RAFAEL VILLELA BARLETTA

**Avaliação da cinética ruminal e fluxo abomasal de ácidos graxos em vacas
leiteiras suplementadas com fontes lipídicas**

Pirassununga

2014

RAFAEL VILLELA BARLETTA

**Avaliação da cinética ruminal e fluxo abomasal de ácidos graxos em vacas leiteiras
suplementadas com fontes lipídicas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de Concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

De acordo: _____
Orientador(a)

Pirassununga

2014

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3066
FMVZ

Barletta, Rafael Villela

Avaliação da cinética ruminal e fluxo abomasal de ácidos graxos em vacas leiteiras suplementadas com fontes lipídicas / Rafael Villela Barletta. -- 2014.
119 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.

1. Ácidos graxos. 2. Sementes de oleaginosas. 3. Produção de leite. 4. Digestão. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da Biohidrogenação ruminal e fluxo intestinal de ácidos graxos em vacas leiteiras suplementadas com diferentes fontes de gordura dietética", protocolado sob o nº1603/2009, utilizando 12 (doze) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 20/05/09.

We certify that the Research "Evaluation of ruminal biohydrogenation and intestinal flow of fatty acids in dairy cows fed with different fat sources", utilizing 12 (twelve) bovine, protocol number 1603/2009, under the Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 05/20/09.

São Paulo, 21 de maio de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BARLETTA, Rafael Villela

Título: **Avaliação da cinética ruminal e fluxo abomasal de ácidos graxos em vacas leiteiras suplementadas com fontes lipídicas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico este trabalho a algumas pessoas, que foram com certeza as mais importantes e essenciais na minha vida.

Meu pai Nelson (in memoriam) que sempre vai estar no meu coração caminhando comigo, exemplo de vida e dignidade e que me fez dar os primeiros passos na veterinária, meu melhor amigo sempre.

As minhas mães Jane e Lena, que foram e serão para sempre meu alicerce, que sempre me amaram e me apoiaram incondicionalmente e que muitas vezes sacrificaram seus próprios sonhos para realizarem os meus

Aos meus irmãos Thiago e Gabriel, que sempre estiveram do meu lado, me incentivando e me dando força e me apoiando durante todos estes anos.

A minha namorada Bruna por estar sempre do meu lado e me compreender, pois as dificuldades são muitas e por ser cúmplice atuante direta desta obra.

Ao meu filho Miguel, por me trazer paz e tranquilidade, e mais vontade de alcançar meu objetivo.

Também dedico aos meus avós Flávio, Célia, Diná e José (in memoriam) que sempre me ensinaram os valores fundamentais da vida e sempre me incentivaram a buscar uma boa formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado saúde, força, determinação, sabedoria, condição e dedicação, para alcançar meus objetivos e cumprir mais esta etapa na minha vida.

Ao meu orientador e amigo Prof. Francisco Palma Rennó pela orientação segura, por compartilhar sem restrições seu conhecimento e experiência e que sem medir esforços, sempre esteve à prontidão, para esclarecer qual fosse minhas dúvidas. Obrigado ainda por sua competência, seu profissionalismo, dedicação, e atenção, acima de tudo pela amizade e incentivo. Foi muito gratificante poder realizar este trabalho com você, pois sem duvida, contribuiu significativamente em meus conhecimentos e em minha vida.

Ao Prof. Milo Wiltbank, pela sua incrível simplicidade e competência, por seu tratamento incondicional, um grande cientista e educador, além de tudo um grande amigo, que me ajudou imensamente talvez na pior fase da minha vida, me mostrando os caminhos a seguir, sempre com muita paciência, tenho certeza que contribuiu muito para o meu crescimento pessoal e profissional.

Aos meus professores e amigos de São João da Boa Vista que sempre me apoiaram e colocaram para frente, em especial a Priscila, Kal, Lúcia, Julio Balieiro, Cristiano, Denílson e Tiago Carnero que me colocaram no caminho do conhecimento.

A todos os meus amigos de Carmo de Minas, que entendem o motivo da minha distância, mas não menor consideração, em especial Juninho da Barra, Batata, Pedro Lúcio (Pedrão), Raul, Soró, Tina, Larissa, Kabana, Lão obrigado pela grande amizade e suporte em diversas fases desta jornada.

À Universidade de São Paulo, a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal pela oportunidade de realização deste curso.

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

Aos meus familiares, que sempre me apoiam e estão do meu lado.

Aos colegas do grupo Jefferson (Fronfrom), Milton (Bolinho de chuva), Leonardo (a lenda), Anaí, Lenita, Beatriz, Maiara, Ana, Gustavo, Rodrigo, Rodolfo (bada), Thiago (catimbó), Tiago (Pira), Vitor Bettero, Taíssa Canaes, Filipe Zanferari e José Esler de Freitas Júnior, Caio, Vanessa Lacuna, Bruna, Artur Gabriel Vilas Boas Costa, Guilherme Cabral,

Fernanda dos Santos, Marjorye Kametani, Cybele Araújo, Tiago del Valle, Elmeson, Pablo, espero que não tenha esquecido ninguém, obrigado pela amizade e companheirismo.

Gostaria de fazer um agradecimento especial aos colegas Vitor Bettero, Elmeson, Cybele, Gustavo Ferreira, Jefferson Gandra, Rodolfo Mingotti, Bruna Benevento, Vanessa Lacuna, Tiago del Valle e Carlos Eduardo Consentini pela imprescindível, incontestável, e essencial ajuda em todas as etapas para conclusão deste trabalho.

Aos amigos da que fiz nestes 6 anos aqui no VNP, tenho certeza que são amigos para a vida toda, em especial, Renata Leite (Yakult), Pernilongo, Ku Seco, Boi, Tarlei, Rafael, Paulo Gil, Julio, Mayra, Libido, Manoel, Alejandro, Tomazi, Pé de pano vocês moram no meu coração.

Aos professores do departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP Luis Felipe, Paulo Mazza, Marcos Veiga, Alexandre Gobesso, Ricardo Albuquerque, Angélica Pereira, Julio Cesar Balieiro por todos os ensinamentos e pelo convívio.

Aos professores de Reprodução Animal, em especial o Prof. Rubens, Prof. Pietro, Prof. Sartori, Prof. Ed e ao meu amigo Manoel Sá Filho pelos ensinamentos, suporte, atenção e pela grande amizade.

Aos professores da FZEA, Arlindo Saran Neto (minhoca), Marcus Antonio Zanetti obrigado pela amizade e apoio.

Aos funcionários do VNP, em especial à Alessandra, Fábiana e João Paulo que seguram nossos rojões, muito obrigado. .

Aos funcionários do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, meus grandes amigos, Diogo Martinelli, Lucas Santos, Paulo da Silva, João Batista e Carlos Schimith.

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

Aos demais funcionários da Prefeitura do Campus Administrativo de Pirassununga – PCAPS, em especial, Ismael, Paulinho, Vagnão, Tânia e Edil obrigado pela grande amizade.

Aos estagiários e alunos de iniciação científica que sempre me acompanharam durante toda a minha estadia no LPBL e que com certeza, fizeram de mim uma pessoa melhor, além de terem colaborado bastante neste trabalho.

A Sra Lucinéia Mastieri e o laboratório Qualileite pelo auxílio em análises e amizade.

A Prof Maria Inês e ao Joelcio, pela grande ajuda na canulação dos animais, e pela amizade e convívio, especialmente nos churrascos pós trabalho.

Que nao me falte força necessária para vencer as lutas
E perseverança para nunca pensar em desistir
A sabedoria para tomar as decisões certas
E acima de tudo que não me falte gratidão a deus por todas as maravilhas que ele me
fez e fará.

"Não sei por que você se foi
Quantas saudades eu senti
E de tristezas vou viver
E aquele adeus não pude dar
Você marcou na minha vida
Viveu, morreu
Na minha história
E eu gostava tanto de você
Gostava de tanto de você"

Edson Trindade/Tim Maia

RESUMO

BARLETTA, R. V. **Avaliação da cinética ruminal e fluxo abomasal de ácidos graxos em vacas leiteiras suplementadas com fontes lipídicas.** [Evaluation of ruminal kinetics and abomasal flow off fatty acids in dairy cows supplemented with fat sources]. 2015. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

O objetivo deste estudo foi avaliar a biohidrogenação ruminal e o fluxo intestinal de ácidos graxos em vacas leiteiras suplementadas com diferentes fontes lipídicas. Foram utilizadas 8 vacas da raça Holandesa no terço médio de lactação (180 ± 20 dias em lactação; média $\pm$ DP) canuladas no rúmen e abomaso (580 ± 20 kg de peso corporal; média $\pm$ DP), agrupadas em dois quadrados latinos 4 x 4 balanceados, que foram alimentadas com as seguintes dietas: 1) Controle (C), dieta a base de milho e farelo de soja; 2) Óleo de soja (OS); 3) Grão de soja *in natura* (GS); e 4) sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (SC). Houve efeito das fontes lipídicas ($P < 0,05$) sobre o consumo de matéria seca, proteína bruta, FDN e CNF, onde os animais submetidos às dietas com estas fontes apresentaram menor consumo. Os valores de pH ruminal foram maiores ($P < 0,05$) para os animais suplementados com as fontes lipídicas. A relação C2/C3, foi menor ($P < 0,05$) nos animais que receberam as dietas com lipídios. A produção de leite, síntese de proteína microbiana e os balanços de energia e nitrogênio não foram influenciados pelas dietas experimentais. Os animais que receberam as dietas contendo fontes lipídicas apresentaram maiores concentrações séricas de colesterol total ($P < 0,05$). A utilização de grão de soja cru integral influenciou positivamente o teor de gordura no leite, e levou a menores concentrações de CLAs no perfil de AG do leite. A digestibilidade da FDN e a taxa de passagem da MS foram menores nos animais submetidos às dietas com fontes lipídicas ($P < 0,05$). O consumo e fluxo abomasal de AG foram maiores ($P < 0,05$) nos animais suplementados com fontes lipídicas. As fontes protegidas (SC e GS), promoveram maior fluxo abomasal de C18:2 e menores taxas de bio-hidrogenação quando comparados com a dieta OS. A utilização de grão de soja cru e integral aumentou o fluxo abomasal de C18:2 com menores alterações nos processos digestórios e no metabolismo animal.

Palavras-chave: Ácidos graxos. Sementes de oleaginosas. Produção de leite. Digestão.

ABSTRACT

BARLETTA, R. V. **Evaluation of ruminal kinetics and abomasal flow off fatty acids in dairy cows supplemented with fat sources.** [Avaliação da cinética ruminal e fluxo abomasal de ácidos graxos em vacas leiteiras suplementadas com fontes lipídicas]. 2015. 119 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

The objective of this study was to evaluate the ruminal biohydrogenation and intestinal flow of fatty acids in dairy cows supplemented with different lipid sources. Eight Holstein cows in mid lactation (180 ± 20 days in milk; mean $\pm$ SD) cannulated in the rumen and abomasum (580 ± 20 kg body weight; mean $\pm$ SD) were assigned randomly into in two 4 x 4 balanced latin squares, fed with the following diets: 1) control (C) diet based on corn and soybean meal; 2) soybean oil (SO); 3) whole raw soybean (WS); and 4) calcium salts of unsaturated fatty acids (CS). There was effect of lipid sources ($P < 0.05$) on intake of dry matter, crude protein, NDF and NFC, where the animals fed with these sources had lower values. The ruminal pH values were higher ($P < 0.05$) for animals supplemented with lipid sources. The C2 / C3 ratio was lower ($P < 0.05$) in animals fed diets with lipids. Milk production, microbial protein synthesis and energy and nitrogen balances were not influenced by experimental diets. Animals fed diets containing lipid sources had higher serum concentrations of total cholesterol ($P < 0.05$). The use of whole raw soybean influenced positively the fat content in milk, and led to lower concentrations of CLAs in the milk FA profile. NDF digestibility and DM passage rate were lower in animals fed diets with fat sources ($P < 0.05$). Intake and abomasal flow of FA was higher ($P < 0.05$) for animals supplemented with fat sources. Protected sources (CS and WS) promoted greater abomasal flow of C18: 2 and smaller biohydrogenation rate compared to the SO diet. The use of whole raw soybean increased abomasal flow of C18: 2, with less changes in digestive processes and animal metabolism.

Keywords: Fatty Acids. Oil seeds. Milk production. Digestion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biohidrogenação ruminal dos ácidos linoleico e linolênico, pelos grupos A e B de bactérias	25
Figura 2 - pH ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas	77
Figura 3 - Concentrações ruminiais de N-NH ₃ em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas	78
Figura 4 - Concentrações ruminiais de ácidos graxos de cadeia curta em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas	78
Figura 5 - Concentrações ruminiais de acetato em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas	79
Figura 6 - Concentrações ruminiais de propionato em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas	79
Figura 7 - Concentrações ruminiais de butirato em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química bromatológica dos concentrados experimentais	57
Tabela 2 - Composição química bromatológica e composição de ácidos graxos das dietas experimentais.....	58
Tabela 3 - Composição de ácidos graxos dos ingredientes (g/100g de ácidos graxos)	59
Tabela 4 - Consumo e coeficientes de digestibilidade aparente total em vacas alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas.	72
Tabela 5 - Parâmetros ruminais de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes fontes lipídicas.	76
Tabela 6 - Síntese de proteína microbiana de vacas holandesas suplementadas com diferentes fontes de lipídeos	82
Tabela 7 - Produção e composição do leite de vacas holandesas suplementadas com diferentes fontes de lipídeos	85
Tabela 8 - Perfil de ácidos graxos do leite de acordo com as dietas experimentais	87
Tabela 9 - Balanço de energia de vacas holandesas suplementadas com diferentes fontes de lipídeos	89
Tabela 10 - Balanço de nitrogênio de acordo com as dietas experimentais	90
Tabela 11 - Metabólitos sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas	92
Tabela 12 - Dinâmica ruminal e taxa de passagem de líquido do rúmen de acordo com as dietas experimentais	93
Tabela 13 - Dinâmica ruminal, concentrações e digestibilidade de nutrientes de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes fontes lipídicas.....	94
Tabela 14 - Dinâmica ruminal, concentrações e digestibilidade da FDN de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes fontes lipídicas.....	96
Tabela 15 - Consumo, fluxo abomasal, composição de ácidos graxos no abomaso e bio-hidrogenação ruminal de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes fontes lipídicas.....	100

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AG	Ácidos Graxos
AGL	Ácidos Graxos Livres
AGPI	Ácidos Graxos Poliinsaturados
AST	Aspartato Aminotranferase
BE	Balanco de Energia
BN	Balanco de Nitrogênio
CD	Coeficiente de Digestibilidade
CED	Consumo de Energia Digestível
CEL	Consumo de Energia Líquida
CLA	Ácido Linoléico Conjugado
CMS	Consumo de Matéria Seca
CT	Carboidratos Totais
DP	Derivados de Purina
ED	Energia Digestível
EE	Extrato Etéreo
EL _G	Energia Líquida de Ganho
EL _L	Energia Líquida de Lactação
EM	Energia Metabolizável
FA	Fosfatase Alcalina
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FS	Farelo de Soja
GGT	Gama Glutamiltransferase
GS	Grão de Soja
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
MN	Matéria Natural
MO	Materia Orgânica
MPCV	Movimentação de Peso de Corpo Vazio
MS	Matéria Seca
N _{mic}	Nitrogênio Microbiano
N-NH ₃	Nitrogênio Amoniacal
Pabs	Purinas Absorvíveis
PB	Proteína Bruta
PDR	Proteína Degradável no Rúmen
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLC	Produção de Leite Corrigida
PNDR	Proteína Não Degradável no Rúmen
PV	Peso Vivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	HIPÓTESE	18
3	OBJETIVO	19
4	REVISÃO DE LITERATURA	20
4.1	FONTES DE LIPÍDEOS PARA VACAS LEITEIRAS	20
4.2	DIGESTÃO E METABOLISMO DE FONTES LIPÍDICAS	23
4.3	FLUXO INTESTINAL DE ÁCIDOS GRAXOS	27
4.4	CONSUMO DE MATÉRIA SECA	30
4.5	DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DOS NUTRIENTES.....	32
4.6	FERMENTAÇÃO RUMINAL E SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA.....	35
4.7	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	37
4.8	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE.....	41
4.9	METABÓLITOS SANGUÍNEOS	43
4.10	FONTES LIPÍDICAS	45
4.10.1	Grão de Soja.....	47
4.10.2	Óleo de Soja.....	50
4.10.3	Sais de Cálcio de Ácidos Graxos	53
5	MATERIAIS E MÉTODOS	55
5.1	LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS	55
5.2	DIETAS EXPERIMENTAIS	56
5.3	ANÁLISE DE ALIMENTOS	56
5.4	DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL	59
5.5	BALANÇO DE ENERGIA	60
5.6	BALANÇO DE NITROGÊNIO	61
5.7	FERMENTAÇÃO RUMINAL	62
5.8	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA.....	63
5.9	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	64
5.10	TAXA DE PASSAGEM DE LÍQUIDO E DINÂMICA RUMINAL	65
5.11	BIOHIDROGENAÇÃO RUMINAL E FLUXO ABOMASAL DE ÁCIDOS GRAXOS.....	66
5.12	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE.....	68

5.13	PARÂMETROS SANGUÍNEOS	68
5.14	AValiação DO ESCORE DE CONdição CORPORAL E PESO CORPORAL ..	69
5.15	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	69
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
6.1	CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL	71
6.2	FERMENTAÇÃO RUMINAL	75
6.3	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA	81
6.4	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	83
6.5	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE	85
6.6	BALANÇO DE ENERGIA	88
6.7	BALANÇO DE NITROGÊNIO	89
6.8	PARÂMETROS SANGUÍNEOS	91
6.9	CINÉTICA E DINÂMICA RUMINAL	93
6.10	FLUXO ABOMASAL DE ÁCIDOS GRAXOS E BIOHIDROGENAÇÃO RUMINAL	99
7	CONCLUSÕES	104
	REFERÊNCIAS	105

1 INTRODUÇÃO

A utilização de fontes lipídicas nas dietas de vacas leiteiras pode ser feita em todas as fases do ciclo produtivo, por aumentar a densidade energética da dieta, proporcionar efeitos nutracêuticos, assim como reduzir o incremento calórico, fator especialmente importante em épocas de maiores temperaturas, onde os animais estão pré-dispostos ao estresse calórico.

Lipídeos são utilizados nas dietas de ruminantes como fonte de energia e também por aumentar a capacidade de absorção de vitaminas lipossolúveis, fornecer ácidos graxos essenciais importantes na composição de membranas de tecidos e principalmente, atuar como precursores para a regulação do metabolismo. Além disso, aumentam a eficiência produtiva dos animais, como vacas em lactação que depositam grande quantidade de gordura em seus produtos (PALMQUIST; MATTOS, 2006).

Diante do intenso melhoramento genético em bovinos leiteiros nos últimos anos, o consumo de energia tornou-se um fator limitante para produção de leite, pois estes animais têm grande demanda energética excedendo, em muitas ocasiões, a capacidade de consumir energia da dieta, o que pode resultar em redução do desempenho produtivo, reprodutivo e saúde dos animais (HAVARTINE; ALLEN, 2006).

Os bovinos são alimentados com quantidades moderadas de ácidos graxos, sempre buscando os efeitos descritos acima, a suplementação lipídica geralmente não ultrapassa 6-7% da MS da dieta. A maioria dos lipídeos é fornecida na forma de triacilgliceróis em produtos vegetais e animais ou como ácidos graxos livres protegidos pelos sais de cálcio (sabões).

Alguns ácidos graxos são considerados essenciais para os mamíferos, porque as células não têm condições de sintetizá-los. A essencialidade de alguns ácidos graxos (AG) foi decrita pela primeira vez por Burr e de uma série de artigos publicados no final de 1920 até o início da década de 30 (BURR et al., 1930). Os autores identificaram o ácido linoleico (C18:2 n6) e ácido linolênico (18:3 n3) como dois ácidos graxos essenciais para o crescimento, saúde da pele e desempenho reprodutivo em ratos. Desde então, vários estudos têm demonstrado a importância de AG como precursores de várias moléculas, influenciando diretamente a função celular, demonstrando o efeito calórico e nutracêutico de fontes de lipídeos.

Em bovinos a principal limitação para a absorção intestinal de AG poliinsaturados é a bio-hidrogenação ruminal, sendo este processo variável entre as fontes lipídicas, nas suas diferentes formas de proteção.

Apesar da bio-hidrogenação ruminal, a inclusão de fontes lipídicas nas dietas pode influenciar positivamente a função celular e o desempenho animal (SILVESTRE et al., 2011). Portanto, é evidente que, apesar de não conhecermos exatamente a proporção de ácidos graxos absorvidos no duodeno, assim como o quanto a taxa de passagem influencia a extensão da bio-hidrogenação ruminal, os ácidos graxos influenciam positivamente o metabolismo animal.

Existem poucos trabalhos científicos que avaliaram os efeitos da fase de lactação e da taxa de passagem na bio-hidrogenação ruminal e no fluxo intestinal de ácidos graxos de fontes de lipídicas habitualmente utilizadas na nutrição de ruminantes (JENKINS, 2007). Também os dados descritos na literatura como (ALLEN, 2000), não demonstram o real efeito dos lipídios na dinâmica e taxa de digestão ruminal da fibra, principalmente em dietas com alta concentração de volumoso.

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

Desta forma, a realização do presente estudo vai ao encontro da necessidade de se ter mais informações a respeito do efeito da fase do ciclo produtivo e da taxa de passagem no fluxo intestinal de ácidos graxos, e seus efeitos na dinâmica e digestibilidade ruminal da fibra em dietas contendo fontes lipídicas comumente utilizadas na alimentação de vacas leiteiras.

2 HIPÓTESE

A fonte lipídica utilizada na dieta de vacas leiteiras, pode provocar alterações na extensão da biohidrogenação ruminal e fluxo abomasal de ácidos graxos, sem influenciar, o consumo de matéria seca e de nutrientes, cinética e fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes, produção e composição do leite e o balanço de energia e nitrogênio.

3 OBJETIVO

Avaliar os efeitos da suplementação de diferentes fontes lipídicas na dieta de vacas em lactação sobre a biohidrogenação ruminal e fluxo abomasal de ácidos graxos, consumo de matéria seca e de nutrientes, cinética e fermentação ruminal, digestibilidade dos nutrientes, produção e composição do leite e o balanço de energia e nitrogênio.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 FONTES DE LIPÍDEOS PARA VACAS LEITEIRAS

A suplementação de ácidos graxos específicos para vacas leiteiras vem sendo utilizado, como modulador do metabolismo (nutracêutico), bem como fonte de energia de baixo incremento calórico.

O termo lipídeos consiste em definição genérica usada para compostos que possuem ácidos graxos de cadeia longa. Ácidos graxos são definidos como compostos que possuem cadeia longa de hidrocarbonetos e estrutura terminal com grupo carboxila, sendo que tais substâncias podem ser encontradas em grandes quantidades em sistemas biológicos, raramente na forma livre, sendo tipicamente encontradas ligadas a molécula de glicerol ou outras estruturas que se ligam ao carbono terminal (LEHNINGER, 2005).

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

O valor dos lipídeos como combustível fisiológico é de 9,0 Mcal/kg, equivalente a cerca de 2,25 vezes a energia de carboidratos e proteínas, mas isso desde que seja absorvida e fique a disposição para ser metabolizada (energia metabolizável). Portanto, varia em função da digestibilidade de cada fonte lipídica.

A suplementação de lipídeos nas dietas de ruminantes tem as seguintes vantagens: disponibilidade comercial de fontes de boa qualidade; aumento da ingestão de energia quando a ingestão de matéria seca é reduzida; aumento da eficiência do uso de energia em decorrência de menor incremento calórico; aumento parcial da eficiência da produção de leite pela incorporação direta da lipídios da dieta na gordura do leite; substituição de carboidratos rapidamente fermentáveis visando a otimização de consumo de forragem e fermentação ruminal; aumento da flexibilidade para o preparo de dietas; utilizados para alterar a composição da gordura do leite ou de tecidos para melhorar a aceitação pelo consumidor e aumentar a absorção de nutrientes solúveis (NRC 2001; PALMQUIST; MATTOS, 2006).

A utilização de fontes de lipídeos tem sido prática comum na alimentação de vacas em lactação, especialmente por permitir maior aporte de energia para a síntese de leite e de seus componentes, melhorando o *status* energético dos animais durante mudanças fisiológicas onde há alta exigência de energia (STAPLES; THATCHER; MATTOS, 2001). As fontes de lipídeos utilizadas nas dietas de vacas leiteiras incluem: óleos, sementes de oleaginosas *in natura* ou extrusadas, gordura amarela, gordura amarela hidrogenada, sebo, sebo parcialmente hidrogenado, sebo peletizado, ácidos graxos peletizados e sais de cálcio de ácidos graxos. Estas fontes variam em características físicas e químicas que afetam a sua digestibilidade, bem como os efeitos associados sobre o consumo de matéria seca (ALLEN, 2000). As fontes de lipídeos mais comuns utilizadas em rebanhos leiteiros possuem variação no número de carbonos dos ácidos graxos sendo de 16 a 18, variando também o grau de saturação e de esterificação. É preciso enfatizar que o fornecimento de sebo bovino está permanentemente proibido no Brasil, pela instrução Normativa 08/2004 (BRASIL, 2004), em virtude do risco de transmissão da encefalite espongiforme bovina.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviço de Defesa Animal. Instrução Normativa nº 08 de 25 de março de 2004. Proíbe em todo território nacional a produção, comercialização e a utilização de produtos destinados a alimentação de ruminantes que contenham em sua alimentação proteínas e gordura de origem animal. Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, 26 de março de 2004.

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

O aumento do consumo de energia proporcionado pelo uso de fontes lipídicas, e adequada quantidade de carboidratos não fibrosos nas rações podem evitar problemas metabólicos, perda excessiva de peso, baixa eficiência reprodutiva e baixo desempenho produtivo em vacas leiteiras (GRUMMER; HATFIELD; DENTINE, 1990). Certos alimentos também podem ser considerados fontes de energia de baixo custo, como óleos vegetais e sementes de oleaginosas.

Considerando os inúmeros benefícios da suplementação de lipídeos para vacas em lactação, alguns fatores devem ser considerados essenciais para que se tenha sucesso com a suplementação lipídica. Entre estes fatores o período de adaptação se apresenta como o principal. De acordo com Grummer, Hatfield e Dentine (1990) e Staples, Thatcher e Mattos (2001), a adaptação e a aceitabilidade das fontes de lipídeos durante o período de suplementação são fatores determinantes para respostas positivas no desempenho dos animais, pois quando se avalia diferentes fontes de lipídeos nas dietas de vacas leiteiras, respostas diferentes são esperadas e muito relacionadas ao tipo e nível de inclusão do suplemento na dieta. Segundo os mesmos autores a redução na aceitabilidade das fontes lipídicas pode em parte explicar a redução no consumo de matéria seca e baixa produção de leite. As diferenças na aceitabilidade de diferentes fontes de lipídeos podem ser minimizadas homogeneizando os suplementos aos demais ingredientes da dieta, no momento do fornecimento.

Trabalhando com vacas leiteiras de alta produção no período de transição e início de lactação, e suplementadas com fontes de ácidos graxos da família $\omega 3$ e $\omega 6$, Cerri et al. (2009a) observaram melhor qualidade oocitária e embrionária para as vacas que receberam fonte de ácido graxo da família $\omega 3$ em relação a $\omega 6$.

