GUSTAVO DELFINO CALOMENI

Avaliação comparativa da suplementação de ácidos graxos saturados e insaturados sobre o desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e metabolismo de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação

Pirassununga

2016

GUSTAVO DELFINO CALOMENI

Avaliação comparativa da suplementação de ácidos graxos saturados e insaturados sobre o desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e metabolismo de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação

Tese apresentado 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

Pirassununga

2016

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.3281
FMVZ

Calomeni, Gustavo Delfino
Avaliação comparativa da suplementação de ácidos graxos saturados e insaturados sobre o desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e metabolismo de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação / Gustavo Delfino Calomeni. -- 2016.
114 f. il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.

1. Desempenho reprodutivo. 2. Gordura. 3. Grão de soja. 4. Produção de leite. 5. n-6. I. Título.

COMISSAO DE BIOETICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação comparativa da suplementação de ácidos graxos saturados e insaturados sobre o desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e metabolismo de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação", protocolado sob o nº 2966/2013, utilizando 36 (trinta e seis) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 10/4/2013.

We certify that the Research "Comparative evaluation of saturated and insaturated fatty acids supplementation during transition period and early lactation on productive performance, oocity and embryo quality, and metabolism of dairy cows ", protocol number 2966/2013, utilizing 36 (thirty-six) dairy cows, under the responsibility Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/10/2013.

São Paulo, 15 de abril de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: CALOMENI, Gustavo Delfino

Título: **Avaliação comparativa da suplementação de ácidos graxos saturados e insaturados sobre o desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e metabolismo de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação**

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: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Claudio e Ligia, por serem os maiores orgulhos que tenho em vida. Vocês me ensinaram grande parte do que sou e são responsáveis por tudo que conquistei.

Aos meus avós Arnaldo e Waldecy e Jorge e Celme, por todo carinho, amor e apoio sempre presentes durante minha vida. Vocês são os modelos de pessoas que eu pretendo ser.

À minha namorada Yasmin, por representar meu alicerce, meu porto seguro, estar sempre presente nas horas mais difíceis e me acolhendo com suas palavras de carinho e abraço acolhedor.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em nome de todos os professores, alunos e funcionários, que durante esses 12 anos contribuíram de forma essencial para minha formação profissional.

Dedico esse trabalho com imensa gratidão

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

...primeiramente a Deus por permitir tudo isso possível.

... a toda minha família, especialmente meus pais, Claudio e Ligia, por estarem sempre do meu lado, me incentivando em cada obstáculo da minha vida. Sem ajuda de vocês nada disso seria possível. Tenho muito orgulho em dizer que sou filho de vocês.

... ao meu irmão Guilherme, a minha cunhada Dessa, ao meu sobrinho Gabriel e ao meu futuro segundo sobrinho Rafael, por todo apoio, incentivo e momentos de alegria.

... à minha namorada Yasmin, aos meus sogros Geraldo e Lucinha e à minha cunha Gabriela, por todos os motivos de descontração, todas as conversas, todos os conselhos. Em pouco tempo vocês se tornaram pessoas muito importantes em minha vida.

... Aos meus fiéis amigos de infância: Caio, Tiago, Kazu, Jota, Jhonny, e aos meus amigos fiés de faculdade Komixão, Gaúcho, Paquito e Ralé. Vocês me ensinaram que cheguei ao mundo com um irmão, mas certamente sairei dele com pelo menos 10.

... ao meu orientador Professor Doutor Francisco Palma Rennó, primeiramente por me dar oportunidade de participar do seu grupo de pesquisa. Agradeço pelos ensinamentos, pela disposição e por todos os conselhos prestados. Foi devido a você que consegui atingir todos meus objetivos no meu mestrado e no meu doutorada e hoje me sinto uma pessoa muito melhor capacitada.

... a todos os alunos pertencentes ao grupo de pesquisa do Laboratório de Pesquisa de Bovinos de Leite. Todo o trabalho foi árduo e só foi possível com a ajuda de cada um de vocês.

.... À Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e ao Departamento de Nutrição e Produção Animal. É um grande orgulho fazer parte desse departamento e da faculdade na qual me formei.

... aos funcionários do nosso laboratório (LPBL). A ajuda de vocês é fundamental para nosso trabalho, e realização de nossos estudos deve muito crédito a vocês.

... ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, por toda a amizade e por toda colaboração durante minha graduação e pós-graduação. O senhor sempre foi e sempre será um exemplo profissional para mim.

... aos alunos de iniciação científica e estagiários que tanto me ajudaram durante às diferentes fases do meu experimento.

... aos funcionários dos laboratórios em que realizei minhas análises.

... a secretaria da pós-graduação, em especial ao JP (João Paulo) e Alessandra.

... a todos os professores do VNP que contribuíram muito para meu crescimento intelectual e pessoal.

... aos amigos do Recanto do Cavaleiro, por todos os momentos juntos vividos, por todo aprendizado pessoal e profissional.

... à família Cavalcante, em especial ao Daniel, pela confiança, ensinamentos, e oportunidades abertas.

... a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram com a realização desse projeto.

"*Queira, basta ser sincero e desejar profundo, que você será capaz de sacudir o mundo"*

Raul Seixas/Paulo Coelho

"Seja você a *mudança* que *quer ver no mundo"*

Mahatma Gandhi.

RESUMO

CALOMENI, G. D. **Avaliação comparativa da suplementação de ácidos graxos saturados e insaturados sobre o desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e metabolismo de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação**. [Comparative evaluation of saturated and unsaturated fatty acids on productive performance, embryo and oocyte quality, and blood profile of dairy cows throughout the transition period and early lactation]. 2016. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Objetivou-se avaliar a suplementação dietética de ácidos graxos saturados e insaturados sobre o metabolismo, e desempenhos produtivo e reprodutivo no período de transição e início de lactação de vacas leiteiras. Foram utilizadas 36 vacas da raça holandesa distribuídas aleatoriamente para receber uma das três dietas experimentais. No período pré-parto as dietas foram: Controle (CON), sem adição de gordura e 2,8% de extrato etéreo baseado na matéria seca; Gordura Saturada (SAT), com inclusão de 2,4% de MAGNAPAC® (Tectron Ltda.) com 4,7% de EE baseado na MS; Gordura Insaturada (INS), com inclusão de 11% de grão de Soja, com 4,7% de EE baseado na MS. No período pós-parto, Controle (CON), sem adição de gordura e com 2,8% de EE baseado na MS; Gordura Saturada (SAT), com inclusão de 2,6% de MAGNAPAC® (Tectron Ltda.) com 5,0% de EE baseado na MS; Gordura Insaturada (INS), com inclusão de 13% de Grão de Soja, com 5% de EE baseado na MS. As dietas foram fornecidas 35 dias da data prevista do parto até 90 dias de lactação. No período pré-parto foi utilizada silagem de milho como volumoso, em uma relação volumoso:concentrado de 70:30, enquanto que no período pós-parto foram utilizados 5% de feno de tifton e 45% de silagem de milho como fontes de volumoso, com uma relação entre volumoso:concentrado de 50:50. A produção de leite foi mensurada diariamente durante todo o período experimental. As amostras utilizadas para análise da composição e o perfil de ácidos graxos do leite foram coletadas semanalmente, sendo provenientes das duas ordenhas diárias. As amostras de sangue para análise dos metabólitos sanguíneos foram coletadas semanalmente. Do dia 14 ao dia 90 pós-parto foi realizado avaliação da dinâmica folicular por ultrassonografia. Nos dias 30, 60 e 90 foram realizadas aspirações foliculares, com posterior fertilização in vitro dos oócitos. Todas as variáveis mensuradas foram avaliadas pelo procedimento PROC MIXED do SAS (2004) utilizando-se os seguintes contrastes ortogonais: Controle vs Fontes de Lipídeo (C1); Fonte de ácidos graxos saturados x Fonte de ácidos graxos insaturados (C2). Foi utilizado nível de 5% de significância. No período pós-parto, a suplementação de lipídeos aumentou as concentrações de AGNE quando comparada a dieta CON. O tratamento INS reduziu as concentrações de proteínas totais e de BHB quando comparado ao SAT. Houve interação entre tempo e dieta

paras as variáveis colesterol total, LDL e BHB. Houve redução da produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, na produção total de gordura e de proteína, e no teor de gordura do leite quando comparado o tratamento INS com o SAT. A suplementação de lipídeo reduziu as concentrações do somatório dos ácidos graxos saturados (Σ A.G. Saturados), dos ácidos graxos com menos de 16 carbonos (>C16), e da relação entre ácidos graxos saturados com insaturados (Σ SFA/(MUFA+PUFA)); e aumentou as concentrações de ácidos graxos acima de 16 carbonos (>C16), de ácidos graxos insaturados com 18 carbonos, da somatória dos ácidos graxos insaturados e dos ácidos graxos poli-insaturados (Σ A.G. Poli-insaturados). O tratamento INS aumentou a concentração de ácidos graxos poli-insaturados totais (Σ A.G. poli-insaturados), e reduziu o total de ácidos graxos de 16 carbonos (C16) em relação ao tratamento SAT. Houve redução no número de folículos classe 1, e folículos totais (NC1 e NTFol) com suplementação de lipídeo. O tratamento SAT aumentou o número de folículos classe 5 (NC5), em relação ao INS. Não houve alteração na qualidade oocitária e embrionária com a suplementação de lipídeo e entre as duas fontes de lipídeo. A suplementação de lipídeos insaturados através da suplementação via grão de soja cru e integral, quando comparada à suplementação de lipídeos saturados, para vacas no período de transição e início de lactação, não interferiu na dinâmica folicular e qualidade oocitária e embrionária; e reduziu o desempenho produtivo, devido às reduções na produção de gordura do leite a na produção de leite corrigida para 3,5% dos animais suplementados.

