and amino acid uptake. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 659-675, 1973.

GIESY, J. G. et al. Effect of dose of calcium salts of conjugated linoleic acid (CLA) on percentage and fatty acid content of milk fat in midlactation Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 8, p. 2023-2029, Aug. 2002.

GLASSER, F.; FERLAY, A.; CHILLIARD, Y. Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: a meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 91, n. 12, p. 4687-4703, Dec. 2008.

GRAINGER, R. B. et al. The interrelationship between calcium and fat in ruminant digestion. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 16, p. 1086-1087, 1957.

GRIINARI, J. M. et al. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ -desaturase. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 130, n. 9, p. 2285-2291, Sept. 2000.

_____. *Trans*-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 5, p. 1251-1261, May 1998.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 90, n. 1, p. 420-426, 1978.

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

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, n. 6, p. 475-476, June 1973.

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. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 11, p. 4018-4027, Nov. 2005.

HARVATINE, K. J.; BOISCLAIR, Y. R.; BAUMAN, D. E. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. **Animal Behaviour**, Amsterdam, v. 3, n. 1, p. 40-54, 2008.

HENDERSON, C. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. **The Journal of Agricultural Science**, La Habana, v. 81, n. 1, p. 107-112, 1973.

HRISTOV, A. N.; IVAN, M.; MCALLISTER, T. A. In vitro effects of individual fatty acids on protozoal numbers and on fermentation products in ruminal fluid from cattle fed a high concentrate, barley-based diet. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 9, p. 2693-2704, Sept. 2004.

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**, Champaign, v. 91, n. 1, p. 260-270, Jan. 2008.

HUGHES, C. L.; DHIMAN, T. R. Dietary compounds in relation to dietary diversity and human health. **Journal of Medicinal Food**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 51-68, 2002.

IKWUEGBU, O. A.; SUTTON, J. D. The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 48, n. 2, p. 365-375, June 1982.

IP, C.; BANNI, S.; ANGIONI, E. Conjugated linoleic acid enriched butter fat mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 129, n. 12, p. 2135-2142, Dec. 1999.

JENKINS, T. C. Challenges of meeting cow demands for omega fatty acids. In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 4., 2004, Gainesville. **Proceedings...** Gainesville: University of Florida, 2004. p. 52-66.

_____. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 11, p. 3851-3863, Nov. 1993.

JENKINS, T. C.; PALMQUIST, D. L. Effect of fatty acids or calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 67, n. 5, p. 978-986, May 1984.

KLUSMEYER, T. H.; CLARK, J. H. Effects of dietary fat and protein on fatty acid flow to the duodenum and in milk produced by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 9, p. 3055-3067, Sept. 1991.

LITHERLAND, N. B. et al. Dry matter intake is decreased dietary fatty acids and gut peptide concentrations 1515 more by abomasal infusion of unsaturated free fatty acids than by unsaturated triglycerides. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 3, p. 632-643, Mar. 2005.

LOCK, A. L. et al. Concepts in fat and fatty acid digestion in ruminants. In: INTERMOUNTAIN NUTRITION CONFERENCE, 4., 2006, Oxford. **Proceedings...** Oxford: University of Oxford, 2006. p. 85-100.

LOOR, J. J.; HERBEIN, J. H. Reduced fatty acid synthesis and desaturation due to exogenous trans10,cis12-CLA in cows fed oleic or linoleic oil. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 4, p. 1354-1369, Apr. 2003.

LOPES, F. C. F. et al. Predição do consumo de pasto de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schumack) por vacas mestiças Holandês x Zebu em lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 34, n. 3, p. 1017-1028, maio/jun. 2005.

LUDOVICO, A.; MATTOS, W. R. S. Avaliação de dietas à base de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L) e diferentes níveis de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 26, n. 2, p. 403-410, mar./abr. 1997.

LUNDY, F. P.; JENKINS, T. C. The ability of amide versus calcium salts of soybean oil to increase unsaturated fatty acid concentration in omasal or continuous culture samples. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 1, p. 34, Jan. 2003.

MANDEBVU, P. et al. Effect of feeding calcium salts of long-chain fatty acids, from palm fatty acid distillate or soybean oil, to high producing dairy cows on milk yield and composition, and on selected blood and reproductive parameters. **Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 108, n. 1/4, p. 25-41, Apr. 2003.

MASHEK, D. G.; BERTICS, S. J.; GRUMMER, R. R. Effects of intravenous triacylglycerol emulsions on hepatic metabolism and blood metabolites in fasted dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 88, n. 1, p. 100-109, Jan. 2005.