Os ácidos graxos da família $\omega 6$ e $\omega 3$ tem sido mostrados como importantes moduladores das reações imunes (CALDER et al., 2002). Dietas ricas nestes ácidos graxos modulam as respostas inflamatórias em modelos e em ensaios clínicos (STENSON et al., 1992). Em camundongos alimentando-se de dietas ricas em ácidos graxos $\omega 3$, as reações inflamatórias foram reduzidas quando comparadas as reações estudadas em camundongos alimentando-se com ácidos graxos $\omega 6$ (ALBERS et al., 2002). Mecanismos envolvidos na regulação da resposta imune não estão completamente entendidos, mas existe evidência que os ácidos graxos $\omega 6$ e $\omega 3$ influenciam a comunicação e a ativação celular através da síntese de prostaglandinas, fator de necrose ((TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) e outros fatores como o óxido nítrico (CALDER et al., 2002).

Assim, as fontes de lipídeos se apresentam como alternativa viável e interessante para suprir a demanda energética de ruminantes, demonstrando efeitos nutracêuticos, como na melhora da eficiência reprodutiva e modulação do sistema imune, especialmente para vacas leiteiras em períodos críticos do ciclo produtivo.

4.2 DIGESTÃO E METABOLISMO DE FONTES LIPÍDICAS

Os recentes avanços no metabolismo ruminal de lipídeos estão focados principalmente na manipulação de eventos físico-químicos no rúmen visando dois resultados práticos: 1) controle dos efeitos antimicrobianos dos ácidos graxos, quando fontes lipídicas são adicionadas à dieta, sem alterações nos processos de fermentação ruminal e digestão e 2) regulação da bio-hidrogenação microbiana, para o controle da absorção de ácidos graxos específicos, visando melhorar o desempenho, ou buscando efeitos nutracêuticos desejáveis em determinadas fases do ciclo produtivo. Várias propriedades dos lipídeos determinam os seus efeitos antimicrobianos no rúmen, incluindo, o tipo de grupo funcional, grau de insaturação, formação de sais de carboxilato e associações físicas dos lipídeos com as superfícies de partículas de alimentos e microrganismos (JENKINS, 1992).

O mecanismo pelo qual os lipídeos interferem na fermentação ruminal é complexo e envolvem efeitos nas membranas das células microbianas, potência do lipídeo para romper membrana e alterar as funções celulares, ligação física de células microbianas para a superfície das plantas, e expressão e atividade de enzimas hidrolíticas microbianas. As taxas de lipólise e bio-hidrogenação são influenciadas por diversos fatores, incluindo qualidade e tipo da forragem utilizada, superfície de partículas dos alimentos no rúmen, e as modificações estruturais da molécula do lipídeo que podem vir a interferir nos microrganismos ruminais (ALLEN, 2000).

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

O metabolismo ruminal de lipídios pode ser resumido por dois principais processos: lipólise e bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados (JENKINS, 1992; JENKINS, 1993). O processo de lipólise consiste na quebra das ligações ester encontradas nos lipídios dos alimentos da dieta seguida pela biohidrogenação de ácidos graxos insaturados, a qual reduz o número de duplas ligações de ácidos graxos insaturados (AGI) advindos das fontes lipídicas (JEKINS, 1993; BAUMAN; LOCK, 2006). A hidrólise é predominantemente realizada pelas bactérias ruminais, afetam grande proporção dos AGI, e podendo ser influenciada por alguns

fatores, como o nível de lipídeo na dieta, pH ruminal e a utilização de ionóforos, que podem inibir a atividade e crescimento de bactérias (DOREAU; CHILLIARD, 1997; HARFOOT; HAZLEWOOD, 1997).

A hidrólise de triglicerídeos é realizado pelas lípases microbianas, que são enzimas extracelulares ligadas em membranas compostas de partículas de proteína, lipídios e ácidos nucleicos (HENDERSON; HODGKISS, 1973). A *Anaerovibrio lipolytica* é a mais conhecida bactéria com atividade lipolítica (HENDERSON; HODGKISS, 1973). Fay et al. (1990) identificaram 74 cepas de bactérias ruminais capazes de hidrolisar ligações éster. Essas enzimas hidrolisam triacilgliceróis completamente para ácidos graxos livres e glicerol, com pouca acumulação de mono ou diacilglicerídeos (HAWKE, 1970). O glicerol é fermentado rapidamente, produzindo ácido propiônico como produto final.

O processo que pode ser considerado um mecanismo de autodefesa dos microorganismos ruminais é a bio-hidrogenação, que convertem ácidos graxos insaturados em saturados, que são menos tóxicos a população microbiana ruminal. Os ácidos graxos reagem com íons de cálcio insolúveis que, portanto, se tornam atóxicos em nível de rúmen (PALMQUIST; MATTOS, 2006). Embora a bio-hidrogenação possa ser alta, acima de 90%, a intensidade a qual esse processo é realizado depende das características das fontes de lipídeos, tempo de retenção da fonte de lipídeo no rúmen e características da população microbiana (ALLEN, 2000).

A teoria da biohidrogenação foi proposta por Davis e Brown (1970), e elaborada por Pennington e Davis (1975). Após hidrólise os ácidos graxos poliinsaturados tornam-se então, disponíveis à ação microbiana para o processo de biohidrogenação, que se inicia pela isomerização da ligação cis-12 dos ácidos linoleico e linolênico à ligação trans-11, que quando resultante do ácido linoléico, formão AG cis-9, trans-11, ou ácido linoléico conjugado (CLA) (Figura 1).

Em seguida, a dupla ligação cis-9 é hidrogenada, produzindo C18:1 trans-11 e C18:2 trans-11, cis-15 para os ácidos linoleico e linolênico, respectivamente. O C18:2 trans-11, cis-15 sofre uma hidrogenação na dupla ligação cis-15, produzindo também C18:1 trans-11, o qual é também hidrogenado na C18:1 trans-11, resultando em ácido esteárico (Figura 1). As bactérias envolvidas na biohidrogenação têm sido classificadas em dois grupos A e B, de acordo com o padrão metabólico (KEMP; LANDER, 1984). É preciso enfatizar que para se obter completa biohidrogenação de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) ambos os grupos de bactérias são geralmente necessários.

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

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

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

Em virtude do processo de biohidrogenação de ácidos graxos insaturados no rúmen, os ácidos graxos da dieta sofrem mudanças em sua estrutura química, e o perfil de ácidos graxos que passam para o abomaso é alterado, sendo que para comprovar a biohidrogenação completa de AG, maiores concentrações do ácido esteárico (C18:0) teriam que ser encontradas na digesta abomasal comprovando tal condição (HAVERTINE; ALLEN, 2006a).

É frequentemente sugerido que a biohidrogenação ocorre como mecanismo para eliminação de altas quantidades de H⁺, produzidos pela fermentação de carboidratos. Entretanto, tem sido claramente demonstrado que a utilização de hidrogênio na biohidrogenação só é responsável por pequenas quantidades dos equivalentes redutores formados (PALMQUIST ; MATTOS, 2006). Por outro lado, mesmo este processo não sendo capaz de retirar grandes quantidades, ele contribui para a retirada de íons H⁺ do ambiente ruminal, e para a redução da produção de metano (CH₄) pelas bactérias metanogênicas, uma vez que estas consomem hidrogênio, aumentando desta forma a eficiência energética da dieta

se todas as duplas ligações são completamente convertidas em ligações simples, e os ácidos graxos são saturados. Enquanto que a maioria dos ácidos graxos é modificada através do metabolismo ruminal, a hidrogenação não é normalmente completa, e ampla variedade de ácidos graxos são resultantes da uma biohidrogenação incompleta (BYERS; SCHEHING, 1993).

As estimativas para hidrogenação ruminal de ácidos graxos poliinsaturados (AGP) variam de 60 a 90% (BICKERSTAFFE et al., 1972; MATTOS; PALMQUIST, 2006), o grau de hidrogenação é dependente das características químicas das fontes de lipídios utilizadas, do tempo de retenção no rúmen, e das características da população microbiana presente no rúmen-retículo (BICKERSTAFFE; WARNER, 1968). A biohidrogenação aumenta com o grau de insaturação de ácidos graxos, e pode ser reduzida pelo grau de insaturação das rações (WU, 1991). Além disso, a extensão pela qual este processo ocorre depende também da frequência de alimentação (NRC, 2001). A biohidrogenação da suplementação de AG insaturados pode ser de 30 a 40% se os AG são fornecidos como sais de cálcio (NRC, 2001).

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

Sais biliares e lecitina liberados pela vesícula biliar são superfícies ativas e emulsificam lipídeos. A lipase pancreática, na presença de colipase, torna-se aderente á superfície das partículas emulsificadas de lipídios, liberando os ácidos graxos (PALMQUIST; MATTOS, 2006).

Embora poucos triglicerídeos atinjam o intestino delgado de ruminantes, bile e lipase pancreática são necessários para a absorção lipídica. Se os triglicéridos são fornecidos a níveis moderados sob uma forma que os proteja da hidrólise (por exemplo, formol-caseína, emulsão de gordura protegida), parece haver lipase suficiente para hidrólise destes (NOBLE, 1981). No entanto, lipase pancreática não parece ser induzível (JOHNSON et al., 1974) e pode-se tornar limitante se grandes quantidades de triglicérides são apresentados ao intestino delgado.

A formação de micelas pode ser considerada o principal fator para o processo de solubilização e, portanto, a fase decisiva para a eficiência de absorção de ácidos graxos

(BAUMAN; LOCK, 2006). A quantidade de lipase encontrada em ruminantes é somente 25% daquela observada em suínos. A bile de ruminantes é fonte importante de lecitina que quando hidrolisada pela enzima pancreática fosfolipase forma 1-acil isolecitina e o ácido oleico, sendo que essas substâncias funcionam como poderosos agentes emulsificantes para incorporar os ácidos graxos na micela para posterior absorção (BAUMAN; LOCK, 2006; PALQUIST; MATTOS, 2006).

Os ácidos graxos atravessam a membrana da mucosa intestinal por combinação de simples difusão e sistemas de transporte mediados por proteínas ligadoras aos ácidos graxos. Os ácidos graxos ativados são então esterificados na superfície das membranas citossólicas por vias alternativas. Os quilomícrons e VLDL são transportadores de lipídeos intestinais para os tecidos. O VLDL também é sintetizado no fígado e transporta ácidos graxos para tecidos periféricos.

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

4.3 FLUXO INTESTINAL DE ÁCIDOS GRAXOS

Os esforços para aumentar o fluxo de ácidos graxos insaturados para o intestino delgado têm sido estimulados pelos inúmeros benefícios relacionados ao metabolismo e à saúde animal.

O rúmen é uma barreira importante, para o transporte de ácidos graxos insaturados no intestino delgado. A bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados pelos microrganismos ruminais, faz com que exista uma maior passagem de ácidos graxos saturados para serem absorvidos no intestino delgado, sendo que como dito anteriormente, os ácidos graxos saturados na maioria das vezes apresentam apenas efeitos energéticos e não efeitos nutracêuticos, como dos ácidos graxos linoleico e linolênico, que seriam extremamente importantes para o metabolismo animal.

É bem sabido que a suplementação com lipídeos em dietas, pode levar a uma diminuição de síntese *de novo*, particularmente através da formação de isômeros, provenientes da biohidrogenação incompleta no rúmen (BAUMAN; GRIINARI, 2001).

Alem disso, existe uma alta correlação entre os fluxos duodenais dos vários isômeros de C18, uma vez que as fontes lipídica utilizada nas dietas são compostas por óleos vegetais, sendo que estas fontes induzem a fluxos duodenais mais elevados de quase todos os isômeros de C18 (principalmente intermediários da bio-hidrogenação ruminal de ácidos graxos poliinsaturados) (GLASSER et al., 2008). Também pode ser observado na literatura que à medida que aumenta o fluxo intestinal de ácidos graxos insaturados, bem como de seus isômeros, existe uma diminuição dos ácidos graxos de C4 a C16 na gordura do leite (BAUMAN; GRIINARI, 2001).

Doreau e Chilliard (1997) avaliaram 113 estudos sobre balanço de ácidos graxos e suas perdas no rúmen. Estes autores observaram que do total de ácidos graxos consumidos chegaram somente 80,1% ao duodeno. Este resultado foi atribuído ao desaparecimento dos AGs C18:3, n-3 e C18:2, n-6 no rúmen que pode ocorrer em média 93 e 85%, respectivamente (CHILLIARD et al., 2007). Lundy et al. (2004) avaliaram a inclusão de óleo de soja e sais de cálcio de óleo de palma em 2,75% da MS e a mistura das duas fontes de lipídios em quatro vacas canuladas no rúmen e duodeno. Estes autores observaram aumento da biohidrogenação ruminal de C18:2 (n-6). De acordo com Doreau e Chilliard (1997), em dados analisados de mais de 100 observações de estudos publicados avaliando a biohidrogenação e fluxo de ácidos graxos, as perdas de C18:2 (n-6) e C18:3 (n-3), respectivamente, são maiores quando se utiliza fontes de AG não complexados como os óleos.

A relação volumoso/concentrado da dieta exerce importante efeito no fluxo duodenal de ácidos graxos, devido sua interferência direta no pH ruminal e consequentemente na população microbiana no rúmen. Em dietas de alto concentrado (80:20) ocorre um importante efeito sobre a bio-hidrogenação ruminal devido as alterações na população microbiana do rúmen com efeito da mudança de pH. A população de bactérias celulolíticas é reduzida quando comparada a população de bactérias amilolíticas (LATHAM et al., 1972). Com a redução da biohidrogenação, ocorre aumento nos níveis de ácido linoleico e assim aumenta a chance de isomeração desse ácido para a forma trans 10, cis12-18:2. Esse efeito pode ser visto pelo aumento desse isômero no leite de vacas que receberam dietas com altas quantidades de concentrado (PIPEROVA et al., 2002).

Glasser et al. (2008), em meta-análise sobre o fluxo duodenal de ácidos graxos C18 e C4 ao C16, concluem que os óleos vegetais têm alta correlação com o aumento de isômeros C18 no duodeno pela biohidrogenação ruminal. Os autores concluíram que existe relação positiva para a quantidade de isômeros C18 no duodeno com o C18 do leite. O C18 do leite

tem um equilíbrio na proporção com os AG <C16 e tem um limite por mais que o fluxo duodenal seja intenso, isso não acarretará grande aumento no C18 do leite.

O fluxo intestinal de ácidos graxos está diretamente relacionado com a fonte de ácido graxo utilizado na dieta, bem como de fatores que irão interferir diretamente na digestão destes lipídeos, como a relação concentrado:volumoso da dieta, frequência de alimentação, forma de proteção das fontes lipídicas bem como o tipo de lipídeo utilizado (NRC, 2001).

A taxa de passagem pode exercer importante papel no fluxo intestinal de ácidos graxos, visto que animais com maior taxa de passagem podem apresentar maiores fluxos de ácidos graxos insaturados bem como de isômeros da biohidrogenação, devido a um menor tempo no rúmen da fonte de lipídios utilizada na dieta, este fluxo será dependente da fonte utilizada. Vacas com menor taxa de passagem podem apresentar menores fluxos intestinais de ácidos graxos insaturados, bem como menores concentrações de isômeros da biohidrogenação, o que pode ser explicado por uma maior permanência da fonte de lipídios no rúmen, o que favoreceria a biohidrogenação completa. Qiu et al. (2004), avaliaram a ingestão de matéria seca e o fluxo duodenal de ácidos graxos de vacas suplementadas com óleo de soja e de peixe, e observaram que a restrição alimentar diminuiu o fluxo duodenal de trans-11 C18:1, mas não a de CLA em comparação com uma dieta controle, possivelmente devido a um efeito combinado de retenção mais prolongada no rúmen, o que não é favorável a formação de CLA e C18:1tran-11, e um pH reduzido, que é favorável a produção do CLA e maiores concentrações de C18:1 tran-11 no rúmen.

É preciso enfatizar que a concentração de lipídeos da dieta pode influenciar diretamente a composição do leite pelas concentrações de C18. De acordo com Glasser et al. (2008) vacas que são alimentadas com dietas contendo limitadas concentrações de C18 refletem em baixas concentrações de AG no leite. Isso ocorre porque a produção de gordura do leite é uma resposta da suplementação de lipídeos que reflete no fluxo duodenal de C18 podendo resultar em dois fenômenos aditivos: redução quadrática da produção de C18 e redução linear nas concentrações de C4 a C16.

Devido à extensa bio-hidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados, a ingestão de AGI não é um indicador preciso de qual AG está realmente disponível para absorção no intestino delgado. Por esta razão é imprescindível para um maior entendimento de exigências de AGs, bem como conhecimento de efeitos pontuais de cada ácido graxo, que mais estudos que avaliem o fluxo intestinal de diferentes fontes de ácidos graxos em diferentes condições de uso, para que possamos utilizar de maneira mais precisa estas fontes de lipídios, buscando assim melhorias no desempenho animal.

4.4 CONSUMO DE MATÉRIA SECA

O consumo de energia pode ser considerado fator limitante primário do desempenho produtivo de vacas leiteiras, sendo este determinado pelo teor de energia líquida da dieta e pelo consumo de matéria seca (CMS). Ao aumentar a densidade energética da dieta com o uso de lipídeos é esperado um maior consumo de energia, desde que o consumo de matéria seca se mantenha ou não reduza significativamente (COPPOCK; WILKS, 1991).

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

O NRC (2001) considera que mudanças no padrão de digestibilidade da fração fibrosa, alterações na fermentação ruminal e redução no teor de gordura no leite são fortes indicativos que a suplementação de lipídeo promoveu resposta fisiológica nos animais suplementados. Apesar de alguns estudos que utilizaram fontes adicionais de lipídeos para vacas leiteiras demonstrarem mudanças no padrão de fermentação ruminal, tais alterações nem sempre refletem em redução no consumo. Isso ocorre porque, segundo Allen (2000), os mecanismos pelo qual a suplementação de lipídeos afeta o CMS ainda não estão devidamente elucidados, mas há fortes evidências de que o efeito dos lipídeos sobre a fermentação ruminal, motilidade intestinal, aceitabilidade da dieta com suplemento, liberação de hormônios intestinais e nos mecanismos regulatórios que controlam a ingestão de alimentos e a capacidade dos ruminantes de oxidar os ácidos graxos sejam as principais razões da inibição de consumo.

Dois principais pontos devem ser destacados quando se analisa alterações no CMS em vacas suplementadas com fontes de lipídeos: 1) aceitabilidade do suplemento, que está diretamente relacionado às alterações no consumo de matéria seca, pois quando o período de adaptação não é suficiente para os animais, as respostas à suplementação podem não

representar a realidade; 2) tipo e nível de suplementação, pois respostas diferentes são observadas de acordo com as características químicas e físicas da fonte lipídica utilizada.

Eifert et al. (2006), em seu estudo comparando diferentes fontes de amido com a inclusão (2,25%) ou não de óleo de soja nas dietas de vacas em lactação, afirmaram que a inclusão de óleo de soja na dieta reduz o consumo e mantém o nível de produção, aumentando a eficiência alimentar e alterando a composição do leite.

Onetti et al. (2001), enfatizaram que a utilização de óleo de soja nas dietas de vacas no início da lactação não tem apresentado reduções no consumo de matéria seca, sendo essa resposta ligada a qualidade da FDN da forragem e a relação volumoso:concentrado.

Weiss (2004) utilizando sais de cálcio de óleo de palma em seu estudo, verificou que a ingestão de matéria seca foi reduzida quando a concentração desse ácido graxo era de 3,4%, entretanto, esses animais tiveram uma maior produção de leite. Além disso, a fermentação ruminal e digestibilidade das fibras não sofreram alteração, enquanto que o teor de energia digestível na matéria seca e matéria orgânica foram maiores por causa do aumento da digestibilidade dos ácidos graxos adicionados na dieta.

Nornberg (2010), comprovou que as fontes lipídicas utilizadas em seu estudo não afetaram o consumo voluntário de matéria seca e proporcionaram uma maior produção de leite, de modo que a fonte de sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma promoveu maior produção de leite corrigida para 3,5% de gordura e melhorou a eficiência alimentar.

Dhiman e Sater (1997), avaliaram o consumo de matéria seca do grão de soja integral e o grão de soja tostado em vacas leiteiras em lactação com média de 36,0 kg/dia e 150 dias de lactação. Estes autores não verificaram diferenças no consumo de matéria seca entre o grão de soja integral e o grão de soja tostado.

Vargas et al. (2002), avaliaram o consumo de matéria seca de vacas mestiças Holandês-Zebu e observaram que os animais alimentados com grão de soja integral nas dietas apresentaram CMS menor que os animais que receberam a dieta controle. Porém, no mesmo estudo, as vacas que receberam grão de soja integral apresentaram maior CMS do que as que receberam óleo, apesar de tais animais estarem no início da lactação. A produção e a composição do leite, no entanto, não foram afetadas pelas fontes lipídicas.

Já Duarte et al. (2005), não observaram redução do CMS em dietas com e sem o grão de soja integral em vacas Jersey no início da lactação em relação a outras fontes de lipídeos. Corrêa (2007) verificou resultados semelhantes em vacas Holandesas recebendo o grão de soja integral em relação ao grão soja integral e o farelo de soja, para vacas no início de lactação com média de produção de 25,0 kg/dia. Faldet e Satter (1991) e Tice, Eastridge

e Firkins (1993) também não verificaram redução do CMS de vacas da raça Holandesas no início da lactação recebendo grão de soja integral.

Barletta et al. (2010), utilizaram 3 níveis de inclusão (8, 16 e 24% na MS da dieta) de grão de soja cru e integral na dieta de vacas leiteira com média de 35 kg/leite dia, e observaram que o nível de 24% de inclusão diminuiu o consumo de MS, mas os autores destacam que esta diminuição de consumo pode estar associada ao teor de EE da dieta que foi superior a 7,5%, e não estar associado a aceitabilidade da fonte, bem como possíveis fatores antinutricionais.

Na maioria das situações, o total de lipídeos na dieta não deve exceder 6 à 7% da MS da dieta (NRC, 2001). O fornecimento de elevadas concentrações de lipídeos pode levar a uma redução no consumo de MS, mesmo que este tenha efeitos mínimos sobre a fermentação ruminal (SCHAUFF; CLARK, 1992). O fornecimento inferior a 6% de extrato etéreo na dieta total poderia ser prudente no início da lactação, quando diminuição do consumo com a suplementação de lipídeos tem sido observada, ou em dietas com alta quantidade de volumoso (CHILLIARD, 1993).

De acordo com Wang (2010), respostas da suplementação de ácidos graxos protegidos ou inertes no rúmen para o consumo de matéria seca têm sido inconsistente e a proteção dos ácidos graxos é incompleta, como descrito em estudos anteriores (CHOUINARD et al, 1998; LUNDY et al., 2004), onde o fluxo de ácidos graxos insaturados pós ruminal é menor do que o esperado.

4.5 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL DOS NUTRIENTES

O efeito do uso de lipídeos sobre a digestibilidade dos nutrientes da dieta pode ser influenciado por uma série de fatores, especialmente pela característica inerente ao suplemento e sua forma de utilização, como o nível e tipo de suplemento utilizado, e o tipo de volumoso utilizado durante a suplementação. A redução na digestibilidade da matéria seca total e da fibra pode reduzir a taxa de passagem e, conseqüentemente, o consumo de matéria seca e energia líquida. Dados da literatura mostram que a interação entre a dieta basal e suplementação de lipídios sobre a digestibilidade total são inconsistentes. Óleos reduzem a digestibilidade aparente total de carboidratos quando se fornece silagem de milho como

volumoso comparado com outros volumosos como o feno de gramíneas (BEN SALEM et al., 1993).

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

De acordo com o NRC (2001), o aumento no grau de insaturação de ácidos graxos fornecidos nas dietas podem aumentar a digestibilidade de ácidos graxos, porém reduções no consumo de matéria seca, porcentagem de gordura do leite e digestibilidade da fibra são indicadores que a fermentação ruminal foi alterada pela suplementação lipídica.

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

Segundo Bem Salem (1993), óleos reduzem a digestibilidade aparente total de carboidratos quando se fornece silagem de milho como volumoso quando comparado com feno de gramíneas. Assim, os efeitos de ácidos graxos insaturados pode ser variável devido às diferenças na dieta basal (UEDA et al., 2003).

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

Palmquist e Conrad (1978), utilizaram vacas da raça Holandesa e Jersey e avaliaram rações contendo farelo de soja, grão de soja cru e moído e uma mistura de gordura hidrogenada em duas proporções, perfazendo cerca de 3,18, 5,93, 5,73 e 10,8% de extrato etéreo na matéria seca das rações. Em relação à digestibilidade aparente total (DAT) dos nutrientes, os autores encontraram efeitos desejados da suplementação com fontes de lipídios, especialmente na DAT do extrato etéreo e do nitrogênio.

Pereira et al. (1998), trabalharam com dois tratamentos, 0 e 30% (na MN) de grão de soja moído grosseiramente no concentrado, e o volumoso utilizado foi a silagem de milho. Os autores observaram que não houve diferença para a DAT dos nutrientes. Schauff et al. (1992) em experimento com grão de soja integral e sebo bovino (2,5 e 4%), observaram que as digestibilidades de MS, MO, celulose, conteúdo celular e PB diminuíram, quando fontes de lipídios foram adicionadas à dieta. Entretanto, as digestibilidades de FDA, FDN e hemicelulose não foram afetadas.

Mora, Leão e Valadares Filho (1996) avaliaram vacas de 26,0 kg de leite/dia, após o pico de lactação, alimentadas com silagem de milho como volumoso basal e o concentrado continha 0, 15, 30 e 45% de grão de soja moído, e a relação volumoso/concentrado da dieta era de 50/50. Os autores não observaram efeitos das dietas experimentais sobre a DAT da MS e da PB, entretanto as dietas experimentais influenciaram positivamente a digestibilidade do extrato etéreo e negativamente a digestibilidade da matéria orgânica e da FDN.

A digestibilidade aparente encontrada em rações contendo 9,4% de grão de soja cru (na MS), consumidas por vacas da raça Holandesa durante 12 semanas experimentais, foi medida por Bernard (1990), cujos valores para coeficiente de digestibilidade da MS (CDMS) e coeficiente de digestibilidade da PB (CDPB) não diferiram para as dietas controle e grão de soja. Os autores também descrevem que houve aumento no coeficiente de digestibilidade EE do (CDEE) para as dietas contendo soja. Rabello, Valadares Filho e Coelho da Silva (1996) não encontrou diferença entre as dietas experimentais para os CDMS, os coeficientes de digestibilidade da MO (CDMO), os CDPB e os CDEE, para os tratamentos com ou sem inclusão de grão de soja moído no concentrado.

As diversidades das fontes de lipídeos, o seu grau de saturação e a proporção de volumoso basal na dieta de vacas durante o período de transição e terço médio de lactação podem interferir na digestibilidade aparente total dos nutrientes, de modo que a disponibilidade de ácidos graxos essenciais pode ser alterada (ONETTI; GRUMMER, 2004).

4.6 FERMENTAÇÃO RUMINAL E SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

Segundo Jenkins (1993), a variação dos efeitos das fontes de lipídeos sobre a fermentação ruminal pode ser atribuída às diferenças entre as estruturas dos lipídios. Dentre esses fatores o grau de insaturação dos ácidos graxos pode ser considerada característica essencial dos lipídeos quando utilizados como fonte de energia nas rações de ruminantes. Isso porque os ácidos graxos insaturados podem inibir a fermentação ruminal em relação a ácidos graxos saturados. Ainda, essa característica específica pode ser justificada pelo fato de que a mistura de ácidos graxos saturados e insaturados pode melhorar a fermentação quando comparada com fontes simples de ácidos graxos (HAVERTINE; ALLEN, 2006).