Palavras chaves: Desempenho reprodutivo. Gordura. Grão de soja. Produção de leite. n-6.

ABSTRACT

CALOMENI, G. D. **Comparative evaluation of saturated and unsaturated fatty acids on productive performance, embryo and oocyte quality, and blood profile of dairy cows throughout the transition period and early lactation** [Avaliação comparativa da suplementação de ácidos graxos saturados e insaturados sobre o desempenho produtivo, qualidade oocitária e embrionária, e metabolismo de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação]. 2016. 114 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The aim of the current experiment was to evaluate the saturated and unsaturated fatty acid supplementation effects on metabolism, productive and reproductive performance during the transition period and early lactation of dairy cows. Thirty-six Holstein cows were randomly distributed to one of three experimental treatments. Throughout the pre-partum period cows received: Control (CON), no fat supplement with 2.8% of ether extract (EE) on DM basis; Saturated fat (SAT) – MAGNAPAC® (Tectron Ltda.), addition of 2.4% of MAGNAPAC and 4.7% of EE on DM basis; Unsaturated fat (UNS) – Whole soybeans, addition of 11% of whole raw soybeans and 4.7% of EE in DM basis. In post-partum period the diets follows: Control (CON), no fat supplementation with 2.8% of ether extract (EE) in DM basis; Saturated fat (SAT) – MAGNAPAC ® (Tectron Ltda.), addition of 2.6% of MAGNAPAC and 5.0% of EE in DM basis; Unsaturated fat (UNS) – Whole soybeans, addition of 13% of whole raw soybeans and 5.0% of EE in DM Basis. The treatments were supplied from day 35 of expect calving date until 90 days in milk. During the pre-partum period, diet forage to concentrate ratio was 70:30, in which corn silage was used as the forage source. During the post-partum period, diet forage to concentrate ratio was 50:50, in which Tifton hay (5%) and corn silage (45%) were used as forage sources. The milk yield was daily measured during all experimental period. The samples used for milk composition and milk fatty acid profile were collected once a week, milk from the morning and evening milking being mixed proportionally to the milk yield. Blood samples for metabolites analysis were collected weekly before the morning feeding. Follicular dynamic was monitored by trans ´rectal ultrasonography form 14 until 90 days in milk. Ovum pick-up and in vitro fertilization were performed on days 30, 60, 90 post-partum. Data were analyzed using the PROC MIXED procedure of SAS (2004). Differences among treatments were evaluated by orthogonal contrasts as follows: Control vs Fat sources (C1), and Saturated fatty acid source vs Unsaturated fatty acid source (C2). Significance level was set at 5%. In post-partum, fat supplementation increased NEFA concentrations when compared to control diet.

The UNS treatment reduced total protein concentration in blood compared to SAT. Diet*time interaction effect was observed in total cholesterol, LDL and BHB. The UNS decreased fat corrected milk, fat content, milk protein and fat yield compared to SAT. Fat supplementation decreased Σ Saturated F.A, fatty acids lower than 16 C and the relationship between saturated and unsaturated fatty acids, and increased the concentration of fatty acids higher than 16 C, unsaturated fatty acids with 18 C, and Σ PUFA. UNS increased Σ PUFA and decreased fatty acids with 16 C, when compared to SAT. Fat supplementation decreased class 1 follicle and total follicles. Treatments did not affect embryo and oocyte quality. Supplementation of unsaturated fat, through supplementation of whole raw soybean for cows in the transition period and early lactation did not affect the reproductive performance (follicular dynamics and oocyte and embryo quality) and reduced the productive performance due to decrease of milk fat production and fat corrected milk for 3.5% of the supplemented animals.

Keywords: Reproductive performance. Fat. Soybean. Milk yeld. n-6.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição bromatológica dos ingredientes.....58
Tabela 2 - Composição percentual de ingredientes nos concentrados experimentais.....59
Tabela 3 - Composição de ingredientes e bromatológica das dietas experimentais.....60
Tabela 4 - Parâmetros Sanguíneos de acordo com as dietas experimentais.....70
Tabela 5 - Média (±EPM) da produção e composição do leite de acordo com as dietas experimentais 83
Tabela 6 - Perfil de ácido graxos do leite de acordo com as dietas experimentais – Análise individual.....88
Tabela 7 - Perfil de ácido graxos do leite de acordo com as dietas experimentais – Análise em grupo 90
Tabela 8 - População folicular de acordo com as dietas experimentais.....94
Tabela 9 - Intervalo parto-1°ovulação, área do corpo lúteo, e número de ondas foliculares de acordo com as dietas experimentais.....99
Tabela 10 - Qualidade oocitária e embrionária de acordo com as dietas experimentais.....100

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Colesterol Total (A) e colesterol HDl (B) de acordo com as dietas experimentais 73
Gráfico 2 - Colesterol LDL (A) e colesterol VLDL (B) de acordo com as dietas experimentais 74
Gráfico 3 - Triglicerídeos (A) e proteínas totais (B) de acordo com as dietas experimentais 75
Gráfico 4 - Glicose (A) e ureia (B) de acordo com as dietas experimentais 76
Gráfico 5 - AST (A) e GGT (B) de acordo com as dietas experimentais 77
Gráfico 6 - AGNE (A) e BHB (B) de acordo com as dietas experimentais 78
Gráfico 7 - Produção de leite (A) e produção de leite corrigida (B) de acordo com as dietas experimentais 83
Gráfico 8 - Teor de gordura (A) e produção de gordura (B) de acordo com as dietas experimentais 84
Gráfico 9 - Teor de proteína (A) e produção de proteína (B) de acordo com as dietas experimentais 85
Gráfico 10 - Número de folículos classe 1 (A), Número de folículos classe 2 (B), Número de folículos classe 3 (C) de acordo com as dietas experimentais 96
Gráfico 11 - Número de folículos classe 4 (A), Número de folículos classe 5 (B), Número total de folículos (C), de acordo com as dietas experimentais 97
Gráfico 12 - Qualidade oocitária (A) e qualidade embrionária (B) de acordo com as dietas experimentais 101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Biohidrogenação ruminal dos ácidos linoléico e linolênico, pelos grupos A e B de bactérias 32

Figura 2 - Rota principal e alternativa para biohidrogenação do ácido linoleico 33

ABREVIAÇÕES

AG	Ácido Graxo
AGs	Ácidos Graxos
AGCL	Ácidos Graxos de Cadeia Longa
AGI	Ácido Graxo Insaturado
AGIs	Ácidos Graxos Insaturados
AGLs	Ácidos Graxos Livres
AGNE	Ácidos Graxos não esterificados
AGPI	Ácido Graxo Poli-insaturado
AGPIs	Ácidos Graxos Poli-insaturados
AGS	Ácido Graxo Saturado
AGSs	Ácidos Graxos Saturados
BE	Balanço Energético
BEN	Balanço Energético Negativo
BHB	Betahidroxibutirato
Ca-AGs	Sais de Cálcio de ácidos graxos
CMS	Consumo de matéria seca
CNF	Carboidrato não fibroso
DEL	Dias em lactação
DHA	Ácido docosahexaenóico
EE	Extrato Etéreo
EPA	Ácidos eicosapentaenoico
FIV	Fertilização *in vitro*
GSI	Grão de soja integral
HDL	Colesterol de alta densidade
LDL	Colesterol de baixa densidade
MIV	Maturação oocitária *in vitro*
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
OPU	Aspiração folicular
PB	Proteína bruta
VLDL	Lipoproteína de muita baixa densidade
n-3	Ômega 3
n-6	Ômega 6