MASHEK, D. G.; GRUMMER, R. R. The ups and downs of feed intake in prefresh cows. In: STATE NUTRITION CONFERENCE LACROSSE, 4., 2003, Davis. **Proceedings...** Davis: MidWest, 2003. p. 153-158.

MCGUIRE, A. D. et al. Equilibrium responses of soil carbon to climate change: empirical and process-based estimates. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 22, n. 4/5, p. 785-796, 1995.

MCGUIRE, M. A.; MCGUIRE, M. K. Conjugated linoleic acid (CLA): a ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 1, p. 118-121, Jan. 1999.

MIELKE, C. D.; SCHINGOETHE, D. J. Heattreated soybeans for lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 64, n. 7, p. 1579-1585, July 1981.

MOHAMED, O. E. et al. Influence of dietary cottonseed and soybean on Milk production and composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 10, p. 2677-2688, Oct. 1988.

MORALES, M. S.; PALMQUIST, D. L.; WEISS, W. P. Effects of fat source and copper on unsaturation of blood and milk triacylglycerol fatty acids in Holstein and Jersey cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, n. 9, p. 2105-2111, Sept. 2000.

MOSLEY, E. E. et al. *Cis-9, trans-11* conjugated linoleic acid Is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. **The Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 136, n. 3, p. 570-575, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of the dairy cattle**. 6th ed. Washington, 1989. 158 p.

_____. _____. 7th ed. Washington, 2001. 165 p.

NEVEL, C. J. van; DEMEYER, D. I. Influence of pH on biohydrogenation of polyunsaturated fatty acids and their ca-salts by rumen microorganisms in vitro. **Archives of Animal Nutrition**, Montreux, v. 49, n. 2, p. 151-157, 1996.

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**, Amsterdam, v. 115, n. 1, p. 65-82, 2004.

PALMQUIST, D. L. et al. Availability and metabolism of various substrates in ruminants: V., entry rate into the body and incorporation into milk fat of D(-)-hydroxybutyrate. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 52, n. 5, p. 633-638, May 1969.

_____. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. **Advances in Food and Nutrition Research**, San Diego, v. 50, n. 2, p. 179-217, June 2005.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Calcium soaps as a fat supplement in dairy cattle feeding. In: CONGRESS ON DISEASES IN CATTLE, 12., 1982, Amsterdam. **Proceedings...** Netherlands: University of Netherlands, 1982. p. 477-481.

_____. Fat in lactation rations: review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 63, n. 1, p. 1-14, Jan. 1980.

PANTOJA, J. et al. Effects of fat saturation and source of fiber on site of nutrient digestion and milk production by lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 8, p. 2341-2356, Aug. 1994.

PANTOJA, J.; FIRKINS, J. L.; EASTRIDGE, M. L. Fatty acid digestibility and lactation performance by dairy cows fed fats varying in degree of saturation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 4, p. 429-437, Apr. 1996.

_____. Site of digestion and milk production by cows fed fats differing in saturation, esterification, and chain length. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 78, n. 10, p. 2247-2258, Oct. 1995.

PETERSON, D. G.; BAUMGARD, L. H.; BAUMAN, D. E. Milk fat response to low doses of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid (CLA). **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 7, p. 1764-1766, July 2002.

PETIT, H. V. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed formaldehyde-treated flaxseed or sunflower seed. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 86, n. 8, p. 2637-2646, Aug. 2003.

_____. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 85, n. 6, p. 1482-1490, June 2002.

PIPEROVA, L. 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. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 130, n. 10, p. 2568-2574, Oct. 2000.

REDDY, P. V.; MORRIL, J. L.; NAGARAJA, T. G. Release of fatty acids from raw or processed soybeans and subsequent effects on fiber digestibilities. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 11, p. 341-346, Nov. 1994.

REIDELBERGER, R. D.; CASTELLANOS, D. A.; HULCE, K. M. Effects of peripheral CCK receptor blockade on food intake in rats. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 285, n. 2, p. 429-437, 2003.

REKLEWSKA, B.; BERNATOWICZ, E. Milk functional components: significance for the organism and possibilities for modifying their level in the milk of cows. **Applied Science Reproduct of Animal Production Reviews**, Edinburgh, v. 71, n. 1, p. 47-69, Apr. 2003.

REKLEWSKA, B. et al. Alternative for modifying the fatty acid composition and decreasing the cholesterol level in the milk of cows. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 76, n. 3, p. 235-243, June 2002.