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

De acordo com Palmquist (1988), o efeito dos ácidos graxos sobre a degradabilidade ruminal de nutrientes pode ser minimizado se a dieta contiver alta quantidade de volumoso, isso podendo ser comprovado principalmente pela capacidade da forragem em manter o funcionamento normal do rúmen. Assim, os efeitos de ácidos graxos insaturados sobre a digestão ruminal podem ser variáveis, onde o tipo de volumoso utilizado durante a suplementação pode ser considerado fator preponderante para que isso ocorra (UEDA et al., 2003).

Onetti e Grummer (2004) enfatizaram que a utilização de silagem de milho como volumoso pode causar mudanças na população bacteriana no rúmen, favorecendo organismos responsáveis pela formação de *trans*-10, *cis*-12 CLA, e isômeros *trans* de C18:1, ou seja, favorecendo o processo de biohidrogenação que causa a formação de CLA específico, reduzindo a síntese de gordura do leite (BAUMMAN; GRINARI, 2001).

O fornecimento de dietas com alta proporção de silagem de milho como volumoso diminui no rúmen a proporção molar de acetato e reduz a de propionato quando comparadas a dietas ricas em silagem de alfafa, ou dietas com proporções iguais das duas forragens

(BRODERICK, 1985; DHIMAN; SATTER, 1997; ONETTI et al., 2001). No entanto, é preciso enfatizar que além do volumoso utilizado em maior quantidade na dieta durante a suplementação de lipídios, a fase na qual se iniciou a suplementação pode influenciar as mudanças do padrão de fermentação ruminal.

Com relação ao uso de feno durante a suplementação de lipídeos, os efeitos desse volumoso não têm apresentado alterações no padrão de fermentação ruminal, sendo diferente em relação ao uso de silagem de milho. Elliot et al. (1993) e Ueda et al. (2003) avaliaram suplementação de lipídios em vacas leiteiras no início de lactação e utilizaram feno de gramíneas como principal volumoso nas dietas, e observaram redução na proporção molar de acetato em relação à de propionato. Certas fontes de lipídeos, especialmente na forma protegida da degradação ruminal, como os sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa, e fontes de lipídios que possuem proteção natural, como sementes de oleaginosas inteiras ou parcialmente quebradas, possuem efeito inerte sobre a população microbiana, não apresentando menor toxicidade sobre os processos de degradação ruminal de nutrientes, especialmente da fibra (ALLEN, 2000; PALMQUIST; MATTOS, 2006).

A concentração de ácidos graxos livres insaturados provavelmente determina maiores efeitos negativos na capacidade fermentativa do rúmen do que outras frações lipídicas (ácidos graxos livres saturados e triglicerídeos). Portanto, a suplementação com óleos vegetais, reconhecida fonte de ácidos graxos insaturados, seria um grande causador de distúrbios de fermentação, independente do volumoso utilizado. Entretanto, quando esta fonte é fornecida na forma de sementes de oleaginosas (grão de soja), estes distúrbios podem ser significativamente reduzidos, onde o óleo é liberado mais lentamente, em taxas onde não há um comprometimento na digestibilidade de nutrientes (COPPOCK; WILKS, 1991).

Chouinard, Girard e Brisson (1998), avaliando a adição de sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de canola, linhaça e soja na dieta de vacas, encontraram digestibilidade aparente total da matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo e FDN maiores para as dietas suplementadas com sais de cálcio do que para a dieta controle. O fornecimento de ácidos graxos na forma de sementes inteiras tem efeitos mínimos sobre a fermentação (DePETERS et al., 1987), provavelmente devido à liberação lenta do óleo no fluido ruminal.

O uso de lipídeos em rações para ruminantes apresenta efeitos desejáveis, como inibição da produção de metano, redução da concentração de NH_3 ruminal, aumento na eficiência da síntese microbiana e aumento de ácido linolêico conjugado (CLA) no leite, que tem sido considerado um importante agente anticarcinogênico (LIN et al., 1995). Por outro lado, pode apresentar efeitos indesejados como citados anteriormente, como a redução na

digestibilidade da matéria seca e redução na relação acetato:propionato com consequente redução da gordura do leite.

Van Nevel e Demeyer (1988), observaram aumento da eficiência da síntese microbiana e redução da concentração de NH_3 em animais recebendo lipídios nas dietas. Isto ocorreu, provavelmente, devido ao efeito sobre a defaunação (redução na produção de protozoários) e/ou pela diminuição da população de bactérias desaminadoras. Estes resultados foram confirmados por Lana e Russell (1996), ao verificar que o óleo de milho, similarmente aos ionóforos monensina e lasalocida, aumentaram a resistências das bactérias ruminais a perda do potássio intracelular, quando as bactérias ruminais foram submetidas a níveis crescentes de ionóforos *in vitro*.

Porém, são escassos na literatura estudos que avaliaram a utilização de fontes de lipídios e a síntese de proteína microbiana ruminal.

4.7 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Vacas alimentadas com dietas suplementadas com lipídeos podem aumentar a produção de leite uma vez que aumentam a ingestão de energia ou melhoram a eficiência de utilização da energia (KLUSMEYER et al., 1991). O desempenho produtivo de vacas leiteiras suplementadas com fontes de lipídeos pode variar em função da dieta basal (especialmente o volumoso), estágio de lactação, balanço energético, composição e nível de inclusão da fonte lipídica utilizada (NRC, 2001).

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

No entanto, é preciso enfatizar que as diferentes fases de lactação podem influenciar o aproveitamento de energia devido ao balanço de energia em que o animal se encontra. Esse benefício foi confirmado por Onetti e Grummer (2004), que observaram que vacas em início de lactação utilizaram de forma mais eficiente o aumento da densidade energética das rações

com lipídeos em relação a vacas no terço médio de lactação, atribuindo tal fato as diferenças na partição de nutrientes e possivelmente ao balanço energético dos animais suplementados.

No início de lactação, o suprimento da exigência energética de vacas leiteiras pode ser limitado pela capacidade de ingestão de matéria seca. Dentre as estratégias nutricionais que aumentam a densidade energética das rações, encontra-se a inclusão de altas taxas de carboidratos não-fibrosos e a suplementação de lipídeos. A alimentação com altos níveis de carboidratos não-fibrosos pode fazer com que as vacas predisponham a uma acidose no rúmen e à redução no consumo e teor de gordura no leite.

A adição de lipídeos na dieta, por meio de óleos, e especialmente de sementes de oleaginosas como o grão de soja, pode melhorar o nível energético para atender a demanda de alta produção de leite. Esta adição além de permitir maior incorporação de ácidos graxos de cadeia longa na gordura do leite, melhora a eficiência da energia metabolizável utilizada na produção de leite, uma vez que ácidos graxos da dieta podem ser incorporados à gordura do leite, com redução da energia na síntese de ácidos graxos (HUTJENS; SCHULTZ, 1971; MOHAMED et al., 1988).

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

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

Segundo Allen (2000), o processo de biohidrogenação é mais intenso, sendo maior de 90%, quando se fornece óleos nas rações. Esse processo pode ser realizado por rota alternativa, produzindo ácidos graxos específicos *cis-9*, *trans-11*- CLA e o *trans-10*, *cis-12* CLA (DHIMAN et al., 2000; BAUMAN; GRIINARI, 2001). Estudos recentes demonstraram

que o isômero *trans*-10, *cis*-12 CLA produzido durante o processo de biohidrogenação tem efeito inibidor sobre a síntese da gordura do leite na glândula mamária (CHOUINARD et al., 1999; BAUMAN; GRIINARI, 2001).

Embora tais fatores possam influenciar de forma ativa a variação no teor de gordura do leite, a intensidade de tal mudança é inerente ao tipo e nível de suplemento utilizado, e ao nível de fibra da dieta, especialmente advindas do volumoso utilizado em maior quantidade durante a suplementação.

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

Essa variação no teor de proteína do leite em resposta a suplementação de lipídeos tem sido citada na literatura (WU; HUBER, 1993; WU et al., 1994; ROMO et al., 2000) e algumas hipóteses têm sido propostas procurando explicar a razão para este decréscimo.

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

Outra teoria descreve a resistência à insulina de alguns tecidos sobre a síntese de proteína do leite. Palmquist e Moser (1981) verificaram que a taxa de glicose em vacas leiteiras foi correlacionada negativamente com os aumentos das concentrações de insulina causada pela glicose. Estes autores verificaram que altas taxas de insulina foram observadas em vacas leiteiras que receberam altas quantidades de lipídios nas dietas, e assim esses altos níveis de lipídios poderiam causar resistência à insulina a qual pode reduzir o fluxo de aminoácidos para a glândula mamária para síntese de proteína do leite.

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

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

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

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

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

A utilização de sementes de oleaginosas como o grão de soja, pode melhorar o nível energético para atender a demanda de alta produção de leite, além de permitir maior incorporação de ácidos graxos de cadeia longa na gordura do leite, sem que ocorram alterações na fermentação ruminal, devido à liberação lenta de lipídeos no rúmen, não ultrapassando a capacidade de biohidrogenação. O aumento na produção de leite somado à sua composição, principalmente em regiões onde os produtores recebem por concentração de gordura e proteína, juntamente com um retorno econômico adequado, é o objetivo principal quando se busca novas alternativas ou melhor utilização de recursos disponíveis.

4.8 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE

Os avanços da pesquisa, especialmente nas técnicas de análise de gordura, permitiram separar a gordura animal em seus componentes menores, os ácidos graxos, e avaliar o efeito individual destes em modelos experimentais. Destes estudos descobriu-se que vários ácidos graxos possuem propriedades benéficas à saúde, como o ácido butírico e os ácidos graxos insaturados: ácidos oleico, eicosapentaenóico (EPA), decosahexaenóico (DHA) e os ácidos linoleicos conjugados (CLAs) (LEITE; LANNA, 2009).

Além dos efeitos na saúde, os ácidos graxos da classe ômega 3 e 6 e CLA apresentam a capacidade de modificar o metabolismo de alguns tecidos, o que pode ser usado estrategicamente em algumas situações com a finalidade de melhorar o desempenho animal. Por exemplo, a depressão de síntese de gordura no leite, provocada pelo CLA *trans*-10, *cis*-12, que pode ser usado para diminuir o gasto energético de vacas leiteiras em início de lactação, amenizando o balanço energético negativo (MEDEIROS et al., 2000). Outro exemplo são os ácidos graxos da classe ômega 3 que podem influenciar positivamente a reprodução e o sistema imunológico de vacas.

A gordura no leite é composta por 97-98% de triglicerídeos, sendo o restante formado por fosfolipídios e esteróis. Em torno de 500 ácidos graxos são encontrados esterificados na molécula de triglicerídeo (DEMEYER; DOREAU, 1999).

A gordura no leite é sintetizada a partir dos ácidos graxos obtidos de diversas fontes: dos lipídeos da dieta, da mobilização de triglicerídeos do tecido adiposo ou através da síntese própria, chamada de síntese *de novo*.

A síntese *de novo* é responsável pela produção de ácidos graxos de cadeia curta (C4-10). No caso dos ácidos graxos de cadeia média (C12-16) apenas 50% são sintetizados por esta via, o restante vem de ácidos graxos pré-formados. Os ácidos graxos de cadeia longa (>C18) e 50% dos ácidos graxos de cadeia média chegam a glândula mamária através da circulação sanguínea (DEMEYER; DOREAU, 1999).

A síntese *de novo* ocorre a partir do acetato e do 3-hidroxibutirato, sendo que o último contribui com cerca de 15% do conteúdo de carbono. O principal processo metabólico envolve duas enzimas, a Acetil-CoA Carboxilase (ACC) e o complexo ácido graxo sintase (FAS). A ACC catalisa a ação de malonil-CoA a partir do acetato enquanto a FAS catalisa ciclos de condensação do malonil-CoA ou butiril-CoA, provenientes do acetato e hidroxibutirato, respectivamente (LEITE; LANNA, 2009).

O produto final desta reação no tecido adiposo é o C14:0 e predominantemente o C16:0. Porém, a FAS da glândula mamária de ruminantes produz grande quantidade de ácidos graxos de cadeia curta (CHILLIARD et al., 2000). Esta produção ocorre devido a ativação de transacilase da FAS, que pode tanto incorporar quanto liberar cadeias acil com comprimento de 2 a 12 carbonos. Os ácidos graxos de cadeia curta e média são liberados antes de completarem todos os ciclos de condensação até C14 ou C16, e são, então, incorporados na molécula de triglicerídeo (KNUDSEN; HANSEN; MIKKELSEN, 1986).

Ao contrário dos outros tecidos de ruminantes, a glândula mamária não é capaz de converter o C16 em C18, através da elongação da cadeia, porém apresenta alta atividade da delta-9 dessaturase, o qual converte o ácido esteárico em ácido oleico (C18:1 *cis*-9). Estas atividades da glândula mamária são importantes para controlar a fluidez de gordura no leite (CHILLIARD et al., 2000).

Os ácidos graxos pré-formados captados pela glândula mamária são oriundos dos ácidos graxos não esterificados (AGNE) ou das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (quilomícron e lipoproteína de muito baixa densidade – VLDL). O uso do AGNE pela glândula mamária é diretamente relacionado à sua concentração sanguínea, o qual por sua vez é relacionado à mobilização de reservas corporais. Já o uso de ácidos graxos a partir de lipoproteínas é determinado pela atividade da enzima lipoproteína lípase, o qual é alta na glândula mamária de ruminantes em lactação. Os ácidos graxos pré-formados são ácidos de cadeia longa, em sua grande maioria, e saturados ou monoinsaturados, devido a biohidrogenação promovida pelas bactérias ruminais. Ácidos graxos de cadeia ímpar ou ramificada podem também aparecer na gordura do leite tendo origem na síntese microbiana no rúmen (CHILLIARD et al., 2000).

O perfil da gordura no leite varia em função da partição relativa de cada uma das fontes de ácidos graxos da glândula mamária. A mobilização é muito importante no início da lactação, mas diminui com o avanço da mesma. A absorção de lipídeos da dieta sofre influência do processo de biohidrogenação ruminal, que tende a saturar os ácidos graxos poli-insaturados, formando também, além de ácidos graxos saturados, vários intermediários mono ou poli-insaturados de cadeia *trans*. O processo de biohidrogenação pode ser manipulado por alterações da dieta, produzindo uma gama enorme de ácidos graxos. A síntese *de novo* também sofre influência da dieta e de fatores metabólicos no rúmen.

O uso de fontes de lipídeos na dieta de ruminantes pode alterar a composição ou o perfil de ácidos graxos presentes no leite, bem como o teor de gordura. O grão de soja possui grande percentual de ácidos graxos insaturados, e ainda, se fornecida de forma integral, pode-se minimizar os efeitos dos lipídeos sobre a fermentação ruminal, devido ao menor contato dos lipídeos com os microorganismos, pois funciona como um tipo de fonte lipídica protegida (BYERS; SCHELLING, 1989).

Os efeitos dos lipídeos fornecidos na dieta sobre a composição da gordura do leite têm sido amplamente estudados, como objetivo de verificar o efeito da fonte de lipídeo adicionada à dieta sobre o perfil de ácidos graxos no leite.

4.9 METABÓLITOS SANGUÍNEOS

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

No metabolismo das gorduras o fígado é um órgão de grande importância, pois recolhe do sangue quilomicrons e lipoproteínas de densidade muito baixa que estão presentes em abundância durante a absorção intestinal e durante a mobilização de reservas corporais e, após, hidrolisa e reesterifica os ácidos graxos. Assim devolve ao sangue os ácidos graxos na

forma de triglicerídeos, fosfolipídeos e ésteres de colesterol incorporados nas lipoproteínas, fundamentalmente nas de baixa densidade (NIEMEYER, 1978). A maior concentração de lipídeos no sangue é explicada pelo aumento dos lipídios absorvidos no intestino ou proveniente da lipólise (JENKINS; JENNY, 1992).

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

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

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

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

Drackley et al. (1992) e Elliott et al. (1993) avaliaram a suplementação de lipídeos em vacas Holandesas e não observaram mudanças nas concentrações de ureia no sangue dos animais. De acordo com Schauff et al. (1992), mudanças nas concentrações de uréia e

nitrogênio plasmático poderiam ser atribuídas às baixas concentrações de nitrogênio amoniacal no rúmen.

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

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

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

4.10 FONTES LIPÍDICAS

Várias fontes de lipídeos têm sido extensamente pesquisadas para utilização na dieta de vacas leiteiras. Principalmente as que são ricas em ácidos graxos essenciais, por apresentarem efeitos benéficos diretos na reprodução. Ácidos graxos essenciais são assim denominados por não serem sintetizados pelo corpo do animal, e por isso necessitam estar presentes na dieta. Os benefícios da utilização de lipídeos na dieta animal incluem desde a atenuação do balanço energético negativo através do aumento da densidade da dieta em situações onde há redução do consumo voluntário até aumento da eficiência ruminal pela inibição de protozoários e bactérias metanogênicas, aumento da produção de leite e da gordura e melhoria do desempenho reprodutivo e sistema imunológico. Entretanto, o excesso de lipídeos na dieta pode resultar justamente em efeitos antagônicos como: depressão no consumo, depressão das concentrações de gordura e proteína do leite e queda na produção de

leite. Portanto, atenção deve ser dada em quanto e como usar lipídeos na dieta de vacas leiteiras (PALMQUIST; MATOS, 2006).

Vacas em estresse calórico também diminuem o consumo voluntário, principalmente de forragem, devido ao calor produzido durante a fermentação ruminal destes alimentos, aumentando o desconforto térmico. Estes animais mobilizam mais energia para a perda de calor e manutenção da temperatura corporal, energia esta que poderia estar sendo direcionada à produção de leite. A maior eficiência observada para vacas consumindo dietas com lipídeos pode estar relacionada com menor gasto de energia para manutenção usada para dissipar calor em condições de estresse calórico (NRC, 2001).

As sementes de algumas plantas como, por exemplo, soja, girassol, algodão, podem acumular até 45% de lipídeos do seu peso em matéria seca. Estas sementes são melhores fontes de lipídeos porque o óleo geralmente é liberado lentamente no rúmen, não superando a capacidade de biohidrogenação pelos microorganismos ruminais. Os óleos vegetais são mais insaturados do que a gordura animal e por isso podem deprimir mais a digestibilidade da fibra do que a gordura animal. Porém, a utilização de qualquer fonte de lipídios de origem animal em dietas para ruminantes foi proibida desde 2004 (GLASSER et al., 2008).

Outra fonte de lipídeo são as chamadas “gorduras protegidas” ou lipídios associados à sais de cálcio que praticamente não sofrem digestão ruminal (cerca de 80% de proteção). As gorduras protegidas são formas seguras de aumentar a densidade da dieta sem o comprometimento ruminal, além de serem fontes de ácidos graxos essenciais, porém, ainda são fontes de custo elevado. Geralmente os alimentos utilizados na alimentação de vacas leiteiras não conseguem repor os ácidos graxos essenciais secretados no leite, por exemplo, linoleico e linolênico. Cerca de somente 12-25% dos ácidos graxos insaturados (extrato etéreo dos grãos, sementes oleaginosas, sebos e óleos) alcançariam o intestino e seriam absorvidos, devido à alta biohidrogenação causada pelos microorganismos ruminais. Uma fonte lipídica ideal deve ser aquela que tem mínima interferência sobre a fermentação ruminal e alta digestibilidade no intestino delgado (JENKINS, 1992).

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

(participação de nutrientes para a secreção do leite); aumento da flexibilidade para o preparo da dieta; utilizados para modificação da composição da gordura do leite ou de tecidos para aceitação pelo consumidor e aumento da absorção de nutrientes solúveis (NRC, 2001; PALMQUIST; MATTOS, 2006).

4.10.1 Grão de Soja

Entre as diferentes fontes de proteína e lipídios disponíveis para serem utilizadas na alimentação de ruminantes no Brasil, o grão de soja se destaca pela grande disponibilidade e custo compatível com seu rico conteúdo de nutrientes. Atualmente segundo dados do AGRIANUAL (2009), o Brasil é o segundo produtor mundial de soja, com 68,5 milhões de toneladas produzidas na safra 2009/2010, perfazendo aproximadamente 23 milhões de hectares cultivados.

A utilização de grão de soja cru ou não processado na alimentação de ruminantes não é recente. Por apresentar composição de aproximadamente 39,3% de proteína bruta, 19,2% de extrato etéreo e 95% de NDT, o grão de soja tem sido utilizado na alimentação de ruminantes com o propósito de ser fonte de proteína, especialmente pela alta concentração e adequado valor biológico deste nutriente, e por também apresentar uma fibra de alta digestibilidade, e com efetividade mediana quando comparado com forragens, mas superior a de outros alimentos concentrados (NRC, 2001; VALADARES FILHO; MAGALHÃES; ROCHA JÚNIOR, 2006). Também, pelo elevado teor de extrato etéreo, pode ser considerado alimento fonte de lipídios para ruminantes. O grão de soja também se destaca pelo elevado valor de ácidos graxos insaturados e pela grande aceitação pelos animais.

Palmquist e Conrad (1978) utilizaram vacas da raça Holandesa e Jersey e avaliaram rações contendo farelo de soja, grão de soja cru e moído e uma mistura de gordura hidrogenada em duas proporções, perfazendo cerca de 3,18, 5,93, 5,73 e 10,8% de extrato etéreo na matéria seca das rações. Os resultados demonstraram que a utilização de fontes lipídicas não influenciaram a produção e composição do leite e o peso corporal, porém influenciou o consumo de matéria seca, com um menor consumo observado para a dieta contendo grão de soja. Em relação à digestibilidade aparente total (DAT) dos nutrientes, foram encontrados efeitos desejados da suplementação com fontes de lipídios, especialmente na DAT do extrato etéreo e do nitrogênio.

Mielke e Shingoethe (1981) avaliaram dietas com farelo de soja, grão de soja cru e grão de soja tostado na alimentação de vacas primíparas em início de lactação. Foi utilizada silagem de milho como maior parte do volumoso, associada a feno de alfafa. A quantidade de grão de soja consumida foi de 2,19 e 2,14 kg/vaca/dia. Não foi observado efeito entre as dietas utilizadas no consumo de matéria seca e de proteína bruta, e na produção de leite e teor de lipídios, no entanto, a dieta com farelo de soja apresentou maiores teores de proteína no leite.

De forma semelhante, Scott, Combs e Grummer (1991) avaliaram a utilização de grão de soja cru processado na alimentação de vacas leiteiras com média de 115 dias em lactação e produção de leite corrigida para 4% de gordura de 30,0 kg de leite dia. O grão de soja avaliado foi laminado, moído, moído associado a resíduo de cervejaria seco, tostado e extrusado. As dietas formuladas forneceram em média 4,0 kg/dia de grão de soja por vaca, com exceção para a dieta composta por grão de soja associado a resíduo de cervejaria seco, que os animais tiveram acesso a menor quantidade de grão de soja. Não foi observada alteração na produção e composição do leite para as dietas que utilizaram grão de soja com menor nível de processamento, seja moído ou laminado, quando comparado com outras formas de processamento do grão de soja.

Scott, Combs e Grummer (1991) concluíram que se o grão de soja for utilizado como fonte de energia na alimentação de vacas leiteiras, não existe diferença entre as formas de processamento laminação, moagem, tostagem ou extrusão, especialmente para produção e composição do leite. Ainda, segundo estes autores os dados sugerem que é possível fornecer quantidades maiores de grão de soja na alimentação de vacas leiteiras em relação ao comumente recomendado, especialmente se as dietas forem fornecidas por meio de misturas completas (TRM).

Faldet e Satter (1991) avaliaram vacas em início de lactação e com média de produção de leite de 35,0 kg/dia com o objetivo de comparar o desempenho produtivo de animais alimentados com grão de soja tostado em relação ao farelo de soja e ao grão de soja moído grosseiramente, e o volumoso utilizado foi a silagem de alfafa. Foi observado aumento da produção de leite e redução dos teores de gordura e proteína do leite quando foi comparado o desempenho de vacas alimentadas com grão de soja tostado em relação a dieta com farelo de soja ou grão de soja cru moído. No entanto, não foi encontrada diferença entre as dietas com farelo de soja ou grão de soja cru moído sobre a produção e composição do leite e consumo.

Grummer e Luck (1994) avaliaram vacas leiteiras de alta produção de leite com média 44,0 kg e com 10 semanas de lactação. Os animais foram alimentados com silagem de alfafa

(30% MS) e de milho (18%) como volumoso, sendo os 52% restantes de concentrado. O objetivo do estudo foi avaliar dietas contendo grão de soja cru moído (10% MS), grão de soja moído associado a farinha de carne e ossos (4% MS) e farinha de sangue (0,9% MS), e grão de soja tostado (9% MS). Foi observado maior produção de leite e seus componentes para as dietas com maior proporção de proteína na forma de PNDR, com desempenho inferior para a dieta com grão de soja. Não foi observada nenhuma alteração no teor de gordura e proteína do leite, bem como no consumo de matéria seca e nutrientes, com exceção para o consumo de FDN.

Deresz, Fernandes e Matos (1996) utilizaram vacas Holandesas com produção de 28,0 kg de leite/dia, em início de lactação, as rações continham aproximadamente 0, 12 e 24% da matéria seca total de grão de soja crua, triturada grosseiramente, sendo equivalente no concentrado a 0, 20% e 40% de grão de soja. O volumoso utilizado foi a silagem de milho, e a relação volumoso/concentrado foi de 40/60. Segundo os autores, não foram observados efeitos da utilização de até 40% do concentrado de grão de soja sobre a produção e composição do leite e o consumo de matéria seca e nutrientes.

Mora, Leão e Valadares Filho (1996) avaliaram vacas de 26,0 kg de leite/dia, após o pico de lactação, alimentadas com silagem de milho como volumoso basal. O concentrado continha 0, 15, 30 e 45% de grão de soja moído, e a relação volumoso/concentrado da dieta era de 50/50. Não foi observado efeito das dietas experimentais sobre o consumo de matéria seca e de nutrientes, com exceção do consumo de extrato etéreo, que foi maior à medida que aumentava o nível de inclusão de grão de soja nas dietas. O consumo de grão de soja foi de 1,34, 2,73 e 3,65 Kg/dia para as dietas com 15, 30 e 45% de grão de concentrado. Também não foi observado efeito sobre produção e composição do leite.

Santos et al. (2001) incluíram grão de soja moído em 23,5% da matéria seca total em vacas 7/8 Holandês-Zebu com 30 dias de lactação, e com produção média de 20,0 kg de leite/vaca/dia, e o volumoso utilizado foi a silagem de sorgo. Foi utilizada além da dieta com grão de soja moído a dieta controle e com óleo de soja degomado. Estes autores não verificaram efeito do grão de soja e do óleo em relação à dieta controle na produção e composição do leite.

No estudo de Duarte et al. (2005), foi avaliado diferentes fontes de lipídios na alimentação de vacas da raça Jersey após o pico de lactação, com média de produção de leite de 21,0 kg/dia. As fontes utilizadas foram grão de soja moído (15% MS), sebo (2,74% MS) e sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma (3,2% MS), além da dieta controle. As dietas continham aproximadamente 6,3% de extrato etéreo, e a dieta controle cerca de 3,6%. Como

volumosos as dietas foram baseadas em silagem de milho (60%) e feno de alfafa (40%). Os autores não encontraram alteração no consumo de matéria seca e fibra, sendo observado somente maior consumo de extrato etéreo para as vacas alimentadas com fontes lipídicas. As vacas submetidas a dieta com grão de soja consumiram cerca de 2,53 Kg/dia desta semente de oleaginosa. Também, não foi observada diferença entre as dietas controle, grão de soja e sais de cálcio em relação a produção e composição de leite. A dieta com sais de cálcio de ácidos graxos apresentou maior produção de leite do que as dietas controle e grão de soja.