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 20

2 HIPÓTESE 24

3 OBJETIVOS 25

4 REVISÃO DE LITERATURA 26

4.1 PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO EM VACAS LEITEIRAS 26

4.2 NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO 28

4.3 UTILIZAÇÃO DE LIPÍDEOS NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO 29

4.3.1 **Metabolismo dos Ácidos Graxos** 30

4.3.2 **Ácidos Graxos Insaturados e Metabolismo Ruminal** 31

4.4 FONTES DE LIPÍDEOS INERTES NO RÚMEN 35

4.4.1 **Sais de Cálcio** 35

4.4.2 **Grão de Soja** 37

4.5 FONTES DE LIPÍDEOS E O DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS 40

4.5.1 **Produção e Composição do Leite** 40

4.5.2 **Perfil Metabólico** 46

4.6 FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS E A REPRODUÇÃO DE VACAS LEITEIRAS 48

4.6.1 **Síntese de Prostaglandinas e Saúde Uterina Pós-Parto** 49

4.6.2 **Dinâmica Folicular** 50

4.6.3 **Função Luteal e a Progesterona** 51

4.6.4 **Qualidade Oocitária e Embrionária** 51

4.6.5 **Fertilidade** 53

5 MATERIAL E MÉTODOS 55

5.1 LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS 55
5.2 DIETAS EXPERIMENTAIS E ANÁLISE DE ALIMENTOS 56
5.3 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE 61
5.4 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS 61
5.5 ULTRASSONOGRAFIA OVARIANA 62
5.6 QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA 63
5.7 METABÓLITOS PLASMÁTICOS 66
5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 67
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO 69
6.1 PARÂMETROS SANGUÍNEOS 69
6.2 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE 79
6.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE 87
6.4 DINÂMICA FOLICULAR 93
6.5 QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA 100
7 **CONCLUSÃO 103**
REFERÊNCIAS 104

1 INTRODUÇÃO

O período de transição é considerado o período de tempo compreendido das últimas três semanas anteriores ao parto até as três primeiras semanas de lactação (GRUMMER, 1995). Esse período é caracterizado por grandes mudanças nas demandas de nutrientes no organismo da vaca leiteira, sendo necessárias coordenadas alterações no metabolismo animal para atender suas exigências nutricionais (BELL, 1995). Após o parto, a produção de leite e o consumo de alimentos aumentam consideravelmente, no entanto, a velocidade de aumento na produção de leite é maior do que a velocidade de aumento de consumo de alimentos e, consequentemente, de nutrientes (TAMMINGA et al., 1997). Devido a essa assincronia entre a demanda e a disponibilidade de nutrientes no final de gestação e início de lactação, vacas leiteiras são submetidas a períodos de balanço negativo de nutrientes, principalmente energia, proteína e cálcio (BELL, 1995).

Para atender as exigências nutricionais de energia durante o período de transição, vacas leiteiras mobilizam grandes quantidades de ácidos graxos do tecido adiposo, resultando em aumento na concentração de ácidos graxos não-esterificados (AGNE) na corrente sanguínea (DRACKLEY, 1999). Os AGNE presentes na corrente sanguínea podem ser utilizados por diversos tecidos corporais para a geração de energia (economia na utilização de glicose) e incorporados na gordura do leite, em nível de glândula mamária. Em nível hepático, podem ser oxidados completa ou parcialmente, esterificados ou exportados como lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (GRUMMER, 1993). O fígado aparentemente metaboliza os AGNE de acordo com a proporção de seu suprimento via corrente sanguínea, resultantes da mobilização de reservas corporais (EMERY et al., 1992).

No entanto, a capacidade hepática de oxidação de ácidos graxos e exportação de VLDL são relativamente baixas em ruminantes (GRUMMER, 1993). Assim, o excesso de AGNE em nível hepático, resultantes da excessiva mobilização de reservas corporais de vacas leiteiras durante o período de transição e início da lactação, pode exceder a capacidade hepática de metabolização desses ácidos graxos, resultando no armazenamento hepático de triglicerídeos (oriundos da esterificação dos AGNE), levando os animais ao desenvolvimento de fígado gorduroso (acúmulo de triglicerídeos no parênquima hepático) (DRACKLEY, 1999). O acúmulo de triglicerídeos no parênquima hepático reduz a capacidade hepática de

gliconeogênese a partir do propionato, o principal precursor de glicose em ruminantes (CADORNIGA-VALINO et al., 1997; OVERTON et al., 1999). Somado a isso, Leroy et al. (2005) detectaram concentrações elevadas de AGNEs no líquido folicular de vacas leiteiras em BEN poucos dias após o parto. Em um estudo *in vitro* os autores demonstraram efeitos prejudiciais no desenvolvimento embrionário quando ovócitos foram maturados em um ambiente com altas concentrações de AGNEs e baixas concentrações de glicose (LEROY et al., 2008). Dessa forma, em BEN excessivo, o animal estará sujeito a alterações nos desempenhos produtivo e reprodutivo.

Pensando na redução do BEN, a suplementação dietética de lipídeos para vacas leiteiras tem sido prática comum na alimentação durante o período de transição, principalmente por permitir melhora no status energético desses animais. A suplementação de gordura nas dietas de vacas de alta produção é frequentemente utilizada durante o pós-parto por aumentar a densidade calórica da dieta sem reduzir o conteúdo de fibras e, assim, promover aumento da ingestão de energia reduzindo o BEN e suas consequências (GRUMMER, 2004).

Quando são adicionadas fontes de lipídeo na dieta de vacas em lactação, normalmente ocorrem aumentos na produção de leite. No entanto, segundo o NRC (2001), as respostas produtivas a suplementação de lipídeo nas dietas de vacas em lactação é dependente da dieta basal, estágio de lactação, balanço energético, composição e quantidade da fonte de lipídeo utilizada. Staples (2001) cita que a resposta produtiva à utilização de lipídeo dietética suplementar para vacas em lactação pode resultar em acréscimos na produção de leite de até 2,0 a 2,5 kg/vaca/dia, desde que os animais estejam adaptados às dietas contendo gordura e tenham tempo suficiente para responderem as dietas ricas em energia. Segundo este autor, a primeira razão para a ocorrência do aumento de produção é que a adição de lipídeo a uma dieta típica para vacas em lactação aumenta a densidade energética dietética, sendo que o consumo diário de energia é usualmente aumentado. Somado a isso, a gordura possui melhor eficiência de utilização do que outras fontes energéticas, onde suas perdas energéticas durante o metabolismo são menores em relação aos demais grãos utilizados em concentrados e aos volumosos.

Entretanto, segundo Grummer (2004), apesar de, em teoria, o principal papel do fornecimento de gordura suplementar na dieta de vacas em lactação seja aumentar o consumo de energia no início da lactação, recentemente alguns estudos tem demonstrado que os ácidos graxos poli-insaturados são mais do que uma fonte energética. Na verdade, são potentes

reguladores do metabolismo, podendo influenciar as funções hepática, adiposa, mamária, alterando também a resposta reprodutiva e imunológica. Essa resposta extra-calórica, conhecida como efeito nutracêutico, no entanto, não é apresentada pela suplementação com ácidos graxos saturados.

Em relação ao desempenho reprodutivo, durante o balanço energético negativo, eventos homeorréticos sustentam as necessidades metabólicas da lactação e, aparentemente, a função da glândula mamária tem prioridade metabólica em relação à função ovariana (STAPLES et al., 1998). Portanto, a função reprodutiva no pós-parto é diretamente dependente da disponibilidade de nutrientes a serem utilizados para a lactação. O retorno à ciclicidade depende da recuperação da função normal do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (BUTLER; SMITH, 1989). Segundo Beam e Butler (1997), o atraso na ovulação pós-parto está diretamente associado ao estado energético da vaca, ou seja, quanto maior o BEN, maior o tempo para retorno a ciclicidade; bem como a efeitos adversos na eficiência reprodutiva subsequente da vaca. Sendo assim, a adição de fontes de lipídeo suplementar na dieta de vacas lactantes é uma alternativa para diminuir o período do balanço energético negativo e maximizar o desempenho reprodutivo no pós-parto (SARTORI; GUARDIEIRO, 2010).

Assim como na glândula mamária, além do efeito energético das lipídeos em geral, a suplementação com fontes de ácidos graxos insaturados influencia diretamente o sistema reprodutivo através de seus respectivos efeitos nutracêutico. Segundo Staples et al. (1998), além do efeito energético, existem vários mecanismos possíveis pelos quais a gordura dietética insaturada pode aumentar a função reprodutiva: 1) aumento da esteroidogênese favorável ao aumento da fertilidade; 2) manipulação da insulina tal que estimule o desenvolvimento folicular ovariano; 3) aumento das concentrações plasmáticas de colesterol que, por sua vez, serve como precursor para síntese de progesterona; 4) influência na produção e liberação da $PGF_{2\alpha}$.