RELLING, A. E. et al. Effect of feed restriction and supplemental dietary fat on gut peptide and hypothalamic neuropeptide mRNA concentrations in growing wethers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 88, n. 3, p. 737-748, Mar. 2009.

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**, Champaign, v. 90, n. 3, p. 1506-1515, Mar. 2007.

RODRIGUEZ-RUIZ, J. et al. Rapid simultaneous lipid extraction and transesterification for fatty acid analyses. **Biotechnology Techniques**, Natick, v. 12, n. 9, p. 689-691, Sept. 1998.

SALVADOR, C. S. et al. Resposta de vacas leiteiras à substituição total de milho por polpa cítrica e à suplementação com microminerais orgânicos: I., consumo e digestão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 3, p. 682-690, 2008.

SANTOS, J. E. P. et al. Long chain fatty acids of diet as factors influencing reproduction in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, n. 1, p. 23-30, Feb. 2008.

SANTOS, J. E. P.; GRECO, L. F. Recentes avanços em suplementação de ácidos graxos de cadeia longa para vacas leiteiras. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE NUTRIÇÃO ANIMAL, 4., 2010, São Pedro. **Anais...** São Pedro: USP, 2010. 1 CD-ROM.

SILVESTRE, F. T. et al. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: II., acute phase proteins and neutrophil function. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 93, n. 1, p. 93-101, Jan. 2010.

SOEST, P. J. van. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Ithaca: Comstock, 1994. 478 p.

STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; THATCHER, W. W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 81, n. 4, p. 856-871, Apr. 1998.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/S[®] user's guide release 6.03**. Cary, 1988. 441 p.

SUKHIJA, P.; PALMQUIST, D. L. Dissociation of calcium soaps of long-chain fatty acids in rumen fluid. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 73, n. 7, p. 1784-1787, July 1990.

THEURER, M. L. et al. Calcium salts of polyunsaturated fatty acids deliver more essential fatty acids to the lactating dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92, n. 5, p. 2051-2056, May 2009.

TICE, E. M.; EASTRIDGE, M. L.; FIRKINS, J. L. Raw soybeans and roasted soybeans of different particle sizes: I., digestibility and utilization by lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 1, p. 224-235, Jan. 1993.

_____. Raw soybeans and roasted soybeans of different particle sizes: II., fatty acid utilization by lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 1, p. 166-180, Jan. 1994.

TILLEY, J. M.; TERRY, R. A. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. **British Grassland Society**, Aberystwyth, v. 18, p. 104-106, 1963.

TRICON, S. et al. Opposing effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on blood lipids in healthy humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 80, n. 3, p. 614-620, Sept. 2004.

WARD, J. K. et al. Further studies concerning the effect of alfalfa ash upon the utilization of low-quality roughage by ruminant animals. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 16, n. 3, p. 633-641, Mar. 1957.

WARNER, A. C. I. Enumeration of rumen micro-organisms. **Journal of General Microbiology**, London, v. 28, n. 1, p. 119-128, 1962.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R. E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 77, n. 2, p. 190-201, 2007.

WEISS, W. P.; WYATT, D. J. Digestible energy values of diets with different fat supplements when fed to lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, n. 5, p. 1446-1454, May 2004.

WHITE, T. W. et al. Effect of supplemental fat on digestion and the ruminal calcium requirement of sheep. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 17, n. 3, p. 797-803, Mar. 1958.

WILDMAN, E. E. et al. A dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 65, n. 3, p. 495-501, Mar. 1982.

WILLIAMS, C. M. Dietary fatty acids and human health. **Annales de Zootechnie**, Versailles, v. 49, n. 3, p. 165-180, 2000.

WILTBANK, M. et al. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, Los Angeles, v. 65, n. 1, p. 17-29, 2006.

WU, Z.; OHAJURUKA, O. A.; PALMQUIST, D. L. Ruminal synthesis, biohydrogenation, and digestibilities of fatty acids by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 74, n. 9, p. 3025-3034, Sept. 1991.

ZACHUT, M. et al. Dietary unsaturated fatty acids influence preovulatory follicle characteristics in dairy cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 135, n. 4, p. 683-692, Dec. 2008.

ZANOTTO, D. L.; BELLAVER, C. **Método de determinação da granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves**. Brasília: EMBRAPA Suíno e Aves, 1996. 5 p. (Comunicado Técnico, 215).

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