Freitas Júnior et al. (2010) avaliaram a utilização de diferentes fontes lipídicas para vacas leiteiras. Neste estudo foram avaliadas a dieta controle e três fontes de lipídios, sendo mantido similar nível de extrato etéreo na matéria seca das dietas com lipídios (aproximadamente 5,0%): óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos insaturados. O nível de inclusão do óleo de soja e dos sais de cálcio foi de 3%, enquanto que do grão de soja integral foi de 16% da MS, e o volumoso utilizado foi a silagem de milho na relação volumoso/concentrado de 60/40.

Freitas Júnior et al. (2010) observaram menor consumo de matéria seca para os animais submetidos às rações contendo fontes de lipídios, em relação à dieta controle. O consumo de extrato etéreo, como era de se esperar, foi superior para os animais submetidos às dietas com fontes lipídicas. Não houve efeito das fontes de lipídios nas dietas sobre a produção de leite com e sem correção, produção de gordura, lactose e nos teores de proteína e lactose.

Barletta et al. (2010) observaram que a inclusão de até 16% na MS de grão de soja crua, não tem influência no consumo de matéria seca, bem como na produção de leite, e observaram maiores teores de gordura no leite das vacas suplementadas com grão de soja. Os autores não observaram no experimento possíveis efeitos negativos da utilização de grão de soja crua, demonstrando seu potencial de utilização, no experimento a média de produção das vacas foi de 35 kg/leite dia, e o volumoso utilizado foi a silagem de milho.

4.10.2 Óleo de Soja

O uso de óleos nas rações de vacas leiteiras tem potenciais efeitos sobre o metabolismo ruminal (BAUMAN; GRIINARI, 2001). O óleo de soja possui em torno de 75% de ácidos graxos insaturados em sua composição, de modo que estes podem atuar na

diminuição da produção de metano e do aumento da produção de CLA (ALLEN, 2000; ONETTI; GRUMMER, 2004; PALMIQUIST; MATTOS 2006).

Segundo Dhiman et al. (2000), o óleo de soja é rico em ácido linoleico (C18:2). Esse ácido graxo insaturado, quando adicionado à dieta, tem inúmeros efeitos positivos como aumentar a eficiência da síntese microbiana devido à redução no número de protozoários no ambiente ruminal, reduzir a concentração de amônia (NH₃) ruminal pela redução no número de bactérias desaminadoras, e aumentar a disponibilidade de ácido linoleico conjugado (CLA), o qual tem considerável efeito anticarcinogênico quando presente na gordura do leite (LIN et al., 1995).

Porém, recomenda-se a inclusão de apenas 3% a 5% de óleo de soja na dieta (PALMQUIST; JENKINS, 1980), afim de reduzir a incidência de possíveis efeitos deletérios, como redução na digestibilidade de alimentos fibrosos, o que aumenta sua retenção ruminal e reduz a ingestão de MS (ALLEN, 2000), redução na produção de leite e no teor de gordura do mesmo (PALMQUIST, 1991; DHIMAN, 2000), e diminuição na concentração de AGCC e na proporção de acetato:propionato no leite por inibição das bactérias gram-positivas (NAGARAJA et al., 1997), sendo que o butirato, por também ser secretado através da β -redução do β -hidroxibutirato, não teve sua síntese inibida (FOX; McSWEENEY, 1998).

A constatação acima foi avaliada também por Eifert (2006), que observou não apenas uma diminuição de 22% e 23,2% nos AGCC e nos AGCM, respectivamente, assim como um aumento de 29,6% de AGCL com a inclusão de óleo na dieta. O mesmo autor observou ainda uma diminuição na presença dos AG saturados, precursores do colesterol de baixa densidade (LDL), acusados de colaborar com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (PARODI, 1994), assim como um aumento na participação dos AG insaturados, monoinsaturados e poliinsaturados, com melhora na qualidade nutricional do leite por aumento do colesterol de alta densidade (HDL), o qual atua na diminuição das doenças coronarianas (DEMEYER; DOREAU, 1999).

O óleo de soja, por ser uma fonte insaturada e desprotegida de lipídios, é extensivamente biohidrogenado no rúmen, podendo chegar à completa saturação como ácido esteárico C18:0. Como os ácidos graxos insaturados são tóxicos para os microrganismos ruminais, a inserção de um íon hidrogênio nas duplas ligações foi uma forma de proteção desenvolvida pelos mesmos. Essa biohidrogenação é parcial, de cerca de 75% do óleo linoleico quando sua inclusão é de até 8% da dieta (BATEMAN; JENKINS, 1998). O pH ruminal exerce importante efeito sobre a taxa de biohidrogenação, que é diminuída em baixos pH, como aqueles atingidos em dietas ricas em carboidratos não-estruturais. A etapa final da

biohidrogenação é afetada nesses casos, onde a conversão de trans-C18:1 a ácido esteárico é prejudicada (DEMEYER; DOREAU, 1999).

Há, portanto, a formação de isômeros cis e trans, sendo que o acúmulo da configuração trans se dá, provavelmente, por sua menor toxicidade às membranas celulares, se comparada à configuração cis (BESSA et al., 2000). Esse acúmulo foi observado por Eifert et al. (2006), com um aumento de 229% da forma trans C18:1 e de 33,8% da forma cis C18:1 quando o óleo de soja foi adicionado às dietas. Além da parcial biohidrogenação ruminal, outra fonte de origem dos CLA no leite é a síntese endógena a partir da ação da enzima $\Delta 9$ -desaturase sobre o ácido graxo trans-11 C18:1 na glândula mamária (LAWSON et al., 2001).

Segundo Evans et al. (2002), os CLA são produzidos pela bactéria *Butyrovibrio fibrisolvens* através da isomerização do ácido linoleico. Os principais ácidos graxos formados na biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados são trans-C18:1, cis-9 trans-11 C18:2 e trans-10 cis-12 C18:2. De acordo com McGuire e McGuire (1999), o CLA cis-9 trans-11 possui importante efeito anticarcinogênico em concentrações próxima a 1% da dieta. Este ainda possui efeito auxiliar no combate à diabetes e no estímulo do sistema imune.

O CLA trans-10 cis-12, por outro lado, possui efeito inibidor na síntese de gordura do leite, por reduzir enzimas responsáveis pela síntese de novo na glândula mamária e a expressão de genes lipogênicos (LOOR; HERBEIN, 2003). Essas constatações despertaram o interesse no desenvolvimento de inúmeras pesquisas utilizando de determinados ácidos graxos adicionados à dieta ou diretamente infundidos no rúmen para determinação de seus efeitos.

Explorar o processo de biohidrogenação pela característica específica de ácidos graxos poliinsaturados como óleos na tentativa de aumentar a concentração de ácidos graxos como o cis-9 trans-11 CLA no leite tem sido objeto de estudo nos últimos anos. Isso pode ser justificado pelo aumento do processo de biohidrogenação quando grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados são fornecidas nas rações (ZHENG et al., 2005).

Kelly et al. (1996) demonstraram que a suplementação de óleos vegetais ricos em ácido linoléico aumentaram a concentração de CLA no leite. Zheng et al. (2005) avaliaram a suplementação de óleo de soja, de milho e caroço de algodão com níveis de inclusão de 2% da matéria seca total. Estes autores observaram aumento de duas a três vezes mais no conteúdo do isômero cis-9 trans-11 CLA para as rações com óleos. Santos et al. (2001) avaliaram a inclusão de óleo de soja (4,6% da matéria seca) como fonte de lipídios sobre a produção de

CLA no leite, e concluíram que a suplementação de óleo de soja aumentou significativamente o teor de CLA na gordura do leite.

4.10.3 Sais de Cálcio de Ácidos Graxos

Diversos tipos de suplementos comerciais contendo lipídios inertes no rúmen estão disponíveis no mercado. O mais comum deles são os sais de cálcio de ácidos graxos, obtido a partir de ácidos graxos de cadeia longa. Esses ácidos graxos reagem com os sais de cálcio, unidos na forma de um sal do tipo $R-COO-Ca$, popularmente conhecido como sabão de cálcio (RENNÓ, 2009).

Considerando que ocorram possíveis efeitos deletérios da suplementação de algumas fontes insaturadas de lipídios sobre a fermentação ruminal, esses produtos comerciais teriam como principal vantagem fornecer ácidos graxos essenciais que iriam passar direto para o abomaso sem que ocorresse liberação de ácidos graxos no rúmen, e consequentemente, intensa biohidrogenação ruminal, não afetando diretamente a população microbiana. Para tal, a ligação entre o cálcio (Ca) e os ácidos graxos não deve ser rompida. Existem no mercado sais de cálcio de ácidos graxos formados a partir de óleo de palma, colza e soja, sendo que os dois últimos são mais insaturados e mais dissociados e biohidrogenados no rúmen (RENNÓ, 2009).

Os sais de cálcio de ácidos graxos aumentaram a produção de leite e/ou a porcentagem de lipídios sem alterar a digestibilidade da dieta em estudos conduzidos por Fearon e Kilpatrick (1991); Klusmeyer (1991a,b); Erickson (1992) e Sklan (1992). Contudo, Chouinard et al. (1998) afirmou que os sais de cálcio tanto de óleo de linhaça quanto de óleo de soja não foram capazes de aumentar a concentração de ácido linolênico e linoleico, respectivamente, conclui que aparentemente os sais de cálcio desses ácidos graxos não foram eficazes na proteção contra a biohidrogenação ruminal.

De acordo com Wang (2010) respostas da suplementação de ácidos graxos protegidos ou inertes no rúmen para o consumo de matéria seca têm sido inconsistente e afirmou que a proteção dos ácidos graxos é incompleta e já vem sendo descrita em estudos anteriores (Chouinard et al, 1998; Lundy et al. 2004), onde o fluxo de ácidos graxos insaturados pós ruminal é menor do que o esperado.

Ao descrever o uso de fonte alternativa de lipídios nas dietas, deve se ter atenção ao período de adaptação e aceitabilidade para poder concluir sobre o desempenho produtivo dos animais. Allen (2000) em sua revisão avaliou estudos que observaram o consumo de matéria seca de diferentes fontes lipídicas comumente utilizadas nas dietas de vacas leiteiras e observou que quase a metade dos trabalhos usados para sua revisão quando utilizava-se sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma apresentaram redução no consumo de matéria seca, e atribuiu esses achados a aceitabilidade da fonte de lipídios.

Apesar das limitações referentes à biohidrogenação ruminal e teor de gordura no leite, o uso de lipídios inertes na alimentação de vacas no período de lactação consiste em uma forma alternativa para as dietas melhorando a eficiência energética e reduzindo o teor de amido da dieta que causa comprometimento a fermentação ruminal.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS

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

A localização geográfica do LPBL é 21° 57' 28" de latitude sul, 47° 27' 21" de longitude oeste e altitude de 635 metros.

Foram utilizadas 8 vacas múltiparas da raça Holandesa (180 ± 20 dias em lactação; média $\pm$ DP) peso corporal (580 ± 25 kg; média $\pm$ DP) e produção média de 15,22 kg leite/vaca/dia, canuladas no rúmen e no abomaso distribuídas em dois quadrados latinos 4x4 balanceados e contemporâneos. Cada período experimental teve duração de 21 dias, sendo os 14 primeiros de adaptação às dietas e os demais para coleta de amostras. Foram fornecidas 4 dietas experimentais sendo uma dieta controle e três dietas contendo suplementos lipídicos conforme a tabela 2. As vacas foram preparadas cirurgicamente 30 dias o parto. Todos os procedimentos experimentais aplicados neste trabalho incluindo o procedimento cirúrgico seguiram os "Princípios Éticos na Experimentação Animal" recomendados pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (processo 1603/2009). Antes do início do experimento foi determinado o peso de corpo vazio das vacas removendo todo o conteúdo ruminal sendo o peso de 516 ± 33 kg (HAVARTINE; ALLEN, 2006a).

Os animais foram alojados em estábulo tipo "free-stall", com ventilação forçada, em baias individuais de $17,5\text{m}^2$ de área e providas de camas de areia, sendo ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia, as 6h00 e as 16h00.

As vacas selecionadas apresentaram características semelhantes entre si, para melhor distribuição nos tratamentos avaliados. As variáveis obtidas como critério para alocar os animais aos Quadrados Latinos foram: produção de leite na lactação anterior; peso corporal; ordem de partos e escore de condição corporal.

5.2 DIETAS EXPERIMENTAIS

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

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

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

5.3 ANÁLISE DE ALIMENTOS

As amostras de silagem, sobras, digestas de abomaso e rúmen foram moídas em moinho (MARCONI® - MOD - 0.48) com nitrogênio líquido a -192°C em peneira de crivo de 5 mm para evitar oxidação dos ácidos graxos (HAVARTINE; ALLEN, 2006a). Em seguida as amostras foram liofilizadas (MARCONI®) e moídas em moinho com peneira de crivo de 1 mm para posterior análises. Amostras de alimentos e sobras foram analisadas quanto aos

teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), proteína insolúvel em detergente neutro (PIDN), proteína insolúvel em detergente ácido (PIDA) e lignina de acordo com as metodologias descritas pela AOAC (1990). O teor de proteína bruta (PB) foi obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25.

Tabela 1 - Composição química bromatológica dos concentrados experimentais

	C ¹	OS ²	GS ³	SC ⁴
<i>Ingredientes</i>	% MS			
Milho moído	60,00	51,47	39,99	52,78
Farelo de soja	30,83	30,29	5,72	30,15
Óleo de soja	-	8,63	-	-
Grão de soja	-	-	45,80	-
Sais de cálcio	-	-	-	9,18
Uréia	2,29	2,72	1,14	2,73
Sulfato de amônia	0,57	0,57	0,29	0,57
Óxido de Magnésio	0,46	0,46	0,46	0,46
Fosfato bicálcico	1,80	1,80	1,77	1,81
Calcáreo	2,11	2,11	2,55	-
Mineral ⁵	0,60	0,60	0,60	0,60
Sal comum	1,34	1,34	1,69	1,72
<i>Composição química</i>				
Matéria seca ⁶	89,29	90,39	90,70	90,01
Matéria orgânica	88,02	87,72	88,20	87,02
Proteína bruta	27,42	27,50	26,78	27,60
Extrato etéreo	2,16	10,56	9,84	11,14
Fibra em detergente neutro	10,50	9,41	14,12	9,55
Carboidratos não fibrosos ⁷	47,94	40,25	37,46	38,77
Fibra em detergente ácido	4,98	4,58	8,28	4,62
Lignina	0,42	0,49	1,52	0,50
Matéria mineral	11,98	12,28	11,80	12,94
NDT ⁸	76,25	84,28	80,47	83,95
EL _L ⁸ (Mcal/kg MS)	2,03	2,37	2,44	2,35

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

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

⁶ material natural;

⁷ estimados segundo Hall (1998).

⁸ estimado pelas equações do NRC (2001);

Os nutrientes digestíveis totais foram calculados conforme equações de Weiss et al. (1992), descritas no NRC (2001), em que: $NDT = CNF_d + PB_d + (AG_d * 2,25) + FDN_d - 7$, onde PB_d , CNF_d , FDN_d e AG_d representam o total destes nutrientes digestíveis.

Tabela 2 – Composição química bromatológica e composição de ácidos graxos das dietas experimentais

	C ¹	OS ²	GS ³	SC ⁴
Ingredientes	% MS			
Silagem de Milho	65,00	65,02	65,04	65,02
Milho moído	21,00	18,01	13,98	18,01
Farelo de soja	10,79	10,60	2,00	10,60
Óleo de soja	-	3,02	-	-
Grão de soja	-	-	16,01	-
Sais de cálcio de ácidos graxos	-	-	-	3,02
Uréia	0,80	0,95	0,40	0,80
Sulfato de amônia	0,20	0,20	0,10	0,20
Bicarbonato de sódio	0,00	0,00	0,00	0,00
Óxido de Magnésio	0,16	0,16	0,16	0,16
Fosfato bicálcico	0,63	0,63	0,62	0,63
Calcáreo	0,74	0,74	0,89	-
Mineral ⁵	0,21	0,21	0,21	0,21
Nutrientes				
Matéria seca	57,51	57,67	58,24	55,67
Matéria orgânica	91,97	91,26	91,71	92,03
Proteína bruta	14,11	14,14	13,88	14,14
Extrato etéreo	2,73	5,34	5,66	5,34
Fibra em detergente neutro	36,38	35,99	34,56	35,99
Carboidratos não fibrosos ⁶	38,20	35,70	34,20	35,84
FDNi ⁸	12,13	12,10	12,00	12,10
Fibra em detergente ácido	20,57	20,43	21,78	20,43
Lignina	3,82	3,81	4,18	3,81
Matéria mineral	8,03	8,74	8,29	8,74
NDT ⁹	75,63	78,49	78,27	77,92
EL _L ⁹ (Mcal/kg MS)	1,88	2,00	2,03	1,98
Ácido graxos	g/100g de AG			
C14:0	0,31	0,33	0,27	0,31
C16:0	11,33	11,56	12,38	11,35
C18:0	3,23	3,21	3,36	3,21
C18:1 <i>cis</i>	22,78	22,45	21,86	22,48
C18:2	50,37	50,30	50,67	50,11
C18:3	5,58	5,42	5,69	5,63
Outros	1,17	0,54	0,34	0,41
Total ácidos graxos	94,77	93,81	95,57	93,50
Total AG Insaturados	79,90	78,71	78,56	78,63

¹ Controle; ² óleo de soja; ³ grão de soja; ⁴ sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac-E[®]).

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

⁶% estimados segundo Hall (1998); ⁸% fibra em detergente neutro indigestível; ⁹ estimado pelo NRC (2001).

Tabela 3 – Composição de ácidos graxos dos ingredientes (g/100g de ácidos graxos)

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

¹Sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac-E®)

Os teores de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente neutro livre de cinza e proteína (FDNcp), e fibra detergente ácido (FDA) foram obtidos conforme método descrito por Mertens (2002), utilizando-se α -amilase sem adição de sulfito de sódio na determinação do FDN, em Sistema Ankon.

O teor de energia líquida foi estimado através da equação estabelecida pelo NRC(2001), em que $EL \text{ (Mcal/kg)} = 0,0245 * NDT \text{ (\%)} - 0,12$.

5.4 DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

A digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes foi determinada por meio da utilização do indicador óxido crômico (Cr_2O_3). Do dia 9º ao 17º dia do período experimental foram inseridos no rúmen pela cânula 15 g/dia de óxido crômico (Cr_2O_3) sendo 5 g/vez nos horários 6, 14 e 22 h. As amostras de fezes (500 g) foram coletadas a cada 9 horas nos dias 15º, 16º e 17º do período de coleta totalizando 8 amostras de fezes para cada vaca / período, iniciando-se a primeira coleta às 9 horas da manhã do 15º dia e realizando-se a última coleta às 24 horas do 17º dia. O objetivo foi à formação do *pool* representativo de intervalo 3 horas de um período de 24 horas para retirar a variação diurna. As amostras de fezes coletadas foram pré-secas em estufa com ventilação forçada (60°C/72 horas) e processadas em moinho de facas com peneiras de porosidade 1 mm. Posteriormente estas amostras foram analisadas quanto a MS, MO, PB, EE e FDN, de acordo com a metodologia anteriormente descrita para análise de alimentos.

Para estimativa da digestibilidade aparente total as amostras de fezes foram digeridas com ácido fosfórico (WILLIAMS; DAVID; IISMA, 1962) e o cromo foi quantificado por

meio de reação colorimétrica. Para determinação da excreção fecal total foi utilizada a seguinte fórmula: ETF (kg)= óxido crômico via cânula ruminal (15 g)/ concentração de óxido crômico nas fezes (g/kg). As concentrações de óxido crômico nas fezes foram determinadas através de leitura em espectrofotometro de absorção atômica, chama de óxido nitroso/acetileno, com comprimento de onda de 398,8 nm e abertura de fenda de 0,2 nm (HUHTANEN; KUKKONEN, 1995).

5.5 BALANÇO DE ENERGIA

Para obtenção do consumo de energia bruta e realização do cálculo da eficiência do uso de energia consumida, as amostras de silagem, ingredientes e concentrados foram analisadas quanto ao seu teor de energia bruta em bomba calorimétrica, de acordo com Havartine e Allen (2006). O consumo de energia digestível (CED) foi obtido por meio do produto dos coeficientes de digestibilidade da matéria seca observados e dos consumos de energia bruta, de acordo com a energia nos ingredientes da dieta (HAVARTINE; ALLEN, 2006).

O consumo de energia líquida (CELI) foi calculado a partir dos teores de energia líquida nos alimentos e nas sobras, obtidos a partir da equação do NRC (2001), apresentada na seção consumo de matéria seca e nutrientes (1.3). A energia líquida de lactação foi estimada a partir da seguinte equação do NRC (2001): EL_L (Mcal/dia) = produção de leite (kg) $\times$ (0,0929 $\times$ G% + 0,0547 $\times$ P% + 0,0395 $\times$ L%), onde: G% é teor de gordura no leite; P% é o teor de proteína do leite e L% é o teor de lactose. A energia líquida de manutenção foi estimada, de acordo com o NRC (2001), como $EL_M = 0,08 \times PV^{0,75}$ e o balanço de energia (BE) obtido pela diferença entre o CELI e $EL_L + EL_M$.

A eficiência de utilização de energia foi calculada de através da relação da EL_L e o CED e através da razão entre a soma da EL_L e EL_M e o CED.

5.6 BALANÇO DE NITROGÊNIO

Para o cálculo de balanço de nitrogênio foi realizada a determinação da concentração de creatinina na urina de acordo com metodologia descrita por Valadares, Broderick e Valadares Filho (1999) e Rennó (2003). As amostras *spot* de 50 mL de urina foram obtidas de todas as vacas no 19º dia de cada período experimental, quatro horas após a alimentação matinal, durante micção estimulada por massagem na vulva. As alíquotas de 50 mL de urina (amostra *spot*) foram filtradas e alíquotas de 10 mL foram diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico e foram armazenadas a -15°C para posteriores análises de ácido úrico e alantoína. Uma amostra de urina pura foi armazenada para determinação de creatinina.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Laborlab[®]), utilizando reação enzimática calorimétrica cinética em aparelho SBA-200 CELM[®]. Para a realização dessa análise, 100 µL de urina foram diluídos em 4.900 µL de água deionizada. Os resultados obtidos foram calculados pela seguinte fórmula: Creatinina (mg/L)= creatinina (mg/dL)*10 (dL/L)*50 (BIGGS; COPPER, 1961).

O volume urinário total diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina das amostras *spot*, segundo Oliveira et al. (2001). A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da proposição de 24,05 mg/Kg de peso vivo (PV) (CHIZZOTTI, 2004). Dessa forma, com a excreção média diária de creatinina e a concentração de creatinina (mg/dL) na amostra *spot* de urina, foi estimado o volume total diário de urina, em litros por vaca/dia, para o cálculo do balanço de nitrogênio.

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

O nitrogênio total das amostras de urina e leite foi determinado de acordo com as metodologias descritas pela AOAC (1990), onde a quantidade em gramas de nitrogênio para cada 100 mL de urina ou leite foi obtido dividindo-se o valor de proteína bruta das amostras pelo fator 6,25 para as amostras de urina e do fator 6,38 para as amostras de leite.

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

5.7 FERMENTAÇÃO RUMINAL

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

As amostras foram centrifugadas a 2000 x g por 15 minutos, 1 mL do sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio e adicionando-se 0,2 mL de ácido fórmico P.A., arrolhado, identificado e armazenado a -20°C para determinação de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC). Da mesma amostra 2 mL do sobrenadante foi pipetado e armazenado em tubos de ensaio contendo 1 mL de ácido sulfúrico a 1 N, para posterior determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃).

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

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

As determinações foram realizadas injetando-se 1 µl de amostra em cromatógrafo integrado a computador, que processava os cálculos de quantificação, utilizando-se do software BORWIN versão 1.21 para cromatografia.

O nitrogênio amoniacal (N-NH_3) foi determinado pelo método de ácido salicílico. Foram adicionados a microplacas contendo amostras de líquido ruminal e ácido sulfúrico a 1 Normal 0,250 μL de tungstato de sódio a 10%, e posteriormente as amostras foram centrifugadas a 1200 x g durante 15 minutos. Em seguida foram pipetados 5 μL do sobrenadante a uma microplaca e nesta adicionados 100 μL do reagente tamponante (fenol) e 100 μL de hipoclorito.

As microplacas foram agitadas para homogeneização das amostras e colocados em banho maria a 37°C durante 5 minutos adquirindo coloração verde. Após resfriamento as amostras foram analisadas em leitora de microplacas ASYS quanto a sua absorbância e os resultados obtidos foram utilizados em equação de regressão para calcular a concentração de N-NH_3 .

5.8 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

As análises para determinação da síntese de proteína microbiana foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do VNP-FMVZ-USP. As amostras utilizadas para análise de alantoína no leite foram coletadas de dois dias alternados, sendo provenientes das duas ordenhas diárias. Uma alíquota de 10 mL de leite foi diluída com 5 mL de ácido tricloroacético a 25%, sendo filtrada em papel-filtro e congelada para posterior determinação dos níveis de alantoína no leite desproteinizado.

Alíquotas de 50 mL de urina (amostra *spot*) foram obtidas de todas as vacas no 16º dia do período experimental, aproximadamente 4 horas após a alimentação, durante micção estimulada por massagem na vulva. A urina foi filtrada e alíquotas de 10 mL foram diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico. Os níveis de alantoína na urina e no leite e de ácido úrico na urina foram determinados pelo método colorimétrico, conforme metodologia de Fujihara, Ørskov e Reeds¹ (1987) apud Chen e Gomes (1992, p. 9 e 15). O volume urinário foi calculado de acordo com a metodologia descrita no item 5.6 (balanço de nitrogênio).

¹FUJIHARA, T.; ØRSKOV, E. R.; REEDS, P. J. The effect of protein infusion on urinary excretion of purine derivatives in ruminants nourished by intragastric nutrition. **Journal Agriculture Science**, v. 109, p. 7-12, 1987.

A excreção total de derivados de purinas foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretadas na urina e da quantidade de alantoína excretada no leite, expressas em mmol/dia. As purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de derivados de purinas (DP, mmol/dia), por meio da equação $Pabs = (0,512 \cdot PV^{0,75}) / 0,70$, em que 0,70 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purina e $0,512 \cdot PV^{0,75}$, a excreção endógena de derivados de purinas segundo González-Ronquillo, Balcells e Guada (2003).

A síntese ruminal de compostos nitrogenados (Nmic, gN/dia) foi calculada com base nas purinas absorvidas (Pabs, mmol/dia), utilizando-se a equação (CHEN; GOMES, 1992): $Nmic = (70 \cdot Pabs) / (0,83 \cdot 0,134 \cdot 1.000)$, em que 70 é o conteúdo de N nas purinas (mgN/mol); 0,134, a relação N purina: N total nas bactérias (VALADARES; BRODERICK; VALADARES FILHO, 1999); e 0,83, a digestibilidade intestinal das purinas microbianas.

5.9 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, as 6:30 e as 15:30 horas, sendo a produção de leite pesada e registrada diariamente durante todo o período experimental. A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura (PLC) segundo fórmula de Sklan et al. (1992), onde $PLC = (0,432 + 0,1625 \cdot \text{teor de gordura do leite}) \cdot \text{Kg de leite}$. Foi determinado o teor de proteína e lactose do leite, utilizando-se de analisador ultrassônico de leite (Lactosacan[®])

As amostras utilizadas para análise da composição do leite foram obtidas no 16º de cada período experimental, sendo cada amostra proveniente das duas ordenhas diárias. Para a determinação da gordura no leite foram utilizadas amostras a fresco, segundo a metodologia de Gerber no Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal do VNP-FMVZ-USP. Para determinação da ureia e nitrogênio uréico no leite, as amostras de leite foram desproteinizadas da mesma forma que as amostras utilizadas na análise da alantoína. As análises da concentração de ureia no leite desproteinizado foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, por meio de kits comerciais (Laborlab[®]) em aparelho semi-automático de bioquímica SBA-200 da CELM[®].