A suplementação com ácidos graxos tem apresentado efeitos benéficos no ovário, oócito, embrião e no útero em vacas leiteiras (BILBY et al., 2006). Com relação às estruturas ovarianas, vacas leiteiras suplementadas com dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados ou que receberam infusão de gordura no abomaso tiveram folículos dominantes maiores (STAPLES et al., 1998; ROBINSON et al., 2002). Da mesma forma, Staples et al. (2000) detectaram um maior tamanho do folículo ovulatório em vacas de leite suplementadas com ácidos graxos poli-insaturados, em comparação às que receberam ácido oleico na dieta. Em outros estudos, maiores folículos pré-ovulatórios também foram relatados em vacas de leite que receberam ácido

linolênico (AMBROSE et al., 2003; BILBY et al., 2006) e linoleico (BILBY et al., 2006) em relação aos grupos controle.

A suplementação com ácidos graxos insaturados tem melhorado qualidade oocitária (ZERON et al., 2002) e embrionária (KOJIMA et al., 1997; CHILDS et al., 2008). Estes efeitos benéficos das fontes de lipídeo, sobre a qualidade oocitária e embrionária, também são relatados por Bilby et al. (2006); Petit et al. (2008) e Cerri et al. (2009).

Outro fator importante, é que em uma revisão, Santos et al. (2008), relataram diversos estudos que demonstraram aumento da progesterona circulante com o fornecimento de ácidos graxos poli-insaturados. A causa da associação observada entre suplementação com lipídeos e maiores concentrações circulantes de hormônios esteroides relatada por diversos autores não está bem definida. Especula-se que por meio da ação dos ácidos graxos poli-insaturados, ocorra aumento da pulsatilidade de LH (HIGHTSHOE et al., 1991), com um consequente aumento no tamanho do folículo pré-ovulatório e subsequente área de corpo lúteo (RAES et al., 2004), ou pela diminuição do metabolismo hepático desses hormônios (HAWKINS et al., 1995

Assim, a utilização de fontes de lipídeo dietética na alimentação de vacas no período de transição e início de lactação pode promover maior absorção de ácidos graxos essenciais, alterando de forma benéfica o metabolismo hepático e a função reprodutiva, além de promover melhor atendimento das exigências nutricionais por meio de maior ingestão de energia, melhorando o desempenho produtivo e reprodutivo de vacas no início de lactação.

2 HIPÓTESE

A suplementação dietética de grão de soja cru e integral como fonte de ácidos graxos poli-insaturados (ω-6), quando comparada à fonte de gordura saturada, influencia positivamente o metabolismo de vacas leiteiras durante o período de transição e início de lactação, com melhoras no perfil metabólico, e otimização do desempenho reprodutivo, sem influenciar a produção de leite.

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar comparativamente a suplementação dietética de ácidos graxos saturados e insaturados sobre o metabolismo, e desempenhos produtivo e reprodutivo no período de transição e início de lactação de vacas leiteiras.

Os objetivos específicos na avaliação do desempenho produtivo foram:

- ✓ Produção e composição do leite;
- ✓ Perfil de ácido graxo no leite;
- ✓ Perfil metabólico.

Os objetivos específicos na avaliação do desempenho reprodutivo foram:

- ✓ Dinâmica folicular;
- ✓ Qualidade oocitária;
- ✓ Qualidade embrionária.

Foram avaliados produção e composição do leite, e perfil de ácidos graxos na gordura do leite; dinâmica folicular, quantificação e classificação de complexos *cummulus* oócito (CCO), quantificação e classificação de embriões *in vitro*; avaliação dos parâmetros plasmáticos de glicose, AGNE, β-hidroxibutirato, colesterol total, colesterol HDL, proteínas totais, albumina, enzimas hepáticas (aspartato aminotransferase, gama-glutamiltransferase) e ureia.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PERÍODO DE TRANSIÇÃO E INÍCIO DE LACTAÇÃO EM VACAS LEITEIRAS

O período compreendido entre as três semanas que antecedem ao parto e as três semanas que sucedem o parto é conhecido como período de transição ou periparto (GRUMMER, 1995), e compreende diversas alterações metabólicas que alteram a vaca de um estado gestante e não lactente, para um estado lactente e não gestante. É um período marcado por grandes alterações metabólicas e hormonais responsáveis por permitir e sustentar o parto e toda a lactação. Essas alterações, as quais são muito mais dramáticas do que em qualquer outra fase produtiva do animal, influenciam diretamente o metabolismo e a utilização de nutrientes pelos diferentes tecidos (GRUMMER, 1995). Esse período é caracterizado por grandes mudanças nas demandas de nutrientes no organismo da vaca leiteira, sendo necessárias coordenadas alterações no metabolismo animal para atender suas exigências nutricionais (BELL, 1995). Nesta fase, o animal apresenta-se em um estado fisiológico conhecido como balanço negativo de nutrientes (BEN), caracterizado por uma exigência maior do que seu aporte nutricional. Nas semanas que antecedem o parto, o aumento das exigências nutricionais causada pela maior taxa de crescimento fetal, somada a reduzida capacidade de ingestão de alimentos causada pela pressão física fetal e possivelmente por causas endócrinas (GRUMMER et al., 1995), inserem o animal nesse *status* de balanço negativo de nutrientes. Esse quadro perpetua-se durante o início de lactação onde a produção de leite e o consumo de alimentos aumentam consideravelmente em vacas leiteiras. No entanto, a velocidade de aumento na produção de leite é maior do que a velocidade de aumento de consumo de alimentos (TAMMINGA et al., 1997). Esse quadro encerra-se com a diminuição fisiológica na produção de leite, porém com continuação no aumento da ingestão de alimentos.

Em função dessa assincronia entre exigência e aporte de nutrientes, vacas leiteiras são submetidas a períodos de balanço negativo de nutrientes, principalmente energia, proteína e cálcio, no final da gestação e no início da lactação (BELL, 1995). Para atender a esse estado de balanço negativo de nutrientes, principalmente do BEN, ocorrem diversas adaptações fisiológicas no organismo do animal. Essas adaptações são responsáveis por atender as

exigências fisiológicas de glicose, aminoácidos, ácidos graxos e cálcio, que possuem respectivamente suas exigências, triplicadas, duplicadas, quintuplicadas e quadruplicadas (BELL, 1995). Essas adaptações ao BEN consistem em orquestradas adaptações principalmente no metabolismo da glicose e de lipídeos. Essas alterações são baseadas na geração de energia a partir de novos compostos (principalmente ácidos graxos), e, ao mesmo tempo, economia na utilização de glicose (energia) por alguns tecidos corporais, principalmente tecidos periféricos como a musculatura esquelética (HERDT, 2000).

Nessa fase, ocorrem adaptações metabólicas no metabolismo da glicose, com aumento na gliconeogênese hepática (REYNOLDS et al., 2003) e redução da oxidação da glicose pelos tecidos periféricos (BENNINK et al., 1972), com intuito de aumentar o aporte de glicose para a lactogênese. Além dessas alterações no metabolismo da glicose, ocorrem também, profundas alterações no metabolismo lipídico do animal. A primeira adaptação nesse metabolismo é a mobilização de gordura corpórea para o atendimento das exigências energéticas durante o período de BEN, resultando em um acúmulo de ácidos graxos não esterificados (AGNE) na corrente sanguínea (DRACKLEY, 1999). Os AGNE presentes na corrente sanguínea podem ser utilizados por diversos tecidos corporais para a geração de energia (economia na utilização de glicose), ou incorporados na gordura do leite, em nível de glândula mamária. Já em nível hepático, podem ser oxidados completa ou parcialmente, esterificados ou exportados como lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (GRUMMER, 1993). Essa condição de BEN dos animais no início de lactação é fisiológica e rotineiramente os animais perdem cerca de 1 ponto de ECC nesta fase, aproximadamente 10 % do peso vivo. Esta mobilização fisiológica pode ser responsável por até 30% da produção de leite nos primeiros 21 dias de lactação (GRUMMER, 1995).

O fígado aparentemente metaboliza os AGNE de acordo com a proporção de seu suprimento via corrente sanguínea, resultantes da mobilização de reservas corporais (EMERY et al., 1992). No entanto, a capacidade hepática de oxidação de ácidos graxos e exportação de VLDL é relativamente baixa em ruminantes (GRUMMER, 1993). Assim, o excesso de AGNE, resultantes da excessiva mobilização de reservas corporais principalmente durante o início de lactação, pode exceder a capacidade de metabolização hepática desses ácidos graxos, resultando no armazenamento hepático de triglicerídeos (oriundos da esterificação dos AGNE), levando os animais ao desenvolvimento de fígado gorduroso (DRACKLEY, 1999). O acúmulo de triglicerídeos no parênquima hepático reduz a capacidade gliconeogênica hepática a partir do proprionato, o principal precursor de glicose em ruminantes (CADORNIGA-VALINO et al.,

1997; OVERTON et al., 1999), o que resultaria em queda no aporte energético para o animal, acentuando o BEN. Dessa forma, o animal estará sujeito a alterações nos desempenhos produtivo e reprodutivo, bem como alterações de saúde, sendo prioridade a identificação de estratégias de manejo que promovam uma redução dessa mobilização das reservas corporais (GRUM et al., 2002; PIRES et al., 2007).

4.2 NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO

Manejo e metabolismo de vacas no período de transição se tornaram os principais focos das pesquisas sob fisiologia e nutrição nos últimos anos (OVERTON; WALDRON, 2004). É reconhecido que diversas desordens metabólicas e queda nos desempenhos produtivo e reprodutivo são decorrências de erros nutricionais durante esse período, sendo estritamente relacionado à severidade da intensidade do BEN. Dessa forma, quanto maior o BEN, maiores serão as reduções nos desempenhos produtivo e reprodutivo dos animais (GRUMMER 1995).

Diversos estudos têm sido realizados com intuito de desenvolver estratégias nutricionais para maximização de ingestão de nutrientes com consequente minimização do BEN. Segundo Butler (2004), manter o consumo de energia no pré-parto até o parto e aumentar rápido no pós-parto seria uma estratégia interessante de minimizar o BEN. Para isso, uma importante estratégia utilizada durante o período pré-parto é o agrupamento de vacas durante o período seco em dois grupos distintos: o primeiro grupo abrange os animais que iniciam o período de repouso que compreende o momento da secagem dos animais até 21 dias antes do parto, denominada fase 1 ou “FAR OFF”; o segundo grupo abrange os animais desde do final da fase 1 até o parto, sendo fornecido nesse período dietas ricas em carboidratos não fibrosos (CNF), e este período é denominado de fase 2 ou “CLOSE UP”. O NRC (2001), preconiza para a fase “FAR OFF” uma dieta com aproximadamente 1,25 Mcal de energia líquida de lactação (Mcal EL_l)/kg de matéria seca (MS), e para a fase “CLOSE UP” uma dieta com aproximadamente 1,62 Mcal EL_l/kg de MS. O aumento da densidade energética pode resultar em maior ingestão de energia durante o peri-parto e diminuição de até 9 vezes o acúmulo de gordura no parênquima hepático (15,0 mg/g de tecido) (VANDEHAAR et al.,1995).

Umas das formas de se atingir esse aumento da densidade da dieta é a utilização de uma maior quantidade de CNF. Somado a esse maior aporte energético existe ainda o conceito de que a maior utilização de CNF nas dietas durante a fase “CLOSE UP” promove maior desenvolvimento das papilas ruminais proporcionando maior absorção dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) produzidos durante a fermentação ruminal (DIRKSEN et al., 1985). Há também uma prévia adaptação da microbiota ruminal, preparando o ambiente do rúmen para a dieta de lactação que em breve será utilizada.

Outra excelente estratégia para aumento da densidade energética das dietas durante a fase “CLOSE UP” e principalmente no início de lactação é a suplementação com lipídeos, e será extensamente discutida durante os posteriores tópicos dessa tese.

4.3 UTILIZAÇÃO DE LIPÍDEOS NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS NO PERÍODO DE TRANSIÇÃO

Os ácidos graxos são compostos de cadeias com hidrocarbonetos variando de 4 a 36 átomos de carbono, podendo ser estas cadeias: ramificadas, que caracterizam a insaturação deste ácido graxo; ou não ramificada, no caso de ácidos graxos saturados. Várias formas de lipídeo normalmente são utilizadas na nutrição de vacas leiteiras, como as oleaginosas, a gordura vegetal e a gordura protegida (CHILLIARD, 1993; NRC, 2001).

A suplementação com lipídeos nas dietas de vacas leiteiras tem sido muito utilizada desde a década de 60. Seu uso é motivado principalmente devido ao seu elevado valor energético (9 cal/g), sendo uma importante estratégia para aumento da densidade energética de dietas com consequente redução do BEN (BERCHIELLI et al., 2011). Os átomos de carbono dos ácidos graxos são mais reduzidos e, portanto liberam 2,25 vezes mais energia em sua oxidação, comparado aos carboidratos (LEHNINGER, 2005). Somado a esse efeito energético, lipídeos presentes nas membranas celulares (fosfolipídeos) possuem um papel importante na regulação do metabolismo (SANTOS et al., 2008). Alterações no comprimento de cadeia, grau de instauração, e posição das duplas ligações possuem grande impacto nas funções desempenhadas pelos ácidos graxos no desempenho produtivo e reprodutivo dos animais (STAPLES et al., 1998; MATTOS et al., 2000). Dessa forma, esses possíveis efeitos com a suplementação lipídica são decorrentes diretamente da fonte utilizada.

4.3.1 Metabolismo dos Ácidos Graxos

Os ácidos graxos, independente do seu grau de instauração, possuem elevado valor energético (9 kcal/g) (BERCHIELLI et al., 2011) e baixo incremento calórico, sendo o seu principal uso, na grande maioria das vezes, como fonte energética, reduzindo a severidade do BEN durante o período de transição.

Semelhante aos monogástricos, nos ruminantes os ácidos graxos que atingem a mucosa intestinal são absorvidos por combinação de difusão simples ou por agentes carregadores auxiliados por proteínas ligadoras a ácidos graxos. Quase 90 % dos lipídeos que atingem o intestino delgado dos ruminantes são ácidos graxos livres ligados à partículas de alimentos, e em menor quantidade fosfolipídeos microbianos e triglicerídeos que escapam do metabolismo ruminal (DOREAU; CHILLIARD, 1997). Uma vez na membrana, os AG são esterificados formando triacilgliceróis. Dentro do complexo de Golgi, os lipídeos são combinados com apoproteínas específicas, formando quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL). Após essa formação, eles prosseguem por exocitose para os ductos linfáticos torácicos, adentrando posteriormente na veia jugular anterior ao coração, e então para a circulação geral. Os quilomícrons e VLDL são transportadores de lipídeos intestinais (alimentar) para os tecidos. A absorção dos ácidos graxos presentes nos quilomícrons e no VLDL é mediada pela lipase lipoprotéica (LPL), enzima essa encontrada nas células epiteliais de diversos tecidos. Dessa forma, os ácidos graxos podem ser utilizados com fonte energética por diversos tecidos (GRUMMER, 1993).

Em nível hepático, o destino normal dos ácidos graxos pode seguir por duas rotas metabólicas distintas: para produção de energia, ou sua incorporação nos triacilgliceróis e fosfolipídeos que serão então exportados para corrente sanguínea como VLDL. Como os ruminantes têm baixa capacidade hepática em sintetizar VLDL, durante períodos de BEN severos a absorção hepática de ácidos graxos excede sua capacidade de exportá-los para corrente sanguínea, ocasionando quadro metabólico conhecido como esteatose hepática (ou fígado gorduroso).

Para geração de energia, os ácidos graxos precisam ser oxidados. Para isso, primeiramente, devem ser transportados para dentro das mitocôndrias, processo mediado pelo complexo enzimático carnitina-palmitoil transferase-1 (CPT-1), cuja atividade é regulada pela

concentração de malonil-COA. Quando a insulina e glicose estão disponíveis em concentrações elevadas, a concentração de malonil-CoA é alta e a atividade da CPT-1 é inibida, diminuindo a oxidação dos ácidos graxos. Em situação contrária, isto é, baixas concentrações de glicose e insulina, também a concentração de malonil-CoA é baixa e a atividade CPT-1 é alta. Assim os ácidos graxos são oxidados rapidamente, gerando grandes quantidades de acetato e equivalentes redutores. O acetato é oxidado no ciclo de Krebs, que pode ter sua atividade decrescida em decorrência da elevada concentração de equivalentes redutores ou reduzida disponibilidade de oxalacetato. Sob tais condições, o acetato em excesso é desviado para síntese de acetoacetato, um corpo cetônico. Corpos cetônicos na circulação também são fontes importantes de energia para os músculos e o cérebro. (BERCHIELLI et al., 2006). Dessa forma, os ácidos graxos, independente do seu grau de insaturação, são excelentes fontes de energia para os tecidos hepáticos, muscular, nervoso e adiposo.

4.3.2 Ácidos Graxos Insaturados e Metabolismo Ruminal

A utilização de fontes de lipídeos nas dietas de vacas leiteiras normalmente aumenta a densidade energética da ração, melhorando o desempenho produtivo e reprodutivo dos animais. No entanto, melhoras no desempenho reprodutivo ocorrem algumas vezes, sem que ocorra essa alteração no balanço energético do animal (STAPLES et al., 1998). Esse efeito extra-calórico é conhecido como efeito nutracêutico, e é mediado pela composição da fonte de lipídeo (SANTOS et al., 2008). É notório o efeito energético apresentado por todos ácidos graxos, e quanto maior sua cadeia de carbonos maior será seu potencial energético. No entanto, efeitos extra-calóricos são apresentadas apenas por ácidos graxos que possuem dentro da sua cadeia de carbono, duplas ligações, e o grau de instauração bem como o posicionamento dessas duplas ligações é o que dita o seu papel na regulação dos diversos metabolismos (MATTOS et al., 2000).