5.10 TAXA DE PASSAGEM DE LÍQUIDO E DINÂMICA RUMINAL

A determinação dos pools e fluxo de nutrientes foi estimada a partir da concentração do indicador interno fibra em detergente neutro indigestível (FDNi). Para obtenção do teor de FDNi nas amostras, utilizou-se amostras pré-seca, de alimentos, sobras, rúmen, abomaso e fezes, as quais foram acondicionadas em sacos de tecido não-tecido (TNT 100g/m²), com dimensões de 4 x 5 cm, segundo a relação de 20 mg de matéria seca por centímetro quadrado de superfície (NOCEK, 1988). As amostras foram incubadas por 288 horas no rúmen de dois novilhos da raça Nelore, previamente adaptados com concentrado a base de farelo de soja e milho moído e volumoso a base de silagem de milho, de acordo com a metodologia descrita por Casali et al. (2008).

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

A taxa de renovação ruminal, taxa de passagem pelo rúmen, e a taxa de digestão ruminal de cada componente foi calculada de acordo com Oba e Allen (2003). Durante a retirada do conteúdo ruminal, alíquotas de 10% da digesta foram separadas para permitir uma amostragem mais acurada e representativa. As alíquotas foram filtradas em peneira de pano dessorador com 1,0 mm de porosidade para separação do conteúdo sólido do líquido para determinação do tamanho médio de partícula. As frações de amostras do conteúdo ruminal, e abomaso nas fases sólida e líquida, foram pré-secados e corrigidos para matéria seca original, e acondicionadas em congelador à -20 °C, até a realização das análises (HAVERTINE; ALLEN, 2006b).

A determinação do volume líquido e da taxa de passagem de líquidos pelo rúmen foi realizada com a utilização do marcador polietilenoglicol (PEG) de peso molecular 4.000 (PEG 4.000). As 8 h do 18º dia foram introduzidas, através da cânula ruminal, 100 g de PEG

(carbowax 4.000, marca Synth) previamente diluídos em 400 ml de água, misturando-se em seguida o indicador com conteúdo ruminal manualmente. Amostras de conteúdo para determinação das concentrações de PEG foram tomadas no momento da alimentação (0h) e as 1, 2, 4, 8 e 24 horas após a alimentação. A amostra referente ao tempo zero foi coletada antes da introdução do PEG, sendo a água e a refeição da manhã fornecidas imediatamente após a primeira coleta, ou seja, as 8 h. O líquido ruminal foi centrifugado por 10 minutos a 2000 G e o sobrenadante armazenado sob refrigeração até a realização das análises. A determinação da concentração de PEG foi realizada segundo o método preconizado por Hyden (1956). A taxa de passagem de líquido ou taxa eferente de fluxo, em porcentagem por hora, foi calculada por intermédio da regressão linear do logaritmo natural da concentração do PEG 4.000, em função do tempo.

5.11 BIOHIDROGENAÇÃO RUMINAL E FLUXO ABOMASAL DE ÁCIDOS GRAXOS

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

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

As amostras de silagem e sobras foram moídas em moinho (MARCONI®) com nitrogênio líquido a -192,0º C em peneira de crivo de 5 mm, e as subamostras em forma de

cristal de gelo encaminhadas para serem liofilizadas (TERRONI[®]) para análise da concentração de matéria seca (MS). As amostras de silagem e sobras, foram novamente moídas em moinho com peneira de crivo de 1 mm. Amostras dos sais de cálcio de ácidos graxos (MEGALAC-E[®]) foi moída também com utilização de nitrogênio líquido em moinho de crivo com peneira de 1 mm para evitar aquecimento e oxidação dos ácidos graxos. Os demais ingredientes farelo de soja, grão de soja e milho foram moídos em moinho com peneira de crivo de 1 mm.

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

A concentração de todos os nutrientes foi expressa em porcentagem da MS após serem secas em estufa de 105°C. A fibra em detergente neutro indigestível (FDNi) foi determinada após 288 horas no rúmen de vacas holandesas adaptadas com dieta de relação volumoso:concentrado 60:30 utilizando-se a silagem de milho como volumoso. As amostras foram acondicionadas em sacos de tecido TNT com malha de 50 µ, em um volume de no máximo 25mg/cm² (NOCEK, 1988). O pool ruminal (kg) de nutrientes foi determinado multiplicando a concentração de cada nutriente da digesta ruminal pela massa ruminal de MS em kg.

As taxas de biohidrogenação foram calculadas por meio do modelo de Jenkins e Bridges (2007), que leva em consideração somente o desaparecimento dos ácidos graxos consumidos e que aparecem no fluxo abomasal calculado de acordo com a seguinte fórmula: Biohidrogenação de ácidos graxos poliinsaturados (BAGPI) = 100 * (AGPI_{inicial} – AGPI_{final})/ AGPI_{inicial} sendo: Ácidos graxos poliinsaturados no início do processo (AGPI_{inicial}) = Consumo de AGPI (g) no início da incubação; e Ácidos graxos poliinsaturados no final do processo AGPI_{final} = fluxo duodenal ou abomasal de AGPI (g).

5.12 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE

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

A extração da gordura dos alimentos foi realizada de acordo com o método de Folch, Lees e Sloane Stanley (1957) e de metilação realizada de acordo com Kramer, Fellner e Dugan (1997). Os lipídeos foram extraídos por homogeneização da amostra com uma solução de clorofórmio e metanol 2:1. Em seguida os lipídeos foram isolados após a adição de solução de NaCl a 1,5%.

Os ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (GC Shimatzu 2010, com injeção automática), usando coluna capilar SP-2560 (100 m × 0,25 mm de diâmetro com 0,02 mm de espessura, Supelco, Bellefonte, PA). A temperatura inicial foi de 70 °C por 4 minutos (13° C/minuto) até chegar a 175 °C, mantendo por 27 minutos. Depois, um novo aumento de 4 °C/minuto, foi iniciado até 215 °C, mantendo durante 31 minutos. Hidrogênio (H₂) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 40 cm/s. Durante o processo de identificação foram utilizados quatro padrões: standard C4-C24 de ácidos graxos (Supelco[®] TM 37), ácido vacênico C18:1 *trans*-11 (V038-1G, Sigma[®]), C18 CLA:2 *trans*-10, *cis*-12 (UC-61M 100mg), CLA e C18:2 *cis*-9, *trans*-11 (UC-60M 100mg), (NU-CHEK-PREP EUA[®]) para identificação dos ácidos graxos que são formados durante a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados.

5.13 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

Coletas de sangue foram realizadas no 19º dia de cada período experimental por punção da veia e/ou artéria coccígea, anteriormente ao fornecimento das rações no período da

manhã. As amostras foram coletadas em tubos vacuolizados (*vacutainer*) de 10 mL para avaliação das concentrações séricas glicose, colesterol total, colesterol-HDL, proteínas totais, albumina, uréia e nitrogênio uréico, as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GGT), no soro, e tubos contendo fluoreto de sódio para dosagem de glicose.

Imediatamente após coleta as amostras foram coletadas refrigeradas e centrifugadas a 2000 G durante 15 minutos, para a separação do soro. O centrifugado obtido foi transferido para tubetes plásticos, identificados e armazenados a -20 °C, até o procedimento das análises laboratoriais.

As análises das concentrações dos parâmetros sanguíneos foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, por meio de kits comerciais (Laborlab[®]) em aparelho de espectrofotômetro de bioquímica semi-automático (SBA 200 da CELM[®]).

5.14 AVALIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E PESO CORPORAL

O escore de condição corporal (ECC) e o peso corporal foram avaliados no sétimo dia de adaptação e no último dia de cada período experimental, para avaliação da variação de peso. O peso dos animais foi correspondente à média de duas pesagens sucessivas, feitas antes do fornecimento das alimentações e após as ordenhas da manhã. Para o cálculo da variação de ECC e de peso corporal, foram considerados os pesos do sétimo dia de adaptação e do final de cada período experimental. As mensurações do ECC foram realizadas segundo metodologia proposta por Edmonson et al. (1989).

5.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

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

$$Y_{ijkl} = \mu + A_j(Q_i) + P_k + T_l + Q_j + e_{ijkl}$$

Onde: Y_{ijk} = variável dependente, μ = média geral, $A_i(Q_j)$ = efeito aleatório de animal dentro do quadrado ($i = 1$ a 8), P_k = efeito fixo de período ($k = 1$ a 4), Tl = efeito fixo de tratamento ($l = 1$ a 4), Q_j = efeito fixo de quadrado e e_{ijk} = erro.

Para avaliação dos efeitos de tratamentos foram considerados os contrastes ortogonais: C1= controle vs fontes lipídicas (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos insaturados); C2= óleo de soja vs sais de cálcio e grão de soja; esse contraste foi montado para comparar uma fonte de ácidos graxos não complexados (óleo de soja) com as duas formas de ácidos graxos complexados; C3= grão de soja vs sais de cálcio. O objetivo de C3 foi comparar as duas formas de proteção dos ácidos graxos insaturados. O método de Kenward-Rogers foi usado para correção os graus de liberdade do teste F.

As variáveis avaliadas na fermentação ruminal (pH e concentrações de N-NH₃, Acetato, Propionato, Butirato e AGCC) foram analisadas como medidas repetidas no tempo, no PROC MIXED do SAS 9.0. A metodologia de Akaike foi utilizada para determinar a matriz de covariância a ser utilizada. Todas as dietas foram confrontadas dentro de cada tempo através da opção PDIF (Perceptual Diff) com as médias obtidas por meio do LSMEANS (Least Squares Means). O nível de significância adotado em todas as análises foi de 5%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 CONSUMO E DIGESTIBILIDADE APARENTE TOTAL

Os resultados referentes ao consumo de matéria seca e nutrientes, de acordo com as dietas experimentais, podem ser observados na (Tabela 4). Observou-se efeito para o C1 ($P<0,05$) no consumo de matéria seca e matéria orgânica, de forma que os animais submetidos às dietas com fontes lipídicas apresentaram menor consumo de matéria seca e matéria orgânica do que os animais submetidos à dieta controle. De forma semelhante, os animais alimentados com dietas suplementadas com fontes lipídicas apresentaram menor ($P<0,05$) consumo de PB, FDN e CNF do que os animais submetidos à dieta controle, resultados estes esperados, pois os animais submetidos a estas dietas apresentaram menor consumo de matéria seca, com níveis de PB, CNF e FDN semelhantes entre as dietas experimentais.

Foi observado efeito para o C1 ($P<0,05$) no consumo de extrato etéreo, onde os animais submetidos às dietas com fonte lipídicas apresentaram maior consumo de extrato etéreo do que os animais submetidos à dieta controle, em decorrência do teor de extrato etéreo das dietas suplementadas com fontes lipídicas. Não foi observado efeito das dietas experimentais sobre o consumo de NDT e energia líquida de lactação.

Allen (2000) em uma revisão de literatura avaliou vários experimentos que utilizaram rações contendo diferentes fontes de lipídeos para vacas em lactação (PALMQUIST; JENKINS 1980; CASPER et al. 1990; SHAUFF et al., 1992), e observou que na maioria dos estudos houve redução no consumo de matéria seca, quando lipídeos foram adicionados às dietas. O autor também cita que o grau de insaturação tem efeito na depressão do consumo (MOALLEM et al., 2007) sendo que estes ácidos graxos com maiores números insaturações levam a maior depressão, e isto pode estar relacionado com o possível efeito nos microrganismos ruminais, levando a uma menor digestibilidade ruminal da fibra como ocorreu no presente estudo.

Embora existam estudos sobre o uso de fontes lipídicas nas dietas de vacas em lactação, os mecanismos pelo qual sua suplementação influencia o consumo ainda não estão devidamente elucidados, mas há fortes evidências de que o efeito destes sobre a fermentação ruminal, motilidade intestinal, aceitabilidade da dieta com suplemento, liberação de hormônios intestinais, mecanismos regulatórios que controlam a ingestão de alimentos e a

capacidade limitada dos ruminantes de oxidar os ácidos graxos sejam as principais razões da inibição de consumo (ALLEN, 2000).

Tabela 4 – Consumo e coeficientes de digestibilidade aparente total em vacas alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas

Parâmetros	Rações experimentais ¹				EPM	<i>P</i> ²		
	C	OS	GS	SC		C1	C2	C3
<i>Consumo kg/dia</i>								
Matéria seca	21,87	19,55	20,03	19,52	0,80	0,032	0,822	0,662
Matéria orgânica	20,27	18,13	18,60	18,05	0,74	0,033	0,832	0,614
Proteína bruta	2,76	2,45	2,43	2,54	0,09	0,019	0,780	0,441
Extrato etéreo	0,61	1,03	1,00	1,09	0,05	0,001	0,713	0,166
Fibra detergente neutro	7,91	6,95	7,31	6,88	0,31	0,044	0,739	0,394
CNF	10,26	8,68	9,03	8,67	0,35	0,001	0,669	0,439
NDT	15,99	14,70	15,01	14,91	0,59	0,118	0,779	0,803
<i>Mcal/dia</i>								
EL _L	41,11	39,10	40,66	38,64	1,43	0,343	0,629	0,193
<i>Coeficiente de Digestibilidade %</i>								
Matéria seca	69,22	65,15	64,11	66,07	1,52	0,071	0,740	0,520
Matéria orgânica	71,47	68,21	66,97	68,32	1,41	0,084	0,966	0,550
Proteína bruta	79,83	77,59	75,91	77,09	1,55	0,111	0,543	0,443
Extrato etéreo	92,18	95,00	93,76	94,48	0,53	0,017	0,294	0,641
Fibra detergente neutro	56,78	52,56	53,78	52,89	0,87	0,052	0,504	0,108
CNF	87,89	87,25	85,47	85,81	0,77	0,112	0,288	0,347
NDTobs	77,61	78,21	76,39	77,67	0,48	0,807	0,073	0,585
<i>Consumo % PV</i>								
Matéria seca	3,61	3,25	3,31	3,26	0,11	0,043	0,819	0,810
Fibra detergente neutro	1,33	1,17	1,20	1,15	0,05	0,039	0,727	0,354

¹Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SC), (Megalac-E®). C1= controle vs fontes de lipídeos (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja vs sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja vs sais de cálcio. ²Erro padrão da média

A colecistoquinina (CCK) é um hormônio gastro intestinal que estimula a contração da vesícula biliar do pâncreas, nos processos de digestão de lipídeos, e esta intimamente relacionada com a contração do trato digestivo. A CCK tem ação direta nos centros de saciedade no cérebro e também inibe o esvaziamento gástrico ao aumentar a contração do esfíncter pilórico, impedindo o refluxo gastro-duodenal (RECCE, 2007).

Choi e Palmquist (1996), observaram aumentos nas concentrações plasmática de CCK quando vacas de leite foram suplementadas com diferentes fontes de lipídeos. Reidelberg (1994) sugeriram que a ação periférica da CCK no intestino inclui inibição do esvaziamento e distensão gástrica e ativação de neurônios eferentes que atuam no centro de saciedade.

Bremmer et al. (1998) infundiram no abomaso de vacas de leite diferentes fontes de lipídeos, incluindo saturados e insaturados, e observaram diminuição no CMS, PB e FDN, de maneira semelhantes aos dados observados no presente estudo. Demonstrando assim que o efeito em deprimir o consumo de matéria seca pode também estar associado a liberação de hormônios como a CCK.

Scharrer e Langhans (1986) propuseram que a taxa de oxidação hepática dos ácidos graxos altera os sinais gerados pelo nervo vago eferente no fígado, nos centros cerebrais de sinalização de saciedade.

Nos trabalhos realizados com lipídeos no nosso grupo de pesquisa (BARLETTA, 2010; FREITAS JUNIOR et al., 2010; GANDRA, 2010; RENNÓ et al., 2014) observamos redução do consumo de matéria seca, que demonstra consistência dos dados, e assim, fica evidente o efeito de fontes de lipídeos no consumo de nutrientes. Os fatores envolvidos como descrito acima são vários, mais podemos destacar o efeito na digestibilidade da fibra que foi verificado no estudo, e fatores metabólicos como descritos na literatura.

Diferenças na aceitabilidade de fontes de lipídeos podem contribuir para seus efeitos no CMS, no presente estudo no período de adaptação era visível a dificuldade de alguns animais em se adaptar à dieta com sais de cálcio, geralmente estes animais tinham uma grande diminuição de consumo que se estabelecia por volta do oitavo dia do período experimental. Alguns resultados de literatura como o estudo de Moallem et al. (2007) observaram menor consumo para vacas suplementadas com sais de cálcio de ácidos graxos em relação a outras fontes de lipídeos, entretanto no presente estudo não foi observada diferença entre as fontes de lipídeos utilizadas.

Quando são avaliadas diferentes fontes de lipídeos nas dietas de vacas leiteiras, diferentes respostas são esperadas, estando relacionadas, ao tipo e nível de inclusão do suplemento na dieta. Para dietas contendo de 5 a 6% de extrato etéreo na matéria seca, segundo o NRC (2001), a adição de óleo de sementes e ácidos graxos parcialmente hidrogenados reduz o consumo, entretanto quando se utiliza semente de oleaginosas como o grão de soja, esta redução no consumo pode não ser observada.

Mielke e Shingoethe (1981) avaliaram dietas com farelo de soja, grão de soja cru e grão de soja tostado na alimentação de vacas primíparas em início de lactação e foi utilizada silagem de milho como maior parte do volumoso, associada a feno de alfafa, a quantidade de grão de soja consumida foi de 2,19 e 2,14 Kg/vaca/dia e não foi observado efeito entre as dietas utilizadas no consumo de matéria seca e de proteína bruta.

Os resultados de digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes podem ser observados na (Tabela 4). Não foi observado efeito ($P>0,05$) na digestibilidade aparente total da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, carboidratos não fibrosos e nos valores de nutrientes digestíveis totais observados para as dietas experimentais. A adição de lipídeos nas dietas aumentou ($P<0,05$) o coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo.

Foi observado efeito ($P=0,052$) C1 no coeficiente de digestibilidade da FDN, onde os animais submetidos às dietas com fontes de lipídeos apresentaram resultados inferiores, demonstrando que as fontes de lipídios afetaram negativamente a digestibilidade da fibra. Podemos verificar que houve uma tendência no C 3 ($P=0,108$) para digestibilidade da FDN, demonstrando que o uso de fontes de lipídios como sementes de oleaginosas pode ter menor efeito sobre a digestibilidade ruminal da fibra, pois teria uma lenta liberação dos lipídeos no rúmen, e também a forma de proteção utilizada como sabões de cálcio pode não estar sendo eficiente.

Também é interessante ressaltar que houve uma tendência em C1 ($P=0,071$) para o coeficiente de digestibilidade de MS e ($P=0,084$) para MO, demonstrando o efeito negativo das fontes de lipídios na digestibilidade dos nutrientes.

Alguns autores têm observado redução na digestibilidade da fibra quando fontes lipídicas são adicionadas às dietas, e a magnitude desta redução está relacionada não só à quantidade, mas principalmente ao tipo de ácido graxo presente no suplemento, sendo que lipídios ricos em ácidos graxos insaturados tendem a provocar maior depressão na digestibilidade (DOREAU; CHILLIARD, 1997; LEITE, 2006). Entretanto, quando esta fonte de lipídeo é fornecida na forma de semente de oleaginosas estes efeitos na digestibilidade podem ser amenizados ou mesmo não existir devido a lenta liberação dos ácidos graxos no ambiente ruminal, entretanto como podemos observar no presente estudos mesmo à dieta com grão de soja apresentou redução numérica na digestibilidade da fibra.

Os ácidos graxos poliinsaturados, altamente presentes em fontes lipídicas usadas na alimentação de ruminantes, possuem efeitos tóxicos às bactérias celulolíticas conforme Maia et al. (2007). Esses autores sugerem que a toxicidade é mais pronunciada quando a fonte lipídica possui maior número de insaturações. Dessa maneira, suplementos lipídicos podem interferir de forma negativa sobre o coeficiente de digestibilidade da FDN, através da depressão na população de bactérias celulolíticas. Espera-se portanto, que fontes parcialmente inertes (gordura protegida) sejam menos prejudiciais à digestibilidade da fibra e ao consumo, o que não foi verificado no presente estudo, já que as fontes lipídicas protegidas também reduziram a digestibilidade da FDN.

Havartine e Allen (2006c) avaliaram o efeito da suplementação de ácidos graxos saturados, insaturados e a mistura de ambos nas dietas de vacas leiteiras sobre a digestibilidade aparente total dos nutrientes. As rações continham cerca de 8,3% de ácidos graxos na matéria seca. Estes autores não observaram efeito das fontes de ácidos graxos sobre a digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, fibra em detergente neutro, e amido.

Trabalhos que avaliaram a inclusão de lipídeos nas dietas (WU et al., 1994; HARVATINE; ALLEN 2006c; BARLETTA, 2010) não observaram alteração na digestibilidade da FDN, quando a concentração deste na dieta foi baixa ou a relação concentrado:volumoso foi elevada, especialmente em animais de maior produção de leite, CMS, e consequentemente maior taxa de passagem. Desta forma, os ácidos graxos ficariam menor tempo no rúmen, podendo assim ter menos efeito tóxico sobre os microrganismos ruminais, além das consequências da inibição dos microrganismos celulolíticos serem amenizadas pela menor inclusão de FDN nas dietas.

Teoricamente, o uso de grão de soja proporcionaria menor efeito a digestibilidade de nutrientes por proporcionar lenta liberação de lipídios no rúmen, não superando a capacidade de hidrogenação dos microrganismos ruminais e impedindo uma possível perda de digestibilidade de fibra pelo efeito negativo que ácidos graxos insaturados prontamente disponíveis no rúmen podem causar nas bactérias fibrolíticas (COPPOCK; WILKS, 1991; PALMQUIST, 1991).

Analisando os resultados do presente estudo e da literatura, podemos observar que existem interações dos resultados obtidos na avaliação da digestibilidade dos nutrientes entre a fonte lipídica e nível de fornecimento, bem como do volumoso utilizado e das características das vacas, como o nível de produção de leite e fase de lactação.

6.2 FERMENTAÇÃO RUMINAL

Os dados referentes à fermentação ruminal estão descritos na tabela 5. Com relação aos valores de pH ruminal foi observado efeito em C1 ($P<0,05$) sendo que os animais submetidos às dietas com fontes de lipídeos apresentaram valores maiores em relação a dieta controle. Também foi observado efeito ($P<0,05$) em C2, onde às dietas com grão de soja e SC apresentaram valores superiores ao encontrado na dieta com óleo de soja, em C3 também foi verificado efeito ($P<0,05$) entre às dietas sendo que os SC promoveram maiores valores de

pH ruminal. Podemos observar que os valores de pH ruminal encontrados no presente estudo estão próximos às médias consideradas normais, de 5,9 a 7,0, para otimização da taxa de digestão ruminal e da degradação da parede celular da fibra sugeridas por Furlan et al. (2006). Podemos verificar que os animais submetidos à dieta com SC apresentaram valores mais elevados, seguido dos animais suplementados com OS.

Quando são fornecidas dietas com ácidos graxos livres no rúmen como o óleo de soja, ou produtos com alguma forma de proteção que não sejam tão resistentes à bio-hidrogenação ruminal, podem existir maiores concentrações de C18:2 livres no rúmen, otimizando assim o processo de bio-hidrogenação ruminal, promovendo desta forma maior eficiência de aproveitamento do hidrogênio livre (H^+) no rúmen para hidrogenação de AG resultando em maiores valores de pH ruminal (CHILLIARD et al., 2007). Os resultados encontrados na (Tabela 15), indicam que os ácidos graxos presentes nas dietas sofreram altas taxas de bio-hidrogenação ruminal, também como podemos observar na (Tabela 2) de composição das dietas, as dietas com fontes lipídicas apresentam menores teores de CNF, tendo assim menores proporções de carboidratos rapidamente fermentáveis no ambiente ruminal, o que pode assim explicar estes maiores valores de pH ruminal nos animais submetidos a estas dietas.

Tabela 5 – Parâmetros ruminais de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes fontes lipídicas

Item	Dietas experimentais ¹				EPM	P ²				
	C	OS	GS	SC		Tempo	I. D*T	C1	C2	C3
pH	6,01	6,03	5,97	6,28	0,07	<0,001	0,281	0,037	0,023	<0,001
N-NH ₃ mg/dL	21,41	22,20	21,46	22,97	0,47	0,001	0,930	0,451	0,988	0,246
<i>mMol</i>										
Total AGCC ³	183,52	186,88	182,87	176,74	2,28	<0,001	0,756	0,726	0,085	0,199
Acetato	121,15	121,02	119,20	117,38	1,47	<0,001	0,792	0,448	0,315	0,564
Propionato	35,41	39,96	37,33	34,41	0,57	<0,001	0,954	0,053	<0,001	0,012
Butirato	18,39	17,15	17,15	16,70	0,28	0,001	0,458	0,005	0,661	0,466
<i>Total AGCC, %</i>										
Acetato	65,96	64,86	65,33	66,46	0,13	0,005	0,984	0,106	<0,001	<0,001
Propionato	19,29	21,38	20,32	19,35	0,14	<0,001	0,999	<0,001	<0,001	0,002
Butirato	10,04	9,11	9,31	9,45	0,08	<0,001	0,2446	<0,001	0,542	0,946
C2:C3	3,45	3,08	3,25	3,45	0,02	<0,001	1,000	<0,001	<0,001	0,002

¹Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SC) (Megalac-E®).

²Probabilidades: I. T*T=interação Dieta*Tempo; C1= controle vs fontes de lipídeos (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja vs sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja vs sais de cálcio. ³Erro padrão da média. ³Ácidos graxos de cadeia curta.

O horário da coleta influenciou ($P < 0,05$) todas as variáveis ruminais avaliadas (Figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7). Esse comportamento já é esperado visto que quando ocorre o aumento do consumo de alimentos após o tempo zero de coleta, ocorre simultaneamente o aumento da fermentação ruminal pela maior disponibilidade de substrato usado para a fermentação ruminal, causando dessa forma redução dos valores de pH.

Não foi observado efeito das dietas experimentais para as concentrações de N-NH_3 em mg/dL entre as dietas experimentais. Foi observado efeito de tempos nas concentrações de N-NH_3 , onde ocorre um aumento das concentrações de nitrogênio amoniacal com o passar das horas após alimentação. Este aumento é esperado devido ao consumo de proteína bruta em relação ao tempo zero, levando assim a uma maior disponibilidade de nitrogênio advindo da dieta.

Não houve efeito ($P > 0,05$) das fontes de lipídeos sobre as concentrações de total ácidos graxos de cadeia curta e acetato em concentração molar (mMol).

Figura 2 - pH ruminal em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas

Figura 3 - Concentrações ruminiais de N-NH₃ em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas

Figura 4 - Concentrações ruminiais de ácidos graxos de cadeia curta em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas

Figura 5 - Concentrações ruminiais de acetato em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas

Figura 6 - Concentrações ruminiais de propionato em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas

Figura 7 - Concentrações ruminais de butirato em diferentes tempos após o fornecimento da alimentação matinal de vacas da raça Holandesa, alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas

Foi observado efeito ($P<0,05$) para a concentração molar de propionato em C1, com maiores valores para os animais suplementados com lipídeos. Também observamos efeito em C2 ($P<0,05$), com maiores concentrações para os animais suplementados com óleo de soja, e em C3 ($P<0,05$), sendo observadas maiores concentrações para os animais suplementados com grão de soja em relação aos animais submetidos à dieta com SC. Estes aumentos das concentrações de propionato são esperados nas dietas contendo fontes de lipídeos.

Com relação a concentração molar de butirato foi observado efeito em C1 ($P<0,05$) na concentração molar, com maiores valores para os animais suplementados com a dieta controle em relação às dietas com fontes de lipídeos, em virtude do consumo de matéria seca, que foi menor para os animais suplementados com fontes lipídicas.

Foi observado efeito ($P<0,05$) no C2 para proporção molar de acetato com menores proporções para os animais suplementados com óleo, e em C3 sendo que os animais suplementados com SC apresentaram maiores proporções que os animais da dieta GS.

A proporção molar de propionato aumentou ($P<0,05$) nos animais alimentados com fontes lipídicas, foi reduzida ($P<0,05$) nos animais submetidos às dietas com fontes de lipídeos protegidas, e foi maior ($P<0,05$) nos animais alimentados com GS do que nos alimentados com SC.

Também foi observado efeito ($P<0,05$) na proporção molar de butirato para o C1 com menores proporções para os animais suplementados com lipídeos com relação à dieta

controle. Com relação aos dados da relação acetato/propionato foi observado efeito ($P<0,05$) em C1, sendo encontrado menor relação para os animais suplementados com lipídeos, em C2 ($P<0,05$) onde a dieta com OS apresentou menor relação quando comparada com GS+SC, e em C3 sendo observada menor relação dos animais alimentados com GS em relação aos alimentados com SC.

Keele, Roffler e Beyers (1989) relataram que evidências circunstanciais indicam que o aumento da concentração do ácido propiônico ruminal e o decréscimo em ácido butírico ruminal com o aumento da ingestão de ácidos graxos de cadeia longa podem estar associados a alteração na população de microrganismos no rúmen.

Bateman e Jenkins (1998) determinaram os efeitos da adição de óleo de soja em dietas de alta fibra sobre a fermentação ruminal e as concentrações de lipídios no rúmen. A adição de níveis crescentes de óleo de soja reduziu a concentração total de ácidos graxos voláteis. Além disso, a adição de óleo de soja nas dietas resultou em reduções lineares em proporções molares de acetato e aumentos lineares em proporções molares de propionato, semelhantes aos dados obtidos com as fontes de lipídeos utilizadas no presente estudo. Portanto, a relação acetato:propionato reduziu linearmente quando OS foi adicionado às dietas, indicando que o óleo afeta a fermentação ruminal da fibra. Esse mesmo efeito ocorreu nas dietas com fontes lipídicas neste estudo, em que a relação acetato:propionato foi menor em relação ao controle, em decorrência da redução observada na digestibilidade da FDN nas dietas com lipídeos.

De acordo com Fuentes et al. (2009), a alteração na fermentação ruminal em resposta a suplementação lipídica em dietas de vacas leiteiras pode ser explicada por alteração na digestibilidade da matéria orgânica e da fibra, como foi observado no presente estudo, onde os animais suplementados com as fontes lipídicas tiveram menor digestibilidade da FDN, pelo possível efeito dos lipídeos em inibir bactérias celulolíticas, o que leva também a alterações nas concentrações dos AGCC, levando a um aumento das concentrações de propionato e redução da relação acetato/propionato, como foi observado neste trabalho, demonstrando o efeito destas fontes lipídicas na fermentação ruminal.

6.3 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

Não houve diferença ($P>0,05$) nas excreções diárias em mmol/L e mmol/dia de alantoína e ácido úrico na urina e para a excreção diária de urina, para as dietas experimentais

(Tabela 6). Houve efeito ($P < 0,05$) em C1 nas excreções diárias em mmol/L e mmol/dia de alantoína no leite. Não houve diferença nas concentrações ($P > 0,05$) das purinas totais, derivados de purinas e purinas absorvíveis em mmol/dia, e também não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) para a síntese de proteína microbiana e para a eficiência de síntese microbiana entre as dietas experimentais (Tabela 6). Estes resultados mostram que a utilização de fontes de lipídeos na dieta não influenciou a síntese de proteína microbiana.

Tabela 6 – Síntese de proteína microbiana de vacas holandesas suplementadas com diferentes fontes de lipídeos

Item ³	Dietas experimentais ¹				EPM ²	P ²		
	C	OS	GS	SC		C1	C2	C3
	<i>mmol/l</i>							
Al- leite	0,06	0,05	0,04	0,05	0,03	0,046	0,333	0,265
Al- urina	9,28	6,65	9,21	7,75	0,57	0,229	0,142	0,306
Ác. Urico	3,29	4,84	5,92	4,93	0,45	0,063	0,570	0,404
	<i>mmol/dia</i>							
Al- leite	0,91	0,71	0,56	0,70	0,06	0,036	0,514	0,334
Al- urina	101,80	77,48	87,07	69,96	7,43	0,101	0,943	0,320
Ác. Urico	34,33	45,84	48,03	41,77	3,55	0,189	0,913	0,532
Pt	137,04	124,04	135,68	112,44	4,98	0,129	0,998	0,092
Dp	28,78	28,60	28,68	28,52	0,42	0,288	0,997	0,463
Pabs	124,72	125,43	133,83	126,70	6,11	0,961	0,990	0,103
	<i>g/dia</i>							
N mic	163,10	181,53	161,82	162,25	3,84	0,961	0,444	0,223
Pb mic	1031,87	1127,77	1018,75	1020,30	24,03	0,961	0,245	0,765
	<i>g Pbmic/kg NDT</i>							
Eficiência	64,53	76,71	67,87	68,41	1,79	0,507	0,174	0,897
	<i>l/dia</i>							
Urina	11,41	11,94	9,15	9,07	0,74	0,414	0,115	0,966

¹Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SC), (Megalac-E®), C1= controle vs fontes de lipídeos (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja vs sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja vs sais de cálcio, ²Erro padrão da média, ³Alantoína (Al); Ácido (Ác); Proteínas Totais (PT); Derivados de Purinas (DP); Purinas Absorvíveis (Pabs); Nitrogênio Microbiano (N mic); Proteína Bruta Microbiana (Pb mic).

A suplementação de sementes de oleaginosas com elevado teor de extrato etéreo reduz a quantidade de carboidratos rapidamente fermentáveis, podendo reduzir a quantidade de substrato disponível para a síntese de proteína microbiana. Entretanto, alguns estudos encontrados na literatura não demonstram tais resultados. Freitas Júnior et al. (2010) avaliaram a excreção dos derivados de purina, nitrogênio microbiano total e proteína microbiana em dietas com a inclusão de grão de soja, óleo de soja e sais de cálcio de ácidos graxos nas rações e não encontraram diferença entre as dietas suplementadas e a dieta

controle. Os valores observados pelos autores são semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Vasconcelos et al. (2010), trabalhando com vacas leiteiras de alta produção alimentadas com grão de soja crua encontraram médias de purinas totais e absorvíveis de (462,13 e 393,37 Mmol/dia) e nitrogênio microbiano de 283,55 g/dia, resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo.

Em 12 estudos que avaliaram a suplementação de lipídeos e seus efeitos sobre a SPM as fontes de lipídios não reduziram a eficiência microbiana e em alguns casos promoveu o seu aumento, sendo 5 destes estudos utilizando lipídios insaturados (DOREAU et al., 1994).

A proteína microbiana é a melhor fonte de aminoácidos disponível para síntese e produção de leite. Os resultados indicam que as fontes de lipídeos utilizadas no presente estudo, não influenciaram a produção total de proteína microbiana, demonstrando o grande potencial de utilização destas fontes nas dietas de vacas em lactação.

6.4 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Os dados de produção e composição do leite de acordo com as dietas experimentais são apresentados na (Tabela 7). Não houve efeito ($P>0,05$) das fontes lipídicas nas dietas sobre a produção de leite, produção de leite corrigida, proteína e lactose. Também não foi observado efeito ($P>0,05$) nos teores de proteína e lactose. Foi observado efeito ($P<0,05$) no C3 para produção e teor de gordura, onde os animais submetidos à dieta GS apresentaram maiores produções e teores de gordura em relação aos animais submetidos à dieta SC. Estes resultados indicam que o poder de proteção ruminal dos sais de cálcio de ácidos graxos pode não estar sendo suficiente e que existe maior proteção contra a biohidrogenação ruminal do grão de soja integral. Com isso a biohidrogenação parcial e formação de isômeros como o CLA é inibida na dieta GS (Tabela 8), assim como seus efeitos negativos no teor de gordura no leite.

Estes resultados podem ser atribuídos a maior proteção de ácidos graxos insaturados na forma de grão integral, favorecendo a maior passagem de *C18:2 cis* para a absorção no abomaso e a lenta liberação de ácidos graxos, não excedendo a capacidade de hidrogenação e a formação dos CLAs *cis-9*, *trans-11* e *trans-10*, *cis-12*, o que demonstra a proteção e lenta liberação de lipídeos contidos no grão de soja, como pode ser observado nos dados de PAG

do leite apresentados na (Tabela 8), onde foram observadas maiores concentrações de *CLAs cis-9, trans-11* e dos demais isômeros da biohidrogenação para os animais submetidos à dieta SC, quando comparadas com à dieta GS.

Quando se avalia o processo de inclusão e digestão de lipídeos em ruminantes, a maioria dos ácidos graxos é modificada por meio do metabolismo ruminal, dessa forma a biohidrogenação normalmente não é completa, resultando em ampla variedade de ácidos graxos (BYERS; SCHEHING, 1993). Assim, quando ocorre biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados, o fluxo duodenal de ácidos graxos C18:1 *trans* e ácido linoléico conjugado *CLA cis-9, trans-11 e CLA trans-10, cis-12* aumenta, apresentando o último comprovado efeito inibidor sobre a síntese de gordura do leite (BAUMAN; GRIINARI, 2001).

O grão de soja possui grande percentual de ácidos graxos insaturados, e ainda, se fornecida de forma integral, pode-se minimizar os efeitos dos lipídeos sobre a fermentação ruminal, devido ao menor contato dos lipídeos com os microrganismos, pois funciona como uma fonte lipídica protegida (BYERS; SCHELLING, 1989). No presente estudo, os animais que consumiram as dietas contendo grão de soja apresentaram maiores teores ou porcentagem de gordura no leite, e menores concentrações dos isômeros da biohidrogenação no perfil de ácidos graxos do leite, e no abomaso (Tabela 15).

Estudos da década de 90, registrados e discutidos pelo NRC (2001), demonstram que fontes de lipídeos contendo ácidos graxos livres como óleos de sementes, promovem maiores concentrações do ácido linoléico conjugado (CLA) C18:2, *trans-10, cis-12* no leite, o que causa redução no teor de gordura do leite dos animais suplementados. Freitas Junior et al. (2010) avaliaram a inclusão de óleo de soja, sais de cálcio e grão de soja em dietas com 5,5% de EE, em vacas no terço médio de lactação com média de produção de 25kg/vaca/dia. Estes autores observaram que os animais que consumiram sais de cálcio de ácidos graxos apresentaram menor teor de gordura no leite em relação às demais dietas experimentais e que este resultado pode ser atribuído a formação de ácidos graxos intermediários da biohidrogenação no rúmen, já que não houve redução da digestibilidade de fibra ou alterações no padrão de fermentação ruminal.

Wu e Hurber (1993) revisaram dados de 49 experimentos envolvendo 83 comparações entre dietas com e sem adição lipídica para vacas leiteiras e observaram que na maioria dos casos a produção de leite aumentou e o teor de proteína foi reduzido pela adição de fontes de lipídeos, sendo o grau de depressão dependente da fonte. A produção de leite e o teor de

proteína, no presente estudo, pela utilização de vacas em final de lactação, com baixa produção de leite, não foram influenciadas pela inclusão de lipídeos na dieta.

Tabela 7 - Produção e composição do leite de vacas holandesas suplementadas com diferentes fontes de lipídeos

Parâmetros	Rações experimentais ¹				EPM ²	P ²		
	C	OS	GS	SC		C1	C2	C3
	Kg/dia							
Produção Leite	15,48	15,01	14,89	15,53	0,67	0,570	0,538	0,473
Produção corrigida	16,79	15,46	17,24	15,99	0,60	0,419	0,130	0,153
Gordura	0,62	0,55	0,66	0,56	0,02	0,514	0,698	0,008
Proteína	0,48	0,45	0,46	0,47	0,02	0,348	0,910	0,279
Lactose	0,72	0,68	0,69	0,71	0,03	0,297	0,799	0,261
	Porcentagem %							
Gordura	4,08	3,82	4,64	3,79	0,18	0,987	0,174	0,017
Proteína	3,10	2,99	3,10	3,07	0,04	0,610	0,294	0,734
Lactose	4,65	4,50	4,65	4,60	0,06	0,635	0,337	0,755

¹Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SC), (Megalac-E®). C1= controle vs fontes de lipídeos (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja vs sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja vs sais de cálcio. ²Erro padrão da média

Os dados apresentados no presente estudo demonstram o real poder do grão de soja em alterar a composição de sólidos do leite, aumentando o teor de gordura, demonstrando assim seu potencial de utilização como manipulador desta composição.

6.5 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE

Os dados referentes ao perfil de ácidos graxos (AG) no leite, esta apresentado na (Tabela 8). Podemos verificar que foi observado efeito em C1 ($P < 0,05$) para as concentrações totais de ácidos graxos <C16 como os ácidos (C 6:0), (C 8:0), (C 10:0), (C 11:0), (C 12:0), (C 14:0), (C 14:1), (C 15:0), (C 16:0) e (C16 :1), com maiores concentrações para os animais alimentados com a dieta controle. Os ácidos graxos de cadeia curta são sintetizados principalmente nas células epiteliais da glândula mamária, a partir do acetato e do β -hidroxibutirato, que são originados no rúmen. As concentrações encontradas no presente estudo sugerem que a inibição da síntese de ácidos graxos de cadeia curta na gordura do leite <C16 pela inclusão de fontes de lipídeos nas dietas e consequente de extrato etéreo pode ser explicada pela redução da relação acetato/propionato no rúmen (Tabela 5), e pelo fornecimento de ácidos graxos pré-formados para a glândula mamária.

Também foi observado efeito em C3 ($P < 0,05$) para os ácidos graxos (C 4:0), (C 10:0), (C 11:0) e (C 12:0), onde os animais submetidos a dieta SC apresentaram menores concentrações. Como podemos observar na (Tabela 8), os animais submetidos a dieta SC apresentaram maiores teores dos intermediários da biohidrogenação, a também menores teor de gordura do leite (Tabela 7). Assim como descrito por Bauman e Grinari (2001), quando ocorre biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados, aumenta o fluxo duodenal de ácidos graxos C18:1 *trans* e ácido linoléico conjugado CLA *cis*-9, *trans*-11 e CLA *trans*-10, *cis*-12, apresentando comprovado efeito inibidor sobre a síntese de gordura do leite, como foi observado no presente estudo.

Não foi observado efeito ($P > 0,05$) para as concentrações dos ácidos graxos (C 17:0), (C 17:1) e (C 18:3) entre as dietas experimentais. Foi observado efeito em C1 ($P < 0,05$) para os AG (C 18:0), (C 20:0) e (C_{18:1cis} 9), com maiores valores para os animais submetidos aos tratamentos com fontes lipídicas, demonstrando o efeito dos lipídeos em aumentar a incorporação dos ácidos graxos de cadeia longa oferecidos na dieta, na gordura do leite.

Foi observado efeito em C2 e C3 ($P < 0,05$) para o AG (C_{18:2 n-6, cis}), onde podemos observar maiores concentrações para os animais submetidos as dietas com fontes lipídicas protegidas e que dentre estas, a dieta GS demonstrou maior poder de proteção.

Com relação aos intermediários da biohidrogenação foi observado efeito em C2 e C3 ($P < 0,05$) para os AG (C_{18:1 trans} 11) e (cis9,trans 11 CLA), onde os animais submetidos a dieta GS apresentaram menores concentrações que na dieta SC, e os animais submetidos a dieta OS apresentaram concentrações menores que os alimentados com fontes lipídicas protegidas. Estes resultados demonstram que não houve aumento da extensão de biohidrogenação de ácidos graxos com a inclusão de grão de soja cru e integral nas dietas, demonstrando assim o poder de proteção do grão de soja integral sobre os lipídeos presentes na matriz protéica do grão, redizindo seu contato com os microrganismos ruminais e fazendo com que sua liberação seja lenta.

Com relação ao total de AGs (C 16:0) e (<C 16) foi observado efeito em C1 ($P < 0,05$) com menores valores para os animais submetidos as dietas com fontes lipídicas, e consequentemente efeito inverso em C1 para os AGs (>C 16). Observamos efeito ($P < 0,05$) em C1 nas concentrações de AG (C 18 Saturado e Insaturado), com maiores valores para os animais suplementados com lipídeos, e consequentemente menor relação Sat/Insat. Demonstrando como já comentado anteriormente, o efeitos das fontes de lipídeos utilizadas no experimento em aumentar a incorporação de AG de cadeia longa insaturados no perfil de ácidos graxos da gordura do leite.

Tabela 8 – Perfil de ácidos graxos do leite de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais ¹				EPM ²	Valor de P		
	C	OS	GS	SC		C1	C2	C3
AG,g/100g Total AG								
C4:0	1,10	0,70	0,71	1,21	0,18	0,203	0,170	0,027
C6:0	1,34	0,72	0,91	1,04	0,18	0,023	0,210	0,575
C8:0	1,00	0,61	0,77	0,65	0,10	0,005	0,373	0,365
C10:0	2,56	1,93	2,11	1,53	0,19	0,003	0,619	0,033
C11:0	0,24	0,15	0,16	0,08	0,02	<0,001	0,415	0,041
C12:0	3,39	2,57	2,65	2,07	0,22	<0,001	0,420	0,055
C14:0	12,11	9,81	10,00	8,98	0,45	<0,001	0,563	0,122
C14:1	0,54	0,45	0,45	0,42	0,05	<0,001	0,736	0,523
C15:0	0,33	0,24	0,19	0,16	0,03	<0,001	0,077	0,440
C16:0	35,14	30,57	30,68	30,10	1,11	<0,001	0,892	0,717
C16:1 cis	1,45	1,25	1,08	1,10	0,13	0,014	0,206	0,849
C17:0	0,21	0,19	0,21	0,19	0,03	0,616	0,795	0,458
C17:1	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	0,570	0,119	1,000
C18:0	11,58	15,85	17,65	16,04	1,23	<0,001	0,360	0,205
C18:1 trans 11	1,22	2,12	0,60	2,11	0,36	0,281	0,057	0,002
C18:2 n-6, cis	2,06	1,77	2,94	2,32	0,27	0,148	<0,001	0,015
C18:1cis 9	27,73	31,67	30,21	32,17	1,71	0,024	0,762	0,293
C18:3	0,10	0,12	0,15	0,11	0,02	0,297	0,541	0,213
C20:0	0,11	0,14	0,15	0,12	0,01	0,023	0,414	0,026
cis-9,trans-11 CLA	0,50	0,88	0,17	0,75	0,19	0,598	0,046	0,020
Total								
<C16	22,78	17,30	18,06	16,20	1,14	<0,001	0,903	0,256
C16	35,14	30,57	30,68	30,10	1,11	0,001	0,892	0,717
>C16	45,00	54,13	53,18	55,21	2,51	0,003	0,982	0,548
C18								
Insaturado C18	31,01	35,57	33,76	36,87	2,03	0,022	0,890	0,164
Saturado C18	11,58	15,85	17,65	16,04	1,23	<0,001	0,360	0,205
Insat/Sat C18	2,73	2,37	1,98	2,37	0,23	<0,001	0,070	0,004
Total								
Saturados	69,30	63,62	66,31	62,23	1,74	0,004	0,715	0,068
Insaturados	33,63	38,39	35,62	39,28	2,20	0,035	0,628	0,117
Insat/Sat	2,15	1,73	1,88	1,60	0,15	0,006	0,917	0,109

¹Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SC), (Megalac-E®). C1= controle vs fontes de lipídeos (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja vs sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja vs sais de cálcio. ² Erro padrão da média.

Quando se avalia o processo de inclusão e digestão de lipídeos em ruminantes, a maioria dos ácidos graxos é modificada através do metabolismo ruminal, dessa forma a biohidrogenação normalmente não é completa, resultando em ampla variedade de ácidos graxos (BYERS; SCHEHING, 1993). Assim, a biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados, leva a um aumento da absorção de isômeros da biohidrogenação como os AG C18:1 *trans* e ácido linoléico conjugado CLA *cis-9, trans-11* e CLA *trans-10, cis-12*, como

observamos no presente estudo (Tabelas 8 e 15), principalmente nas dietas OS e SC, o que pode levar a uma depressão na gordura do leite, resultado também observado no estudo (Tabela 7) onde as dietas SC e OS levaram a uma redução do teor de gordura do leite.

Nas concentrações totais de AG saturados e insaturados observamos que a suplementação lipídica reduziu ($P < 0,05$) as concentrações de AG saturados e aumentou ($P < 0,05$) as concentrações de AG insaturados, resultados esperados devido a maior incorporação na gordura do leite de AG de cadeia longa, que no caso foram adicionados as dietas experimentais. De forma semelhante, esses resultados também foram relatados por Jenkins e Bridges (2007) em um estudo analisando 25 referências com diferentes fontes de lipídeos.

Como observado no experimento, a adição de grão de soja cru e integral nas dietas alterou o perfil de ácidos graxos da gordura do leite, aumentando os teores de C 18:2 cis e a não formação dos CLAs cis -9, $trans$ -11, o que demonstra a proteção e lenta liberação de lipídeos, contidas no grão de soja, como citado acima.

6.6 BALANÇO DE ENERGIA

Em relação ao consumo não foi observada diferença ($P > 0,05$) entre as dietas experimentais (Tabela 9) para energia bruta, digestível, metabolizável e líquida de lactação. Estes resultados estão de acordo com o consumo de matéria seca e o consumo de extrato etéreo, onde o menor consumo de matéria seca apresentado pelos animais submetidos às dietas com fontes de lipídeos foi compensado pelo maior consumo de extrato etéreo nestas dietas.

Ao se avaliar a exigência de energia líquida de lactação e manutenção não foi observado efeito ($P > 0,05$) entre as dietas experimentais, estes resultados são coerentes aos resultados de consumo de energia encontrados no presente estudo.

Em relação ao balanço de energia não foi observado efeito ($P > 0,05$) entre as dietas experimentais (Tabela 9), estes dados são explicados pela fase de lactação em que os animais se encontram e pelo consumo de matéria seca, extrato etéreo e energia, observados no estudo (Tabelas 4 e 9).

Tabela 9 – Balanço de energia de de vacas holandesas suplementadas com diferentes fontes de lipídeos

Variáveis ³	Rações experimentais ¹				EPM ²	P ²		
	C	OS	GS	SC		C1	C2	C3
<i>Consumo</i>								
EB (Mcal/dia)	103,01	105,59	105,21	102,90	1,99	0,413	0,630	0,251
ED (Mcal/dia)	70,66	72,09	72,08	72,41	1,28	0,499	0,944	0,909
EM (Mcal/dia)	58,65	59,84	59,83	60,10	1,06	0,499	0,944	0,909
EL _L (Mcal/dia)	41,11	39,10	40,66	38,64	2,36	0,343	0,629	0,193
<i>Exigências de energia líquida (Mcal/dia)</i>								
LACTAÇÃO	20,20	21,11	20,66	20,76	0,44	0,283	0,655	0,627
MANTENÇA	9,31	9,32	9,34	9,30	0,06	0,714	0,471	0,663
<i>Balanço de energia</i>								
EL (Mcal/dia)	11,60	8,67	10,66	8,56	1,70	0,458	0,678	0,563
<i>Eficiência energética</i>								
EL _L +EL _M /CED	0,41	0,42	0,41	0,41	0,03	0,601	0,622	0,100
EL _L /CED	0,28	0,29	0,28	0,29	0,01	0,847	0,785	0,813

¹Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SC), (Megalac-E®). C1= controle vs fontes de lipídeos (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja vs sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja vs sais de cálcio. ²Erro padrão da média; ³ Energia bruta (EB); Energia digestível (ED); Energia Metabolizável (EM); Energia líquida (EL); Consumo de energia digestível (CED).

As eficiências energéticas de utilização de digestível para lactação e lactação+mantença não foram influenciadas ($P>0,05$) pelas dietas experimentais. Estes resultados são justificados pelo consumo de energia digestível apresentado e também pela exigência de energia líquida de lactação e manutenção observadas.

Assim, apesar das dietas com fontes de lipídeos terem apresentado menor consumo de matéria seca, não foi observado diferenças no aproveitamento de energia.

6.7 BALANÇO DE NITROGÊNIO

Os valores médios e os coeficientes de variação para os consumos de compostos nitrogenados totais (NT), a excreção de compostos nitrogenados totais nas fezes (N-fecal), na urina (N-urina) e no leite (N-leite), o balanço de nitrogênio (BN) e a eficiência de utilização de nitrogênio obtidas para as rações experimentais são apresentados na (Tabela 10).

Foi observado efeito em C1 ($P<0,05$) para consumo de nitrogênio total, onde ao animais submetidos às dietas com fontes de lipídeos apresentaram menor consumo de nitrogênio em relação aos animais submetidos à dieta controle. Este resultado pode ser explicado pelo consumo de matéria seca (Tabela 4) que foi maior para os animais que

consumiram a dieta C. Não houve efeito para excreção de nitrogênio na urina (g/dia e % do NT), no leite (g/dia e % do NT) e nas fezes (g/dia e % do NT), estes dados estão de acordo com o consumo de proteína bruta observado nas dietas experimentais no que diz respeito ao consumo de nitrogênio total.

Com relação ao balanço de nitrogênio (g/dia e % do NT), não foi observado efeito entre as dietas experimentais. Podemos observar que os animais submetidos à dieta C apresentaram maiores consumo e balanço, resultados coerentes com o consumo de matéria seca (Tabela 4).

Barletta et al. (2010), encontraram valores médio de balanço de nitrogênio de 129,64 g/dia. No presente estudo a média encontrada foi de 182,88 g/dia, que apresenta valores superiores devido à fase de lactação e desempenho produtivo dos animais.

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

Tabela 10 – Balanço de nitrogênio de acordo com as dietas experimentais

Tabela 10 - Balanço de nitrogênio de acordo com as dietas experimentais ¹								
Item	Dietas experimentais ¹				EPM	Valor de P		
	C	OS	GS	SC		C1	C2	C3
<i>g de N/dia</i>								
Consumo	441,93	392,95	389,86	406,76	15,44	0,019	0,601	0,532
Fezes	87,25	85,13	95,68	87,91	3,08	0,593	0,097	0,600
Urina	75,16	81,34	54,12	47,41	6,16	0,292	0,470	0,046
Leite	73,25	67,45	71,60	73,42	3,52	0,391	0,696	0,094
Balanço	206,25	158,81	168,46	197,99	14,77	0,146	0,653	0,136
<i>% N total</i>								
Fezes	20,23	22,38	27,60	23,36	1,59	0,085	0,069	0,734
Urina	17,29	21,37	16,68	12,33	1,88	0,897	0,966	0,069
Leite	16,68	17,33	19,12	18,14	0,70	0,236	0,303	0,601
Balanço	45,78	38,90	36,58	46,16	3,22	0,345	0,312	0,286

¹Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SC), (Megalac-E[®]). C1= controle vs fontes de lipídeos (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja vs sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja vs sais de cálcio. ² Erro padrão da média.

Petit et al. (2002) avaliaram a suplementação de sais de cálcio de ácidos graxos, sementes de linhaça e soja micronizada como fonte de lipídeo nas dietas de vacas no início de lactação, contendo cerca de 8,0% de extrato etéreo. Estes autores não observaram diferenças

no balanço de nitrogênio entre as fontes lipídicas utilizadas, sendo os valores verificados por estes autores semelhantes aos observados neste estudo.