Dentre os ácidos graxos existentes, o ácido linoleico (C18:2), tem apresentado resultados promissores como regulador de metabolismo (MATTOS et al., 2000; CERRI et al., 2004, 2009). Ele caracteriza-se por possuir uma cadeia com 18 carbonos, duas duplas ligações, sendo que sua primeira dupla ligação localiza-se no carbono 6 a partir da extremidade do grupo metil, compondo a família do n-6 (MATTOS et al., 2000).

Apesar dos possíveis efeitos positivos para os ruminantes com a suplementação com ácidos graxos insaturados, eles possuem efeitos negativos sobre o ambiente ruminal. Certos ácidos graxos, especialmente os poli-insaturados, são tóxicos aos microrganismos ruminais. A toxicidade é relacionada à natureza anfifílica dos ácidos graxos, isto é, aqueles que são solúveis, tanto em água como em solventes orgânicos. Tais ácidos incluem os ácidos graxos insaturados de cadeia longa. Para sua defesa, os microrganismos ruminais desenvolveram um mecanismo de autodefesa chamado de biohidrogenação, que converte ácidos graxos insaturados em saturados, que são consequentemente menos tóxicos (BERCHIELLI et al., 2006).

Por ordem física da digestão, todo o alimento ingerido passa pelo rúmen antes de serem absorvidos pelo epitélio intestinal. Sendo assim o metabolismo ruminal tem influência direta sobre a suplementação de lipídeos. O metabolismo ruminal dos ácidos graxos foi bem estudado e revisado por diversos autores (JENKINS et al., 2008; LOURENCO et al., 2010).

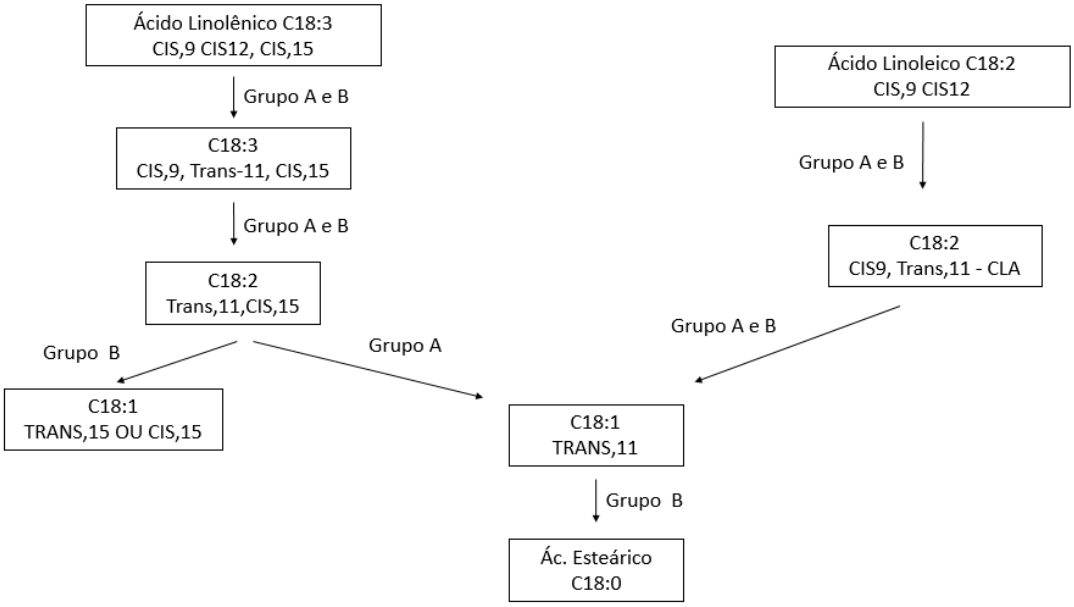
De uma forma geral, o metabolismo ruminal de lipídios pode ser resumido por dois principais processos: lipólise e biohidrogenação de ácidos graxos insaturados (JENKINS, 1993). O processo de lipólise consiste na quebra das ligações éster encontradas nos lipídios dos alimentos da dieta seguida pela biohidrogenação de ácidos graxos insaturados, a qual reduz o número de duplas ligações de ácidos graxos insaturados (AGI) advindos das fontes de lipídeo (JENKINS, 1993; BAUMAN; LOCK, 2006). A hidrólise é predominantemente realizada pelas bactérias ruminais, sendo geralmente alta (>85%) e podendo ser influenciada por alguns fatores, como o nível de lipídeo na ração, pH ruminal e a utilização de ionóforos, que podem inibir a atividade e crescimento de bactérias (DOREAU; CHILLIARD, 1997).

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

O primeiro esquema sobre a teoria da biohidrogenação foi proposta por Davis e Brown (1970), e elaborada por Pennington e Davis (1975). Após hidrólise os ácidos graxos poli-insaturados 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 linoleico, formão AG *cis*-9, *trans*-11, ou ácido linoleico conjugado (CLA) (Figura 1).

Figure 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).

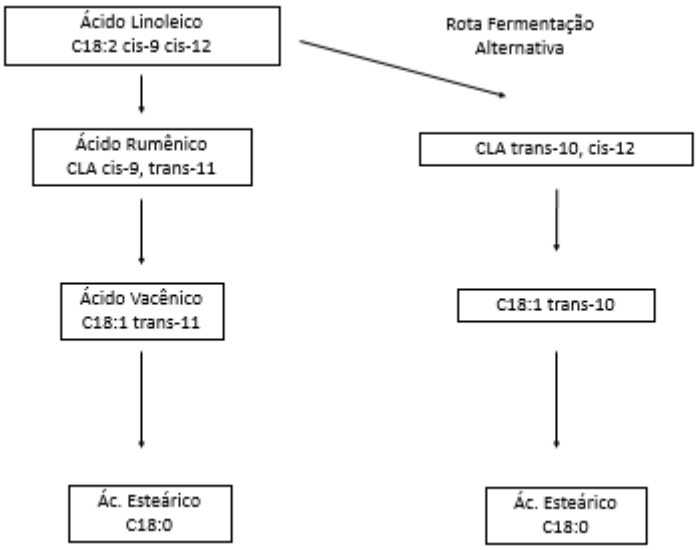
Em seguida, a dupla ligação *cis*-9 é hidrogenada, produzindo c18:1 *trans*-11 e c18:2 *trans*-11, *cis*-15 para os ácidos linoleico e linolênico, respectivamente. O c18:2 *trans*-11, *cis*-15 sofre uma hidrogenação na dupla ligação *cis*-15, produzindo também c18:1 *trans*-11, o qual é também hidrogenado na $c_{18:1}$ *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; LANOER, 1984). É preciso enfatizar que para se obter completa biohidrogenação de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) ambos os grupos de bactérias são geralmente necessários.

A ação específica de diferentes grupos microbianos (*A* e *B*) na hidrogenação de lipídios no rúmen é demonstrada na figura 1. O grupo *A* hidrogena os ácidos linoleico e linolênico somente a $c_{18:1}$ *trans*-11, já o grupo *B* é capaz de hidrogenar ácidos graxos monoinsaturados a ácido esteárico. A espécie B*utyrivibrio fibrisolvens* tem sido reconhecida como a principal bactéria responsável pela biohidrogenação de ácidos graxos insaturados no rúmen (KEPLER et al., 1970).

Devido à ocorrência do processo de biohidrogenação de AGI no rúmen, os ácidos graxos da dieta sofrem mudanças em sua estrutura química, e o perfil de ácidos graxos que são absorvidos é alterado, sendo na grande maioria ácidos graxos saturados (HAVERTINE; ALLEN, 2006), diminuindo seus efeitos nutracêuticos nos ruminantes. Dessa forma, um dos maiores impedimentos para as pesquisas sobre os efeitos nutracêuticos dos ácidos graxos insaturados é predizer ou estimar a quantidade com que esses ácidos graxos fornecidos pela alimentação realmente estão atingindo os sítios de absorção (SANTOS et al., 2008).

A rota normal da biohidrogenação dos ácidos oleico, linoleico e linolênico formará ácido esteárico, mas em algumas ocasiões podem ocorrer alterações nessa rota e o produto final será alguns ácidos graxos *trans* como consequência da incompleta biohidrogenação daqueles ácidos graxos (BAUMAN; LOCKE, 2006) (Figura 2). Alguns desses ácidos graxos, principalmente o CLA cis10-trans12, tem efeitos diretos sobre a produção gordura do leite (BAUMAN; GRIINARI, 2003) e serão discutidos posteriormente.