O consumo de nitrogênio (g/dia) entre as dietas experimentais acompanharam de forma coerente os resultados de consumo de matéria seca (Tabela 4). Isso justifica a variação no consumo, já que as dietas utilizadas neste estudo foram isoprotéicas. Entretanto como no presente estudo os animais já estavam com o DEL médio de 180 dias, assim, já se apresentavam na fase de balanço positivo de nutrientes, sendo desta maneira mais difícil observarmos algum efeito no balanço de nitrogênio, mesmo tendo encontrado diferença no consumo de matéria seca e de nitrogênio.

Assim, pode-se afirmar que o metabolismo protéico dos animais não foi alterado com as fontes de lipídeos utilizadas no estudo, na fase de lactação em que os animais se encontram.

6.8 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

Não houve diferença ($P>0,05$) entre as dietas experimentais para as concentrações de glicose, uréia, C-HDL, albumina, gama glutamil transferase (GGT) e aspartato amino transferase (AST) no soro (Tabela 11).

Foi observado efeito C1 ($P<0,05$) para a concentração de colesterol total (Tabela 11), onde os animais que receberam as dietas com fontes de lipídeos apresentaram maiores concentrações em relação aos animais submetidos à dieta controle. Este aumento da concentração do colesterol total no lipidograma do soro pode ser justificado pelo maior consumo de ácidos graxos nas dietas com fontes de lipídeos, que proporcionam assim, aumento das respectivas frações relativas ao metabolismo de lipídios transportados no sangue.

Elliott et al. (1993), de forma semelhante, observaram aumento da concentração de colesterol total no sangue de vacas com cerca de 64 dias em lactação e suplementadas com diferentes fontes lipídicas, com médias de 247 mg/dL e 246 mg/dL, respectivamente, para os níveis de 2,5 e 5,0 % de EE na dieta. De acordo com Schauff et al. (1992) e Elliott et al. (1993), este aumento da concentração de colesterol total no sangue ocorre devido à elevação da demanda necessária para digestão, absorção e transporte de ácidos graxos de cadeia longa ingerida advinda das fontes de lipídios.

Bremmer, Ruppert e Clark (1998) também observaram aumento na concentração de colesterol total no soro de em vacas que receberam infusão de misturas de ácidos graxos de cadeia longa no abomaso, de forma semelhante a Christensen et al. (1994), que verificaram tendência de aumento da concentração de triglicerídeos em vacas que receberam misturas de ácidos graxos de cadeia longa no abomaso.

A concentração de glicose plasmática não foi influenciada pelas dietas experimentais, sendo este resultado semelhante aos estudos de e Drackley et al. (1992); Elliott et al. (1993) e Bremmer, Ruppert e Clark (1998), que verificaram concentração semelhante de glicose plasmática em vacas suplementadas com diferentes fontes de lipídicas. A manutenção da concentração de glicose plasmática se relaciona à relativa estabilidade nas concentrações de glicose em ruminantes.

Oliveira et al. (2005) avaliaram a bioquímica sérica de vacas Holandesas no pré e pós-parto e observaram valores para as concentrações da enzima gamaglutamiltransferase, de 13,54 mg/dL ($\pm$ 4,26) aos 180 dias de lactação. Hoedemaker et al. (2004) avaliaram os parâmetros sanguíneos de 238 vacas e observaram valores da enzima aspartatoaminotransferase de 40,0 U/L aos 77 dias pós-parto, valor este semelhante ao encontrado neste estudo.

Tabela 11 – Metabólitos sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo fontes lipídicas

Item	Dietas experimentais ¹				EPM ²	Valor de P		
	C	OS	GS	SC		C1	C2	C3
			<i>mg/dl</i>					
Glicose	71,25	65,62	69,75	69,12	2,37	0,420	0,721	0,379
Colesterol	106,27	143,06	149,94	153,19	9,75	0,001	0,556	0,599
C-HDL ³	88,76	97,88	106,31	132,27	8,96	0,189	0,114	0,692
Ureia	37,25	36,75	36,12	35,87	1,13	0,637	0,802	0,809
			<i>g/l</i>					
Albumina	3,15	3,03	3,22	3,30	0,07	0,713	0,122	0,151
			<i>U/L</i>					
AST ⁴	44,62	42,37	53,25	48,75	2,90	0,489	0,860	0,090
GGT ⁵	22,52	21,48	21,94	21,19	0,47	0,169	0,485	0,591

¹Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SC), (Megalac-E®). C1= controle vs fontes de lipídeos (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja vs sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja vs sais de cálcio. ²Erro padrão da média.

³Colesterol – lipoproteína de alta densidade (HDL); ⁴AST: aspartato aminotransferase; ⁵GGT: gama glutamil transferase.

Freitas Júnior et al. (2008) avaliaram as concentrações de colesterol total e HDL, glicose e ureia no soro a as enzimas hepáticas (AST, GGT e FA), de vacas leiteiras

alimentadas com 16% de grão de soja integral na matéria seca das dietas e encontraram valores semelhantes aos encontrados no presente estudo.

As concentrações dos parâmetros sanguíneos foram alterados pelas dietas com inclusão de lipídeos, especialmente o colesterol total. Entretanto a inexistência de variações das enzimas hepáticas AST e GGT, indica que os animais em lactação suplementados com fontes de lipídeos, não sofreram alterações consideráveis no tecido hepático durante o metabolismo de lipídeos, demonstrando o potencial de utilização na dieta de ruminantes destas fontes.

6.9 CINÉTICA E DINÂMICA RUMINAL

Os dados referentes à dinâmica ruminal pelo esvaziamento e taxa de passagem de líquidos de acordo com as dietas experimentais estão descritos na tabela 12. Não foi observado efeito em nenhum dos contrastes avaliados para o conteúdo ruminal em Kg, L e em % da matéria seca.

Também não foi observado efeito ($P>0,05$) para o volume de líquidos no rúmen, taxa de passagem de líquido e turnover ruminal.

Tabela 12 – Dinâmica ruminal e taxa de passagem de líquido do rúmen de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas experimentais ¹				EPM ²	Valor de P		
	C	OS	GS	SC		C1	C2	C3
Conteúdo ruminal, kg	68,83	67,71	70,02	66,50	3,29	0,746	0,823	0,224
Conteúdo ruminal, L	78,87	75,75	82,56	77,31	4,91	0,919	0,240	0,204
Conteúdo ruminal, % MS	9,72	9,35	10,01	9,52	0,56	0,864	0,497	0,517
Volume ruminal líquido, l	50,42	47,95	47,60	45,77	3,04	0,061	0,483	0,381
Taxa de passagem, % /h	8,11	8,25	8,49	8,65	0,70	0,172	0,247	0,601
Taxa de passagem, L/h	4,08	3,95	4,04	3,96	0,14	0,422	0,917	0,516
Turnover ruminal, vezes /24 h	1,94	1,98	2,03	2,07	0,16	0,168	0,244	0,591

¹Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SC), (Megalac-E®). C1= controle vs fontes de lipídeos (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja vs sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja vs sais de cálcio. ²Erro padrão da média;

Freitas Jr. (2012), avaliando dietas semelhantes, em vacas no terço médio de lactação, não encontrou efeito das dietas experimentais sobre o conteúdo ruminal, volume ruminal, teor de matéria seca, pool ruminal de matéria seca, taxa de passagem de líquido, volume de líquido

ruminal, e taxa de renovação ruminal. A quantidade de líquido estimado pelo indicador polietilenoglicol (PEG) relatada pelo autor foi de 61,68 litros, valor superior ao valor médio de 47,93 litros encontrado no presente estudo. Bettero et al. (dados não publicados), avaliando também dietas semelhantes em vacas no período seco observou em média 38,32 litros de volume de líquidos no rúmen. Estes valores são menores que os encontrados no presente estudo, mas demonstram coerência de dados, por termos que levar em consideração características do ciclo produtivo dos animais. Essas diferenças podem ser entendidas como características específicas dos animais em diferentes estágios da lactação, em que o padrão de consumo e tipo da dieta como a proporção concentrado/volumoso e a taxa de passagem da MS tem direta interferência na taxa de passagem e volume total de líquido no rúmen, como demonstrado no presente estudo.

Tabela 13 – Dinâmica ruminal, concentrações e digestibilidade de nutrientes de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes fontes lipídicas

Item	Dietas experimentais ¹				EPM ²	Valor de P		
	C	OS	GS	SC		C1	C2	C3
Taxa de digestão (%/h)								
Matéria seca	3,28	3,09	3,38	3,53	0,24	0,908	0,367	0,653
FDN ³	1,49	1,25	1,51	1,70	0,13	0,991	0,044	0,347
FDNpd ⁴	3,82	3,02	3,57	3,95	0,38	0,543	0,169	0,533
Taxa de renovação ruminal (%/h)								
Matéria seca	6,92	6,27	6,42	6,42	0,18	0,075	0,497	0,782
Matéria orgânica	6,90	6,25	7,71	6,49	0,37	0,919	0,348	0,248
FDN	3,70	3,40	3,66	3,56	0,12	0,384	0,272	0,649
FDN indigestível	2,47	2,58	2,63	2,33	0,14	0,848	0,633	0,235
FDNpd	4,86	4,36	4,79	5,17	0,33	0,877	0,335	0,604
Taxa de passagem (%/h)								
Matéria seca	3,65	3,17	3,09	2,98	0,21	0,054	0,613	0,712
FDN	2,21	2,15	2,14	1,86	0,11	0,402	0,465	0,220
FDNpd ⁴	2,35	2,02	2,02	1,51	0,11	0,015	0,215	0,037
Massa da digesta ruminal kg								
Peso matéria natural	68,83	67,71	70,02	66,50	1,67	0,746	0,823	0,224
Matéria seca	13,32	13,04	13,22	12,98	0,38	0,640	0,906	0,695
Matéria orgânica	12,39	12,11	11,07	12,06	0,74	0,443	0,539	0,339
Matéria mineral	0,92	0,93	2,15	0,92	0,31	0,526	0,420	0,167
FDN	9,02	8,60	8,55	8,42	0,27	0,204	0,783	0,777
FDNpd	4,62	4,38	4,55	4,23	0,20	0,513	0,985	0,460
FDNi ⁵	4,39	4,21	4,00	4,19	0,12	0,188	0,572	0,426

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

Os dados referentes a cinética e digestão ruminal estão descritos nas tabelas 13 e 14. A avaliação da dinâmica e digestão ruminal e seus efeitos sobre digestibilidade e bio-hidrogenação, consistem em análises importantes a serem realizadas quando investiga-se a inclusão de fontes de lipídeos nas dietas. Não houve efeito das fontes de lipídeos utilizadas na taxa de digestão da MS e da FDNpd. Foi observado efeito ($P < 0,05$) para taxa de digestão da FDN em contraste 2, sendo observado maiores valores para os animais submetidos às dietas com SC e GS quando comparadas com a dieta OS. Quando observamos a taxa de renovação ruminal observamos menores valores para os animais suplementados com OS, o que juntamente com o menor consumo de matéria seca destes animais justificam estes resultados de menor taxa de digestão da FDN.

Não foi observado efeito ($P > 0,05$) para os dados de taxa de renovação ruminal para MS, MO, FDN, FDNi e FDNpd entre as dietas experimentais. Vale observar que foi encontrado uma tendência para taxa de renovação ruminal da matéria seca ($P = 0,075$) no C1 onde os animais suplementados com fontes de lipídeos apresentam valores inferiores quando comparados aos submetidos à dieta controle, resultado este que pode ser explicado pelo menor consumo de matéria seca (Tabela 5) dos animais suplementados com lipídeos. Também é importante salientar que a taxa de renovação ruminal é notadamente influenciada pela taxa de passagem que influencia diretamente o desaparecimento ruminal, assim se temos menor taxa de passagem nos animais suplementados com lipídeos, esta redução da renovação ruminal da MS era esperada.

Para os dados de taxa de passagem da FDN não foi observado efeito ($P > 0,05$) nos contrastes avaliados. Entretanto foi observado efeito em C1 para taxa de passagem da MS, onde os animais que receberam as dietas com lipídeos apresentaram menores valores, resultados estes que podem ser explicados pelo menor consumo de MS dos animais suplementados com lipídeos, e também pela menor passagem para o abomaso em kg/dia de MS e pela redução numérica no pool ruminal de MS. Também foi observado efeito na taxa de passagem da FDNpd no C1 onde os animais suplementados com lipídeos apresentaram menores valores quando comparados com os da dieta controle, e C3, onde os animais submetidos à dieta com GS apresentaram valores superiores aos animais da dieta SC. A taxa de passagem é um dos mais importantes parâmetros que influenciam o desaparecimento ruminal da digesta e a ingestão de nutrientes.

A taxa de renovação ruminal esta ligada ao consumo dos nutrientes e ao pool ruminal, como foi observada redução no consumo neste estudo, os dados suportam esta redução na

taxa de renovação ruminal, explicando assim estes resultados para os animais suplementados com lipídeos.

Com relação a massa da digesta ruminal (kg) não foi observado efeito ($P>0,05$) nos contrastes avaliados para peso da MN, MS, MO, MM, FDN, FDNpd e FDNi. Freitas Jr. (2012), avaliando dietas semelhantes, mas com vacas no terço médio de lactação, não encontrou efeito das dietas experimentais sobre o conteúdo ruminal em quilos, volume ruminal, conteúdo de matéria seca, pool ruminal de matéria seca, taxa de passagem de líquido, volume de líquido ruminal e taxa de renovação ruminal.

Harvatine e Allen (2006c) não encontraram diferenças no turnover ruminal da MS, MO, FDN e FDNpd e amido quando usaram diferentes fontes e graus de saturação de AG, para vacas em início de lactação.

Tabela 14 – Dinâmica ruminal, concentrações e digestibilidade da FDN de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes fontes lipídicas

Item	Dietas experimentais ¹				EPM ²	Valor de P		
	C	OS	GS	SC		C1	C2	C3
FDN								
Consumo, kg/dia	7,91	6,95	7,43	7,16	0,27	0,016	0,253	0,444
Digestibilidade ruminal								
Kg/dia	3,30	2,63	3,15	3,57	0,32	0,653	0,092	0,396
%	39,42	35,69	39,89	46,33	3,38	0,768	0,052	0,212
Passagem para o abomaso								
Kg/dia	4,61	4,32	4,28	3,59	0,18	0,075	0,221	0,065
% do consumo	60,57	64,30	60,10	53,66	3,24	0,768	0,102	0,212
FDN indigestível kg	2,57	2,54	2,43	2,25	0,10	0,357	0,277	0,399
FDNpd kg	2,04	1,78	1,85	1,34	0,09	0,018	0,245	0,010
Digestibilidade no trato total								
Kg/dia	4,49	3,65	3,99	3,78	0,39	0,019	0,130	0,455
% do consumo (fluxo abomasal)	56,78	52,56	53,70	52,89	2,82	0,052	0,232	0,108
FDNi								
Consumo kg/dia	2,57	2,54	2,43	2,25	0,10	0,357	0,277	0,399
FDNpd								
Consumo kg/dia	5,34	4,41	5,00	4,91	0,30	0,121	0,157	0,839
Digestibilidade ruminal								
Kg/dia	3,30	2,63	3,15	3,57	0,32	0,653	0,092	0,396
%	57,03	55,26	54,91	55,04	3,38	0,076	0,969	0,987

¹Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SC), (Megalac-E®). C1= controle vs fontes de lipídeos (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja vs sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja vs sais de cálcio. ²Erro padrão da média;

Carvalho (2012) observou que sais de cálcio retardam o fluxo ruminal de partículas em relação ao tratamento sem inclusão de lipídios e como consequência elevou o tempo médio de retenção no rúmen-retículo e no trato digestivo total. Estes resultados são semelhantes aos encontrados com as fontes lipídicas utilizadas neste estudo.

A digestão e a passagem atuam de forma simultânea e competitiva para a remoção da digesta no rúmen, sendo necessário, então, estudar os efeitos combinados da digestão e da taxa de passagem para maximizar o consumo de nutrientes digestíveis. Deste modo, compreender como o volume do rúmen, a taxa de digestão e de passagem da digesta respondem às alterações no nível de ingestão de alimentos é fundamental para conhecer o mecanismo pelo qual ocorre a degradabilidade ruminal e digestibilidade dos nutrientes (KOVÁCS et al., 1998).

Foi observado efeito no C1 para consumo de FDN (em kg/dia) (Tabela 14), onde os animais suplementados com lipídeos apresentaram menor consumo quando comparados com os animais submetidos à dieta controle, este resultado era esperado em virtude do menor consumo de matéria seca dos animais suplementados com as fontes lipídicas (Tabela 4).

Com relação aos dados de digestibilidade ruminal em kg/dia foi observado uma tendência ($P=0,092$) em C2, onde os animais da dieta OS apresentaram valores inferiores aos suplementados com as dietas GS+SC, o que demonstra um efeito negativo dos lipídeos livres ou sem proteção na digestibilidade ruminal da fibra. Também quando avaliamos a digestibilidade ruminal (em % do FDN consumido) foi observado tendência ($P=0,052$) no C2, demonstrando novamente o efeito do óleo livre em possivelmente inibir bactérias celulolíticas e assim reduzir a digestibilidade ruminal da FDN.

Não foi observado efeito para passagem para o abomaso (em kg/dia) de FDN, entretanto podemos observar que os animais suplementados com lipídeos apresentam menores valores quando comparados com os da dieta C ($P=0,075$), e também os animais submetidos a dieta GS apresentaram valores superiores aos animais da dieta SC ($P=0,06$). Estes resultados estão relacionados às alterações no consumo de FDN. Não foi observado efeito ($P>0,05$) na passagem para o abomaso de FDN (em % FDN do consumo) e FDNi (em kg/dia).

Foi observado efeito ($P<0,05$) na passagem para o abomaso de FDNpd em kg/dia, onde os animais suplementados com lipídeos apresentaram valores inferiores aos animais submetidos à dieta controle, e também foi observado efeito no C3 ($P<0,05$) onde os animais da dieta SC apresentaram valores inferiores aos animais submetidos à dieta GS, demonstrando assim que as fontes de lipídeos alteram a digestibilidade ruminal da fibra. Dentre as fontes avaliadas, o grão de soja, por ser uma semente de oleaginosa e ter lenta liberação no rúmen,

reduz os efeitos dos AG insaturados na população de microrganismos ruminais, tendo assim menor efeito sobre a digestibilidade ruminal da fibra.

Foi observado efeito no C1 ($P < 0,05$) para digestibilidade total no trato da FDN (em kg/dia e em % do FDN consumido), onde os animais submetidos às dietas com fontes de lipídeos apresentaram resultados inferiores aos animais submetidos à dieta controle, demonstrando que as fontes de lipídeos afetaram negativamente a digestibilidade da fibra. Podemos verificar que houve uma tendência no C3 ($P = 0,108$) para digestibilidade total no trato da FDN em % do consumo, demonstrando menor efeito da dieta GS em reduzir a digestibilidade da fibra em relação as demais dietas avaliadas.

No presente estudo a digestibilidade ruminal da FDN média foi de 40,45%, Havartine e Allen (2006c), observaram valor médio de 30,2% de digestibilidade ruminal trabalhando com vacas em início de lactação com produção média de 40 kg de leite vaca/dia. Este resultado encontrado no presente estudo esta de acordo com os dados descritos na literatura, visto que estas vacas utilizadas no experimento, estavam com produção de leite média de 15 kg/dia e 20 kg/dia de consumo de matéria seca, logo com menor taxa de passagem e consequentemente maior digestibilidade ruminal da fibra, em relação aos observados no estudo de Havertine e Allen (2006c).

Não foi observado efeito no consumo de FDNi e FDNpd nos contrastes avaliados. Foi observada uma menor digestibilidade ruminal da FDNpd (em % do consumo de FDNpd) ($P = 0,076$) onde os animais suplementados com lipídeos apresentaram menor digestibilidade que os animais submetidos à dieta controle. Estes resultados são coerentes com os coeficientes de digestibilidade da FDN, demonstrando efeito negativo das fontes de lipídeos.

A redução na digestibilidade aparentes total e ruminal da FDN pode reduzir a taxa de passagem e, consequentemente, o consumo de matéria seca como visto no presente estudo.

Dados da literatura mostram que a interação entre a dieta basal e suplementação de lipídeos sobre a digestibilidade aparente total são inconsistentes. Bem Salem (1993) observou que dietas com óleos reduzem a digestibilidade aparente total de carboidratos quando se fornece silagem de milho como volumoso padrão, quando comparado com feno de gramíneas.

Certas fontes de lipídeos, especialmente na forma protegida da degradação ruminal, como os sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa, e fontes de lipídeos que possuem proteção natural, como sementes de oleaginosas inteiras ou parcialmente quebradas, possuem menor efeito sobre a população microbiana, apresentando menor toxicidade sobre os processos de degradação ruminal de nutrientes, especialmente da fibra (ALLEN, 2000; PALMQUIST; MATTOS, 2006). Entretanto o que devemos saber é se realmente a proteção

com o uso de sais de cálcio de ácidos graxos esta sendo eficiente para que não ocorra degradação no ambiente ruminal. Os dados apresentados no presente estudo indicam, que o grão de soja levou a menores alterações na digestibilidade aparente da FDN no ambiente ruminal e no trato total, em relação aos sais de cálcio de ácidos graxos.

6.10 FLUXO ABOMASAL DE ÁCIDOS GRAXOS E BIOHIDROGENAÇÃO RUMINAL

Para a avaliação de consumo de ácidos graxos, os ingredientes e as sobras foram analisados quanto a concentração de ácidos graxos com número de carbonos de 4 a 24 (Tabela 3).

Os dados referentes ao consumo de ácidos graxos, fluxo abomasal, composição de ácidos graxos no abomaso e bio-hidrogenação ruminal de acordo com as dietas experimentais estão na (Tabela 15).

Os animais suplementados com as fontes de lipídeos apresentaram maior consumo de ácidos graxos em relação à dieta controle ($P < 0,001$) (Tabela 17), resultados estes explicados pelos teores de extrato etéreo das dietas (Tabela 2). Também foi observado efeito ($P < 0,05$) em C1 para o consumo de C16:0, C18:0, C18:1 $_{cis}$, C18:2 e C18:3, onde novamente os animais submetidos às dietas com fontes de lipídeos apresentaram maior consumo quando comparados aos animais que receberam a dieta controle. O consumo de ácidos graxos está intimamente relacionado com os teores destes ácidos graxos da dieta. Como as fontes utilizadas no presente estudo apresentavam composição semelhante, pois eram compostas por AG oriundos da soja, com diferentes proteções (óleo livre, semente da oleaginosa e sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de soja), o consumo não diferiu entre as fontes de lipídeos avaliadas.

De forma coerente ao consumo de ácidos graxos foi observado efeito em C1 ($P < 0,001$) para o fluxo abomasal de AG, onde os animais suplementados com as dietas com lipídeos apresentaram maior fluxo que os animais da dieta C. Também foi verificado efeito em C1 ($P < 0,05$) para o fluxo abomasal de C16:0 e C18:0, com maiores valores aos animais alimentados com as fontes de lipídeos.

Tabela 15 - Consumo, fluxo abomasal, composição de ácidos graxos no abomaso e bio-hidrogenação ruminal de vacas leiteiras alimentadas com dietas contendo diferentes fontes lipídicas

	Dietas experimentais ¹				EPM	Valor de P		
	C	OS	GS	SC		C1	C2	C3
Consumo			g/dia					
Total AG	488,34	857,22	797,38	859,87	60,62	<0,001	0,583	0,304
16:0	55,32	99,09	98,71	97,59	7,09	<0,001	0,878	0,873
18:0	15,77	27,51	26,79	27,60	1,97	<0,001	0,849	0,678
18:1 <i>cis</i>	111,24	192,45	174,31	193,30	13,53	<0,001	0,456	0,165
18:2	245,98	431,18	404,03	430,88	30,52	<0,001	0,600	0,377
18:3	27,25	46,46	45,37	48,41	3,38	<0,001	0,884	0,374
Fluxo abomasal			g/dia					
Total AG	610,59	983,78	983,66	902,82	118,62	<0,001	0,639	0,420
16:0	103,04	142,52	172,00	160,23	24,18	0,011	0,280	0,637
18:0	438,24	727,27	684,49	609,67	82,52	<0,001	0,210	0,309
18:1 <i>trans</i>	13,85	44,78	11,28	33,60	5,86	0,014	0,002	0,006
18:1 <i>cis</i>	18,99	22,91	58,93	38,77	16,23	0,207	0,148	0,325
18:2	9,03	10,50	18,08	12,76	2,22	0,045	0,049	0,064
18:3	0,19	0,22	0,28	0,33	0,15	0,522	0,559	0,781
Composição abomasal			g/100g de AG					
16:0	16,91	14,47	17,11	17,81	1,04	0,705	0,024	0,626
18:0	71,61	73,99	70,56	68,08	2,30	0,782	0,107	0,446
18:1 <i>trans</i>	2,27	4,48	1,29	3,74	0,53	0,104	0,002	0,001
18:1 <i>cis</i>	3,16	2,35	5,38	3,91	1,11	0,556	0,085	0,328
18:2	1,54	1,07	1,75	1,52	0,17	0,619	0,006	0,286
18:3	0,03	0,02	0,03	0,04	0,01	0,998	0,333	0,352
Taxa de Bio-hidrogenação %			% consumido					
18:1	70,64	65,89	60,36	61,89	9,67	0,405	0,635	0,894
18:2	96,22	97,55	95,49	96,77	0,63	0,530	0,039	0,091
18:3	99,23	99,59	99,41	99,14	0,37	0,649	0,382	0,506

¹Controle (C); óleo de soja (OS); grão de soja (GS); sais de cálcio de ácidos graxos (SC) (Megalac-E®), C1= controle vs fontes lipídicas (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos); C2= óleo de soja vs sais de cálcio e grão de soja; C3= grão de soja vs sais de cálcio, ² Erro padrão da média.

Podemos observar que houve efeito para o fluxo de C18:1*trans* (P<0,05) em C2 com menores valores para os animais alimentados com as dietas (GS+SC) quando comparados com os animais da dieta OS, e em C3, onde os animais submetidos a dieta GS apresentaram valores inferiores aos animais da dieta SC. Estes resultados indicam que as fontes protegidas levaram a um menor fluxo abomasal deste isômero da bio-hidrogenação, e que entre as fontes protegidas, o menor fluxo foi observado nos animais alimentados com a dieta GS. Isto reafirma a teoria de que a lenta liberação no rúmen, dos ácidos graxos presentes nas sementes de oleaginosas, reduz a capacidade de hidrogenação dos microrganismos ruminais, fazendo com que chegue menor quantidade deste isômero no abomaso.

Estes resultados são tem relação direta com os resultados observados na digestibilidade ruminal, onde foi observado que as fontes protegidas levaram a menores alterações na digestibilidade ruminal da fibra (Tabela 14), e da composição de leite (Tabela 7), onde observou-se que os animais que alimentados com a dieta GS apresentaram maiores teores de gordura, quando comparados com os demais.

Não foi observado efeito para o fluxo abomasal de C18:1 *cis* e C18:3 entre as dietas experimentais. Foi observado efeito ($P < 0,05$) para o fluxo abomasal de C18:2 (ácido linoleico) em C1, com maiores valores para os animais submetidos as dietas com fontes lipídicas, em C2, com valores superiores aos animais suplementados com as dietas (SC+GS) quando comparados com os animais da dieta OS, e tendência ($P = 0,064$) em C3 com maiores valores para os animais da dieta GS quando comparada com os da SC. Os resultados indicam que as fontes protegidas promovem maiores fluxos abomasais do ácido graxo linoleico, e que entre as fontes protegidas o grão de soja apresentou maiores valor fluxo e consequentemente maior proteção contra a bio-hidrogenação ruminal.