Figure 2 - Rota principal e alternativa para biohidrogenação do ácido linoleico



Fonte: adaptado Bauman e Locke, 2006

Embora o processo possa ser eficiente (90%), o grau de biohidrogenação é dependente das características químicas das fontes de gordura utilizadas, do tempo de retenção no rúmen, das características da população microbiana presente no rúmen-retículo (BICKERSTAFFE; WARNER, 1968), e frequência de alimentação (NRC, 2001). Juchem (2007) demonstrou que mais de 70% do C18:2 n-6 fornecido pela alimentação para vacas leiteiras são

biohidrogenados. Sendo assim, o metabolismo de ácidos graxos pelos microrganismos ruminais possui efeito direto sob o perfil de ácidos graxos absorvidos no intestino, e subsequentemente sobre o desempenho produtivo e reprodutivo dos animais suplementados com distintas fontes de ácidos graxos.

Para minimização dos efeitos deletérios dos lipídeos sobre o rúmen, e diminuição da biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos insaturados, desenvolveu-se a tecnologia de lipídeos inertes no rúmen, que possuem como principal objetivo, a proteção dos triglicerídeos da degradação ruminal, podendo assim, alcançar seu sítio de absorção sem sofrer alterações em sua estrutura física e sem interferir no ambiente ruminal. Das principais estratégias de proteção utilizadas atualmente podemos citar os sais de cálcio (proteção química) e sementes de oleaginosas (proteção natural).

4.4 FONTES DE LIPÍDEOS INERTES NO RÚMEN

4.4.1 Sais de Cálcio

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, formando um sal do tipo R-COO-Ca, popularmente conhecido como sabão de cálcio. Existem no mercado sais de cálcio de ácidos graxos formados a partir de óleo de palma, colza, soja, girassol e linhaça. Considerando que ocorram possíveis efeitos deletérios da suplementação de algumas fontes de gordura insaturadas sobre a fermentação ruminal, esses produtos comerciais teriam como principal vantagem fornecer ácidos graxos essenciais que iriam passar direto para o abomaso sem que ocorresse liberação de ácidos graxos no rúmen, e consequentemente, intensa biohidrogenação ruminal, não afetando diretamente a população microbiana e o perfil de ácido graxo da fonte utilizada. Para tal, a ligação entre o cálcio (Ca) e os ácidos graxos não deve ser rompida.

Os sais de cálcio de ácidos de cadeia longa geram poucos efeitos sobre a população microbiana, e sobre os processos de degradação e absorção ruminal de nutrientes (ALLEN,

2000; MATTOS, 2000). Normalmente, a inclusão média de lipídeos em dieta de vacas leiteiras é de 3,5%, de modo que, alguns estudos resultam em quedas de até de 2% na digestibilidade da matéria seca, para algumas oleaginosas e gorduras saturadas, entretanto, tem sido demonstrado aumentos o de até 1,7% na digestibilidade pela suplementação com sais de cálcio de ácidos graxos, que pode estar associado ao tipo de fibra e da relação volumoso:concentrado, de modo que, o estabelecimento de um pH ruminal entre 6,5 e 7,0 pode contribuir com a diminuição da quebra das ligações dos ácidos graxos com o cálcio, que pode vir a interferir na fermentação ruminal e na produção de ácido linoleico conjugado (CLA) (ONETTI; GRUMMER, 2004).

Além disso, atenção especial deve ser dada a possíveis variações no consumo de matéria seca quando se utiliza rações com sais de cálcio de ácidos graxos em rações de vacas leiteiras. Isso ocorre porque, sempre que se descreve o uso de fonte alternativa de lipídeo nas rações de animais é preciso enfatizar que o período de adaptação e a aceitabilidade da fonte de lipídeos podem ser considerados fatores determinantes para que se tenha resposta de desempenho adequada dos animais. Allen (2000), em ampla revisão de literatura avaliou estudos que observaram o consumo de matéria seca de diferentes fontes de lipídeos comumente utilizadas nas rações de vacas leiteiras. Este autor observou que alguns experimentos utilizando os sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma como fonte de lipídeo apresentaram redução do consumo de matéria seca. Esses resultados, segundo este autor, podem ser atribuídos à questão da aceitabilidade desta fonte de lipídeo, levando dessa forma ao baixo consumo encontrado. Entretanto tem sido demonstrado em vários estudos, que apesar de haver uma redução no consumo de matéria seca, o consumo de energia líquida não é reduzido, devido à maior densidade energética das fontes de lipídeo (JENKINS, 1993).

Em estudos recentes, a utilização de sais de cálcio de ácidos graxos em vacas no período de transição não tem reduzido o consumo de matéria seca. Duske et al. (2009) avaliaram a inclusão de sais de cálcio de ácidos graxos em rações de vacas Holandesas no período de transição com média de produção de leite de 34,0 kg/vaca/dia e um total de 5,9 % EE na matéria seca total no pós-parto. Estes autores não observaram redução do consumo de matéria seca no período pós-parto. Andersen et al. (2008) e Cerri et al. (2009) avaliaram vacas Holandesas com suplemento comercial de ácidos graxos de óleo de palma e óleo de soja com dietas de 8,0 % e 5,5 % de EE na matéria seca total respectivamente para as rações com fonte de lipídeo. Estes autores também não observaram redução no consumo de matéria seca.

Dessa forma, a inclusão de ácidos graxos de sais de cálcio em rações de vacas leiteiras pode ser considerada uma ótima alternativa como fonte de lipídeo, na tentativa de suprir a demanda energética de vacas leiteiras no início de lactação. Entretanto, é preciso considerar um período de adaptação e a aceitabilidade dessa fonte de lipídeo, pois em estágios críticos de baixo consumo de matéria seca os animais submetidos a essa rações pode não apresentar o desempenho esperado.

4.4.2 Grão de Soja

A soja é um grão rico em proteínas e ácidos graxos, cultivado em todo mundo como fonte de alimento para humanos e animais, e pertence à família *Fabaceae* (leguminosa). Destaca-se entre os alimentos proteicos de origem vegetal como fonte alternativa de proteína e energia, sendo considerada semente de oleaginosa mais disponível no mundo, podendo ser usada na alimentação dos ruminantes na sua forma original (crua) ou processada (CORRÊA, 2007). Quanto ao custo, isso poderia acarretar vantagem econômica, pois em regiões produtoras brasileiras, na maioria das vezes, o preço do grão de soja é menor que o do farelo de soja.

Entre as características nutritivas da soja integral importantes na nutrição de ruminantes destaca-se a grande quantidade de proteína degradável no rúmen (PDR), que pode ser convertida em proteína não degradada no rúmen (PNDR) por meio de tratamento térmico, e ao seu elevado teor de energia devido ao teor de extrato etéreo. As sementes de oleaginosas se destacam por apresentar alto conteúdo de AGPI. O ácido linoleico (C18:2) é o predominante nas fontes mais comuns (DHIMAN et al., 2005).

Além da vantagem do grão de soja ser rico em extrato etéreo e possui um perfil de ácidos graxos com elevado teor AGPI, ele destaca-se por possuir todo óleo vegetal dentro do gérmen do grão, tornando-o indisponível para a microbiota ruminal. A disponibilidade do óleo para o ambiente ruminal só acontece após a completa digestão do gérmen, reduzindo a biohidrogenação e os efeitos deletérios dos AGI para a microbiota ruminal (PALMQUIST, 1991).

Schauff et al. (1992) avaliaram a inclusão de grão de soja cru na dieta de vacas lactantes, na proporção de 15 a 20% na matéria seca total, e verificaram que em quantidades menores que

16% da matéria seca da dieta de soja crua fornecida, não foram observados efeitos negativos sobre a fermentação ruminal. Freitas Júnior et al. (2010) avaliaram a utilização de diferentes fontes de lipídeo para vacas leiteiras e neste estudo foram avaliadas a dieta controle e três fontes de lipídeo, sendo mantido similar nível de extrato etéreo na matéria seca das dietas com lipídeo (aproximadamente 5,0%): óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos insaturados. O volumoso utilizado foi a silagem de milho na relação volumoso/concentrado de 60/40. Estes autores observaram menor consumo de matéria seca para os animais submetidos às rações contendo fontes de lipídeo, 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 de lipídeo. Não houve efeito das fontes de lipídeos nas rações sobre a produção de leite e produção de leite corrigida para 3.5% de gordura, produção de gordura, lactose e nos teores de proteína e lactose.

Barletta et al. (2015) avaliaram a inclusão de diferentes níveis de grão de soja cru e integral (0, 8, 16 e 24% na MS total da dieta) na dieta de vacas leiteiras no terço inicial de lactação com média de produção de 31,21 kg/dia. Os autores não observaram efeitos sobre a produção de leite, teores de proteína, lactose, observando uma tendência no aumento dos teores de gordura para as dietas suplementadas com grão de soja. Quando Barletta et al. (2015) avaliaram o consumo de matéria seca, somente observaram diminuição do consumo da dieta com inclusão de 24% de grão de soja, não sendo observado sobre a digestibilidade da matéria seca. No presente estudo os autores recomendam o uso da inclusão 16% de grão de soja cru e integral na dieta de vacas leiteiras, com média de 30 kg/dia, com silagem de milho como volumoso base.