Os efeitos nutracêuticos das fontes lipídicas é dependente do fluxo intestinal de ácidos graxos insaturados no caso linoleico (C18:2) ou linolênico (C18:3), e os dados apresentados neste estudo indicam que a tecnologia de proteção via sais de cálcio de ácidos graxos não promoveu aumento do fluxo abomasal destes ácidos graxos. A semente de oleaginosa (grão de soja) foi mais eficiente levou a um maior fluxo intestinal destes AGs, podendo assim a promover possíveis efeitos nutracêuticos, como melhorar sistema imunológico e desempenho reprodutivo, com menor interferência nos processos de digestão e composição do leite.

Os dados de composição abomasal estão descritos na (Tabela 15). Não foi observado efeito ($P > 0,05$), para a composição em (g/100g de AG) dos ácidos graxos C18:0, C18:1 *cis* e C18:3, entre as dietas experimentais.

Os animais submetidos a dieta OS apresentaram concentrações inferiores do AG C16:0 ($P < 0,05$) na digesta abomasal, quando comparados com os animais das dietas (SC+GS).

Foi observado efeito ($P < 0,05$) em C2 para a composição abomasal do AG C18:1 *trans*, onde os animais que receberam as dietas (SC+GS) apresentaram menores concentrações quando comparados aos animais submetidos a dieta OS. Em C3 observou-se que os animais da dieta SC apresentaram maiores concentrações de C18:1 *trans*, quando comparados aos animais da dieta GS. Resultados estes que corroboram com os resultados de fluxo abomasal descritos acima.

Com relação aos resultados de concentração abomasal de C18:2 foi observado efeito em C2 onde os animais da dieta OS apresentaram menores concentrações, resultado este que explica o menor fluxo abomasal deste AG nos animais submetidos a este tratamento quando comparados com os tratamentos GS e SC.

Não foi observado efeito ($P>0,05$) das dietas experimentais sobre a biohidrogenação ruminal dos AGs C18:1 e C18:3. Foi observado efeito na taxa de bio-hidrogenação do AG C18:2 em C2 ($P<0,05$), onde os animais da dieta OS apresentaram maior taxa de hidrogenação deste AG quando comparada aos animais alimentados com fontes lipídicas protegidas, e podemos observar que houve tendência no C3 ($P=0,091$), com menor taxa de bio-hidrogenação para os animais submetidos a dieta GS quando comparada a dieta SC. Resultados estes que estão de acordo com o fluxo abomasal deste AG encontrado neste estudo.

Sukhija e Palmquist (1990) enfatizaram que para que ocorra a biohidrogenação dos ácidos graxos ligados aos sais de cálcio, deve ocorrer primeiro a dissociação do cálcio e dos ácidos graxos e isto aconteceria em valores de pH baixos no rumen, especialmente quando sais de cálcio de ácidos graxos insaturados são utilizados. Wu et al. (1991) observaram uma taxa de biohidrogenação de 49% para dietas com sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma quando comparada a uma taxa de 80% de biohidrogenação para as dietas contendo fontes de ácidos graxos de óleos vegetais.

Lundy et al. (2004), avaliaram a inclusão de ácidos graxos de óleo de soja em quantidades iguais nas dietas de vacas Holandesas canuladas no rumen em duas formas: óleo de soja sem proteção e na forma de sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de soja. A taxa de bio-hidrogenação para o ácido linoleico foi de 94,8 e 92,2% para a dieta com óleo de soja e sais de cálcio, respectivamente, resultados semelhantes ao encontrado no presente estudo.

Havertine e Allen (2006c) avaliaram a biohidrogenação em vacas de alta produção, suplementadas com fontes lipídicas insaturadas (com 57,5% de sais de cálcio) e observaram 86,1% de bio-hidrogenação do C18:2. Freitas Junior (2012), avaliou a bio-hidrogenação e fluxo abomasal de AG em vacas em início de lactação, utilizando as mesmas fontes lipídicas deste estudo e encontrou 88,58% de bio-hidrogenação média de C18:2. O valor médio de bio-hidrogenação do AG C18:2 encontrado neste estudo (96,50%), está acima dos valores médios encontrados na literatura. Entretanto, a maioria dos estudos descritos foi realizado com vacas em início de lactação, com animais com maior taxa de passagem e CMS, o que consequentemente reduz a permanência dos AGs no rúmen.

Experimentos que tem como objetivo a avaliação de fluxo intestinal e biohidrogenação *in vivo* são extremamente difíceis de serem realizados, especialmente com vacas em lactação. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que as fontes lipídicas protegidas promovem maior fluxo abomasal de ácido linoleico, e que o grão de soja apresenta maior fluxo quando comparado aos sais de cálcio, demonstrando que a forma de proteção utilizada para a fabricação deste produto não está sendo eficiente para evitar a biohidrogenação ruminal.

7 CONCLUSÕES

As fontes lipídicas utilizadas levaram a redução no CMS e taxa de passagem e influenciaram negativamente a digestibilidade da fibra, sem contudo, alterar a produção de leite.

A utilização das fontes lipídicas avaliadas no estudo levou a um maior fluxo abomasal de AG, e entre as fontes utilizadas o grão de soja demonstrou menor taxa de bio-hidrogenação ruminal e maior fluxo abomasal de ácido linoleico com menores alterações nos parâmetros digestivos e no metabolismo ruminal.

Desta forma o grão de soja, por se tratar de um produto não beneficiado, de menor custo, se apresenta como boa opção do ponto de vista fisiológico e prático, pois apresenta uma proteção de ácidos graxos superior aos sais de cálcio de ácidos graxos, o que torna seu uso interessante em dietas de vacas leiteiras.

REFERÊNCIAS

- AGRIANUAL, 2009. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio, 2009. p. 462-485.
- ALBERS, R.; BOL, M.; BLEUMINK, R.; WILLEMS, A.; BLONK, C.; PIETERS, R. Effects of dietary lipids on immune function in a murine sensitization model. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 291–299, 2002.
- ALLEN M. S.; MERTENS D. R. Evaluating constraints on fiber digestion by rumen microbes. **Journal Nutrition**, v. 118, p. 261–270, 1988.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 7, p. 1598-1630, 2000.
- ÁVILA, C. D.; DePETERS, E. J.; PEREZ-MONTI, H.; TAYLOR, S. J.; ZINN, R. A. Influences of saturation ratio of supplemental dietary fat on digestion and milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1505-1519, 2000.
- BARLETTA, R. V. **Grão de soja crú e integral na alimentação de vacas leiteiras**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.
- BATEMAN, H. G.; JENKINS, C. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to non lactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. **Journal of Dairy Science**, v. 81 n. 9, p. 2451-2458, 1998.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: lowfat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v. 70, p. 15–29, 2001.
- BAUMAN, D. E.; LOCK, A. L. **Concepts in lipid digestion and metabolism in dairy cows**. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 15., 2006, West Lafayette, Cornell University, **Proceedings...** 2006.14 p.
- BEN SALEM, H.; KRZEMINSKI, R.; FERLAY, A.; DOREAU, M. Effect of lipid supply on in vivo digestion in cows: comparison of hay and corn-silage diets. **Canada Journal Animal Science**, v. 73, p. 547-557, 1993.
- BERNARD, J. K. Effect of raw or roasted whole soybeans on digestibility of dietary nutrients and milk production of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 73, n. 11, p. 3231-3236, 1990.
- BESSA, R. J. B.; SANTOS-SILVA, J.; RIBEIRO, J. M. R.; PORTUGAL, A.V. Reticulorumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. **Livestock Production Science**, v. 63, p. 201-211, 2000.

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

BICKERSTAFFE, R.; NOAKES, D. E.; ANNISON, E. F. Quantitative aspects of fatty acid biohydrogenation, absorption and transfer of milk fat in the lactating goat with special reference to the cis- and trans- isomers of octadecenoate and linoleate. **Journal Biochemistry**, v. 120, p. 607-609, 1972.

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

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

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

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

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

BYERS, F. M.; SCHELLING, G. T. Los lipidos en la nutricion de los rumiantes. In: CHURCH, D. C. **El ruminante: fisiología digestiva y nutricion**. Zaragoza: Acribia, 1993. Cap 15.

CALDER, P. C.; YAQOOB, P.; THIES, F.; WALLACE, F. A.; MILES, E. A. Fatty acids and lymphocyte functions. **British Journal Nutrition**, v. 87, p. s31–s48, 2002.

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

CANT, J. P.; DePETERS, E. J.; BALDWIN, R. L. Mammary amino acid utilization in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 762-774, 1993.

CARVALHO, I. P. C. **Fontes lipídicas na terminação de novilhos de corte em pastejo**. 2012. 97 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2012.

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

CASPER, D. P.; SCHINGOETHE, D. J.; EISENBEISZ, W. A. Response of early lactation cows to diets that vary in ruminal degradability of carbohydrates and amount of fat. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 425–444, 1990.

CERRI, R. L. A.; JUCHEM, S. O.; CHEBEL, R. C.; RUTIGLIANO, H. M.; BRUNO, R. G. S.; GALVÃO, K. N.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and Embryo quality in high-producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 1520-1531, 2009a.

CERRI, R. L. A.; RUTIGLIANO, H. M.; LIMA, F. S.; ARUJO, D. B.; SANTOS, J. E. P. Effect of source of supplemental selenium on uterine health and embryo quality in high-producing dairy cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 1127-1137, 2009b.

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

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

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

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, R. M.; DOREAU, M. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. **Annales de Zootechnie**, v. 49, p. 181-205, 2000.

CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A.; BERNARD, L.; DOREAU, M. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat, **Europe Journal Science Technology**, v.109, p. 828-825, 2007.

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

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. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 2913-2919, 1996.

CHOUINARD, P. Y.; CORNEAU, L.; SAEBO, A.; BUMAN, D. E. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2737-2745, 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. Dairy Science**, v. 81, p. 471-481.1998.

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

CHRISTENSEN, R. A.; CAMERON, M. R.; CLARK, J. H.; DRACKLEY, J. K.; LYNCH, J. M.; BARBANO, D. M. Effects of amount of protein and ruminally protected amino acids in

the diet of dairy cows fed supplemental fat. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1618-1629, 1994.

COELHO, D. T.; ROCHA, J. A. A. **Práticas de processamento de produtos animais**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1977. 79 p.

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

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

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, UK: Oriel Press Limited, 1970. p.545- 565.

DEMEYER, D.; DOREAU, M. Targets and procedures for latering ruminant meat and milk lipid. **Processings of the Nutrition Society**, v. 58, p. 593-607, 1999.

DEPETERS, E. J.; TAYLOR, S. J.; FINLEY, C. M.; FRANKE, A. A.; AGUIRRE, A. Dietary fat and nitrogen composition of milk from lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 1192-1201, 1987.

DERESZ, F.; FERNANDES, A. M.; MATOS, L. L. Utilização da soja-grão crua na alimentação de vacas leiteiras de alta produção. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 25, n. 1, p. 113-124, 1996.

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

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

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

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

DRACKLEY, J. K.; KLUSMEYER, T. H.; TRUSK, A. M.; CLARK, J. H. Infusion of long-chain fatty acids varying in saturation and chain length into the abomasum of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 1517-1526, 1992.

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

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

EIFERT, E. C.; LANA, R. P.; LANNA, D. P. D.; TEIXEIRA, M. A.; ARCURI, P. B.; LEÃO, M. I.; OLIVEIRA, M. V. M.; VALADRES FILHO, S. C. Perfil de ácidos graxos e conteúdo de ácido linolêico conjugado no leite de vacas alimentadas com a combinação de óleo de soja e fontes de carboidratos na dieta. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 35, n. 4, p. 1829-1837, 2006.

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

ERICKSON, P. S.; MURPHY, M. R.; CLARK, J. H. Supplementation of dairy cow diets with calcium salts of long-chain fatty acids and nicotinic acid in early lactation. **Journal Dairy Science**, v. 75, p. 1078-1089, 1992.

ERWIN, E. S.; MARCO, G. J.; EMERY, E. M. Volatile fatty acid analyses of blood and rumen fluid by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v. 44, n. 9, p. 1768-1777, 1961.

EVANS, M.; BROWN, J.; MCINTOSH, M. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. **Journal Nutrition Biochemistry**, v. 13, p. 508, 2002.

FALDET, M. A.; SATTER, L. D. feeding heat-treated full fat soybeans to cows to early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3047-3054, 1991.

FAY, J. P.; JAKOBER, K. D.; CHENG, K. J.; COSTERTON, J. W. Esterase activity of purê of rumen bacteria as expressed by the hydrolysis of p-nitrophenylpalmitate, **Canadian Journal Microbial**, v. 17, n. 12, p. 36585, 1990.

FEARON, A. M.; KILPATRICK, D. J. Preliminary investigation of the influence of dietary protected lipid supplements on the characteristics of cows' milk fat. **Journal Science Food Agriculture**, v. 55, p. 153-158, 1991.

FENG, S.; LOCK, A. L.; GARNSWORTHY, P. C. A rapid method for determining fatty acid composition of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3785-3788, 2004.

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

FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Dairy chemistry and biochemistry**. Great Britain: Blackie Academic & Professional, 1998. p. 67-145.

FREITAS JR., J. E. **Fontes de gordura na dieta de vacas em lactação**. 2012. 120 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, SP, 2012.

FREITAS JR., J. E. **Utilização de fontes de gordura em rações de vacas leiteiras**. 2008. 93 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

FREITAS JR., J. E.; RENNO, F. P.; SANTOS, M. V.; GANDRA, J. R.; MATURANA FILHO, M.; VENTURELI, B. C. Productive performance and composition of milk protein fraction in dairy cows supplemented with fat sources, **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 39, n. 4, p. 845-852, 2010.

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

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. In: BERCHIELLI, T. T. (Ed.). **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, 2006. p. 583.

GANDRA, J. R. **Fontes de ácidos graxos ômega 3 e 6 em dietas de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação**. 2012. 120 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2012.

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

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

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

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

GONZÁLEZ-RONQUILLO, M.; BALCELLS, J.; GUADA, J. A. Purine derivative excretion in dairy cows: Endogenous excretion and the effect of exogenous nucleic acid supply. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1282-1291, 2003.

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

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

GRUMMER, R. R.; LUCK, M. L. Lactational performance of dairy cows fed raw soybeans, with or without animal by-product proteins, or roasted soybeans. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1354-1359, 1994.

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

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1081-1091, 2006a.

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

HARVATINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of fatty acid supplements on ruminal and total tract nutrient digestion in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1092-1103, 2006c.

HAWKE, J. C.; SILCOCK, W. R. The in vitro rates of lipolysis and biohydrogenation in rumen contents. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 112, p. 201-218, 1970.

HENDERSON, C.; HODGKISS, W. An electron microscopic study of *Anaerovibrio lipolytica* (strain 5S) and its lipolytic, **Journal of General Microbiol**, v. 76, n. 2, p. 389-393, 1973.

HOEDEMAEKER, M.; PRANGE, D.; ZERBE, H.; FRANK, J.; DAXENBERGER, A.; MEYER, H. H. D. Periparturient propylene glycol supplementation and metabolism, animal health, fertility, and production in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 2136-2145, 2004.

HUTJENS, M. F.; SCHULTZ, L. H. addition of soybeans or methionine analog to high concentration rations for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 11, p. 1637-1641, 1971.

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

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

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

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

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

JOHNSON, R. R.; CLEMENS, E. T.; HINMAN, D. Sub-clinical rumen acidosis and grain processing. **Journal of Dairy Science**, v. 39, p. 241, 1974. (Abstract.).

KEELE, J. W.; ROFFLER, R. E.; BEYERS, K. Z. Ruminant Metabolism in Nonlactating Cows Fed Whole Cottonseed or Extruded Soybeans. **Journal of Animal Science**, v. 67, p. 1612-1622, 1989.

KELLY, L. M.; BAUMAN, D. E. Conjugated linoleic acid: a potent anticarcinogen found in milk fat. in Proceeding Cornell Nutrition Conference., Syracuse, NY: Cornell Univ, 1996. Pages 68:74

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

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

KLUSMEYER, T. H.; LYNCH, G. L.; CLARK, J. H.; NELSON, D. R. Effects of calcium salts of fatty acids and proportion of forage in diet on ruminal fermentation and nutrient flow to duodenum of cows. **Journal Dairy Science**, v. 74, p. 222-2232, 1991b.

KLUSMEYER, T. H.; LYNCH, G. L.; CLARK, J. H.; NELSON, D. R. Effects of calcium salts of fatty acids and protein source on ruminal fermentation and nutrient flow to duodenum of cows. **Journal Dairy Science**, v. 74, p. 2206-2219, 1991a.

KNUDSEN, J.; HANSEN, H. O.; MIKKELSEN, J. M. Medium-chain fatty acids synthesis. **Biochemical Society Transaction**, v. 14, n. 3, p. 575-576, 1986.

KOVÁCS, P. L.; SÜDEKUM, K. H.; STANGASSINGER, M. Effects of intake of a mixed diet and time postfeeding on amount and fiber composition of ruminal and fecal particles and digesta passage from the reticulo-rumen of steers. **Animal Feed Science and Technology**, v. 71, p. 325-340, 1998.

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

KRONFELD, D. S.; DONOGHUE, S.; NAYLOR, J. M.; JOHNSON, K.; BRADLEY, C. A. Metabolic effects of feeding protected tallow to dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 545-552, 1980.

LANA, R. P.; RUSSELL, J. B. Use of potassium depletion to assess adaptation of ruminal bacteria of ionophores. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 12, p. 4499-4503, 1996.

LATHAM, G. V.; EWING, M.; PRESS, F. **Apollo 16 Preliminary Science Report**. NASA SP-315, 9. Washington, DC: National Aeronautics and Space Administration, 1972.

LAWSON, R. E.; MOSS, A. R.; GIVENS, D. I. The role of dairy products in supplying conjugated linoleic acids to man's diet: a review. **Nutrition Research Reviews**, v. 14, p. 153-172, 2001.

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

LEITE, L. C. **Perfil dos ácidos graxos do leite e metabolismo de lipídios no rúmen de vacas recebendo dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou de peixe**. 2006. 97 p. Tese (doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2006.

LEITE, L. C.; LANNA, D. P. D. Avanços no estudo do metabolismo de lipídeos: Perfil da gordura depositada na carne ou secretada no leite de ruminantes. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL AVANÇOS EM TÉCNICAS DE PESQUISA EM NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 2., 2009, Pirassununga, 2009. v. 1, p. 147-164.

LIN, H.; BOYSLON, T. D.; CHANG, M. J.; SHULTZ, T. D. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. **Journal of Dairy Science**, v. 78, n. 11, p. 2358-2365, 1995.

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

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

LUNDY, F. P.; BLOCK, E.; BRIDGES JR., W. C.; BERTRAND, J. A.; JENKINS, T. C. Ruminal biohydrogenation in holstein cows fed soybean fatty acids as amides or calcium salts. **Journal Dairy Science**, v. 87, p. 1038–1046, 2004.

MAIA, M. R. G.; CHAUDHARY, L. C.; FIGUERES, L.; WALLACE R. J. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 97, p. 303-314, 2007.

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

MEDEIROS, S. R.; OLIVEIRA, D. E.; AROEIRA, L. J. M.; MCGUIRE, M. A.; BAUMAN, D. E.; LANNA, D. P. D. The effect of long-term supplementation of conjugated linoleic acid (CLA) to dairy cows grazing tropical pasture. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 169, 2000. Supplement, 1.

MIELKE, C. D.; SHINGOETHE, D. J. Heat-treated soybeans for lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 1579, 1981.

MOALLEM, U.; KATZ, M.; ARIELI, A.; LIVSHITZ, S.; YAKOB, Y. Effects of peripartum propylene glycol or fats differing in fatty acid profiles on feed intake, production, and plasma metabolites in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3846-3856, 2007.

MOHAMED, O. E.; SATTER, L. D.; GRUMMER, R. R.; EHLE, F. R. Influence of dietary cottonseed and soybeans on milk production and composition. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 71, n. 12, p. 2677, 1988.

MORA, P. J. G.; LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C. Grão de soja em rações para vacas lactantes: consumo dos nutrientes, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 25, n. 2, p. 369-381, 1996.

NAGARAJA, T. G.; NEWBOLD, C. J.; Van NEVEL, C. J. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. 2. ed. Great Britain: Blackie Academic & Professional, 1997. p. 524-632.

NIEMEYER, H. Bioquímica. In: NIEMEYER, H. (Ed.) **Metabolismo de los lípidos**. 2. ed. Zaragoza: Inter-Médica. p. 72-91, 1978.

NOBLE, R. C. Digestion, transport and absorption of lipids. In: CHRISTIE, W. W. (Ed.). **Lipid metabolism in ruminant animals**. Oxford, UK: Pergamon Press Ltd., 1981. p. 57-93.

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

NÖRNBERG, J. L.; LÓPEZ, J.; STUMPF JÚNIOR, W.; COSTA, B. P.; SCHAFL—USER JÚNIOR, J. Different rumen-inert fatty acids supplemented with a dietary antioxidant on performance and antioxidative status of early-lactation cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 6, 2010.

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

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

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

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

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

ONETTI, S. G.; SHAVER, R. D.; MCGUIRE, M. A.; GRUMMER, R. R. Effect of type and level of dietary fat on rumen fermentation and performance of dairy cows fed corn silage

based diets. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2751-2759 2001.

ORELLANA-BOERO, P.; BALCELLS, J.; MARTÍN-ORÚE, S. M.; LIANG, J. B.; GUADA, J. A. Excretion of purine derivatives in cows: endogenous contribution and recovery of exogenous purine bases, **Livestock Production Science**, v.68, p. 243-250, 2001.

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

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

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

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

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

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

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

PARODI, P. W. Conjugated linoleic acid: an anticarcinogenic fatty acid present in milk. Australia. **Dairy Technology**, v. 49, p. 93-97, 1994.

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

PEREIRA, C. M. A.; SILVA, J. F.C.; VALADARES FILHO, S. C.; CAMPOS, J. M. S.; CECON, P. R. Grão de soja moído na ração de vacas em lactação. 1. Consumo e digestibilidade dos nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 6, p. 1218-1224, 1998.

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

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

QIU, X.; EASTRIDGE, M. L.; FIRKINS, J. L. Effects of dry matter intake, addition of buffer, and source of fat on duodenal flow and concentration of conjugated linoleic acid and *trans*-11 C18:1 in Milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 12, p. 10, 2004.

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

RECCE, W. O. **Dukes, fisiologia dos animais domésticos**. 10. ed. Rio de Janeiro: Ed. Koognan, 2007.

REIDELBERGER, R. D. Cholecystokinin and control of food intake. **Journal Nutrition**, v. 124, p. 1327-1333, 1994.

RENNÓ, F. P.; FREITAS JÚNIOR, J. E.; GANDRA, J. F. R.; BARLETTA, R. V.; NAVES, A. B.; GAMEIRO, A. H.; VERDURICO, L. C. Grão de soja na alimentação de vacas leiteiras. In: SANTOS, M.V.; RENNO, F. P.; SILVA, L. F. P.; ALBUQUERQUE, R. **Novos desafios da pesquisa em nutrição e produção animal**. Pirassununga: Ed. 5D, 2009. v. 1, p. 191-214.

RENNÓ, F. P.; FREITAS JUNIOR, J. E.; GANDRA, J. R.; MATURANA FILHO, M.; VERDURICO, L. C.; RENNO, L. N.; BARLETTA, R. V. Effect of unsaturated fatty acid supplementation on digestion, metabolism and nutrient balance in dairy cows during the transition period and early lactation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, p. 212-223, 2014.

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

ROMO, G. A.; ERDMAN, R. A.; TETER, B. B.; SAMPUGNA, J.; CASPER, D. P. Milk composition and apparent digestibilities of dietary fatty acids in lactating dairy cows abomasally infused with *cis* or *trans* fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 2609-2619, 2000.

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

SCHARRER, E.; LANGHANS, W. Control of food intake by fatty acid oxidation. **American Journal Physiology**, v. 250, n. 6, pt. 2, p. R1003-R1006, 1986.

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

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

SCOTT, T. A.; COMBS, D. K.; GRUMMER, R. R. Effects of roasting, extrusion, and particle size on the feeding value of soybeans for dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 25-55, 1991.

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

SILVESTRE, F. T.; CARVALHO, T. S. M.; CRAWFORD, P. C.; SANTOS, J. E. P.; STAPLES, C. R.; JENKINS, T.; THATCHER, W. W. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: II. Neutrophil fatty acids and function, and acute phase proteins. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 2285–2301, 2011.

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

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

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

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

STENSON, W. F.; CORT, D.; RODGERS, J.; BURAKOFF, R.; DESCHRYVER-KECSKEMETI, K.; GRAMLICH, T. L.; BEEKEN, W. Dietary supplementation with fish oil in ulcerative colitis. **Annals of Internal Medicine**, v. 116, p. 609–614, 1992

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

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

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

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

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

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON, P. N. **The ruminal microbial ecosystem**. Essex: elsevier, 1988. p. 387-443.

- VAN SOEST, P. J.; MASON, V. C. The influence of Maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds, **Animal Feed Science and Technology**, v. 32, n. 1, p. 45-53, 1991.
- VARGAS, L. H.; LANA, R. P.; JHAM, G. N.; SANTOS, F. L.; QUEIROZ, A. C.; MANCIO, A. B. Adição de lipídios na ração de vacas leiteiras: parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do leite. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 522-529, 2002
- VASCONCELOS, A. M.; LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; DIAS, M.; MORAIS, D. A. E. F. Parâmetros ruminais, balanço de compostos nitrogenados e produção microbiana de vacas leiteiras alimentadas com soja e seus subprodutos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 2, p. 425-433, 2010.
- WALDO, D. R.; SMITH, L. W.; COX, E. L. Model of cellulose disappearance from the rumen, **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 55, n. 1, p. 125-129, 1972.
- WANG , Y. M.; WANG , J. H .; WANG , C.; CHEN , B.; LIU , J. X.; CAO , H.; GUO , F. C.; VAZQUEZ-ANON, M. Effect of different rumen-inert fatty acids supplemented with a dietary antioxidant on performance and antioxidative status of early-lactation cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 15, 2010.
- 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**, v. 87, p. 1446-1454, 2004.
- WEISS, W. P.; CONRAD, H. R.; PIERRE, N. R. S. T. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates, **Animal Feed Science Technology**, v. 39, p. 95-110, 1992.
- WILLIAMS, C. H.; DAVID, D. J.; IISMA, O. A. The determination of chromic oxide in feces samples by atomic absorption spectrophotometry, **Journal Agriculture Science**, v. 59, p. 381-385, 1962.
- WOLFINGER R. Covariance structure selection in general mixed models. **Commun, Statist-Simula**, v. 22, p. 1079-1106, 1993
- WONSIL, B. J.; HERBEIN, J. H.; WATKINS, B. A. Dietary and ruminally derived *trans*-18:1 fatty acids alter bovine milk lipids. **Journal of Nutrition**, v. 124, p. 556-565, 1994.
- WU, Z.; HUBER, J. T. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: a review. **Livestock Production Science**, v. 39, p. 141-155, 1993.
- WU, Z.; HUBER, J. T.; CHAN, S. C.; SIMAS, J. M.; CHEN, K. H.; VARELA, J. G.; SANTOS, C.; FONTES JR., C.; YU, P. Effect of source and amount of supplemental fat on lactation and digestion in cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 1644-1651, 1994.
- WU, Z.; OHAJURUKA, O. A.; PALMQUIST, D. L. Ruminant synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3025-3034, 1991.

ZHENG, H. C.; LIU, J. X.; YAO, J. H.; YUAN, Q.; YE, H. W.; WU, Y. M. Effects of dietary sources of vegetable oils on performance of high-yielding lactating cows and conjugated linoleic acids in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 350 – 370, 2005.