Naves (2015) trabalhou com vacas leiteiras no terço médio de lactação com média de produção de 30,0 kg/dia, utilizando 20% de inclusão de grão de soja cru nas rações com diferentes tipos de moagem, sendo controle (sem adição de grão de soja), grão de soja cru e integral e grão de soja moído em peneira de 2 e 4 mm. Neste estudo não foram observadas diferenças no consumo e digestibilidade da matéria seca, produção e composição de leite, fermentação ruminal e síntese de proteína microbiana entre a dieta com grão cru e integral e as demais com o grão moído.

Venturelli et al. (2015), suplementaram vacas leiteiras no final de lactação com média de produção de 23,0 kg/dia com altos níveis de grão de soja cru e integral (0, 9, 18 e 27 % na MS das dietas). Houve efeito linear crescente para o teor de gordura no leite (3,59; 3,95; 4,07; 4,20

%). Não houve efeito da inclusão do grão de soja para a produção de leite corrigida, produção de gordura, escore de condição corporal e eficiência produtiva.

A utilização de grão de soja cru e integral em vacas leiteiras mostra-se como uma alternativa viável para ser usada em todo o período de lactação, para vacas de alta, média e baixa produção de leite, sendo, contudo necessário a inclusão dos níveis corretos de acordo com a fase de lactação, nível de produção e volumoso base (GANDRA, 2012).

4.5 FONTES DE LIPÍDEOS E O DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS

4.5.1 Produção e Composição do Leite

Vacas de leite de alta produção possuem elevada exigência energética que pode exceder sua capacidade de ingestão de energia através da dieta, resultando na redução na sua capacidade máxima de produção de leite (HAVARTINE; ALLEN, 2006). Dessa forma, o aumento na ingestão de energia durante o BEN poderia resultar em aumento na produção de leite.

A primeira razão para a ocorrência do aumento de produção devido à suplementação lipídica é a melhor eficiência de utilização do lipídeo dietético, onde as perdas energéticas durante o metabolismo são menores em relação à utilização de grãos comumente utilizados em concentrados. Somado a isso, a adição de lipídeo para vacas em lactação aumenta a densidade energética dietética, permitindo que o consumo diário de energia seja aumentado (STAPLES et al., 2001). Porém, como a suplementação lipídica pode reduzir a ingestão de matéria seca, esse efeito positivo na densidade energética pode ser diluído. Somado a isso, é preciso enfatizar que as diferentes fases de lactação podem influenciar o aproveitamento de energia devido ao balanço energético em que o animal de encontra. Esse benefício foi confirmado por Onetti e Grummer, (2004) onde observaram que vacas no início de lactação utilizaram de forma mais eficiente o aumento densidade energética das rações com lipídeo em relação a vacas no terço médio de lactação, atribuindo tal fato as diferenças na partição de nutrientes e possivelmente ao balanço energético dos animais suplementados.

Com relação à resposta produtiva Chilliard (1993) sumarizou diversos estudos envolvendo a suplementação de lipídeo para vacas leiteiras, e observou 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. Onetti e Grummer (2004) compilaram dados de 41 experimentos que avaliaram a suplementação de diferentes fontes e níveis de lipídeos nas rações de vacas em lactação. De um total de 21 experimentos analisados que usaram os sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma como fonte de lipídeos a média de produção de leite foi aumentada em 1,29 kg/dia. Staples et al. (2001) também citaram que a resposta produtiva da utilização de lipídeo dietético suplementar para vacas em lactação pode resultar em acréscimos na produção de leite de até 2,0 a 2,5 kg/vaca/dia, condicionando estes resultados a adaptação dos animais as

dietas contendo lipídeo e ao tempo suficiente de avaliação para responderem as dietas ricas em energia. Wang et al. (2010), testaram doses crescentes de ácidos graxos saturados para vacas em meio de lactação (0; 1,5%; 3% na MS) e obtiveram aumentos na produção de leite. Warntjes et al. (2007) forneceram lipídeos para vacas em lactação sobre stress térmico e obtiveram tendência (p = 0,07) para aumento na produção de leite.

Andersen et al. (2008) avaliaram a suplementação de sais de cálcio para vacas leiteiras com produção média de 35kg/dia, utilizando a silagem de milho como maior parte do volumoso, e não observaram efeito das dietas sobre a produção de leite e a produção de leite corrigida. Freitas Junior et al. (2009) avaliaram a inclusão de óleo de soja, sais de cálcio (C18:2 n-6) e grão de soja em dietas com 5,5 % de EE na matéria seca total em vacas no terço médio de lactação com média de produção de 25 kg/vaca/dia, e não observaram alteração na produção de leite total. Theurer et al. (2009) compararam a suplementação de Ca-AGCL de óleo de palma e Ca-AGCL de ácidos graxos poli-insaturados e não obtiveram alteração na produção de leite. Dirandeh et al. (2013) avaliaram a suplementação com sais de cálcio contendo ácido linoleico e sais de cálcio contendo ácido linolênico e não obtiveram alterações na produção de leite. Freitas Júnior et al. (2010) avaliaram a utilização três fontes de lipídeo, sendo mantido similar nível de extrato etéreo da dieta (5% na MS): óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos insaturados (C18:2 n-6). Não houve efeito das fontes de lipídeos sobre a produção de leite com e sem correção. Barletta et al. (2012) avaliaram a inclusão de diferentes níveis de grão de soja cru e integral (0, 8, 16 e 24% na MS total da dieta) na dieta de vacas leiteiras no terço inicial de lactação com média de produção de 31,21 kg/dia, e não foram observados efeitos sobre a produção e composição do leite. Ao contrário desses resultados, Harvatine e Allen (2006) avaliaram a suplementação de sais de cálcio de ácidos graxos saturados e sais de cálcio de ácidos graxos poli-insaturados, e obtiveram redução linear para produção de leite, conforme aumentava-se a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados suplementada.

Com relação à composição do leite, o teor de gordura e proteína do leite são as frações que estão sujeitas a maiores alterações durante a suplementação com lipídeos nas dietas. A produção de gordura do leite está intimamente relacionada com o ambiente ruminal e com o perfil de ácidos graxos que chegam ao intestino delgado. O processo de biohidrogenação ruminal pode causar variações no teor de gordura do leite. Resultados têm demonstrado efeitos da variação no perfil de ácidos graxos da gordura do leite com a suplementação de fontes de gordura nas rações de vacas leiteiras (DHIMAN et al., 2000; 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.

Devido à ocorrência 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 chegam ao abomaso é alterado. Para comprovar a biohidrogenação completa de AG, maiores concentrações do ácido esteárico (C18:0) teriam que ser encontradas na digesta abomasal (HAVARTINE; ALLEN, 2006). Entretanto, a biohidrogenação pode ser menor dependendo da concentração de hidrogênio (H) no rúmen, onde somente 1 a 2% do hidrogênio metabólico é usado para este processo. O processo de hidrogenação não é normalmente completo, e ampla variedade de ácidos graxos são resultantes dessa biohidrogenação incompleta (BEYERS; SCHEHING, 1993). Embora o processo possa ser eficiente (até 90%), o grau de hidrogenação é dependente das características químicas das fontes de lipídeo utilizadas, do tempo de retenção no rúmen, e das características da população microbiana presente no rúmen-retículo (RR) (BICKERSTAFFE; WARNER, 1968). De acordo com NRC (2001) a estimativa de hidrogenação de ácidos graxos poli-insaturados varia entre 60 a 90%, enquanto que a biohidrogenação de ácidos graxos poli-insaturados suplementados via sais de cálcio pode ser de 30 a 40%.

Dentro do grupo de ácidos graxos intermediários produzidos durante o processo de biohidrogenação parcial, o ácido linoleico conjugado (CLA) trans-10, cis -12 tem ganhado foco principal nas pesquisas, por apresentar efeito inibidor sobre a síntese da lipídeo do leite na glândula mamária (BAUMAN; GRIINAR, 2003). O ácido linoleico conjugado (CLA) é um termo utilizado para designar uma mistura de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoleico (C18:2), que contêm duas duplas ligações conjugadas (DONOVAN et al., 2000). O CLA é produzido durante a biohidrogenação incompleta de ácidos graxos insaturados no rúmen pela ação da bactéria *Butyrovibrio fibrisolvens* através da isomerização do ácido linoleico (EVANS et al., 2002). Baumgard et al. (2002), concluíram que o CLA trans-10, cis-12 inibe a síntese de ácidos graxos da glândula mamária, através da inibição das enzimas Acetil-Coa Carboxilase (ACC), ácido graxo sintetase (FAS), Δ9 Desaturase, glicerol fosfato acetiltransferase (GPAT), acilglicerol fosfato acetiltransferase (AGPAT), lipase lipoprotéica (LPL), e na proteína ligadora de ácidos graxos (FABP). A enzima ACC é responsável pelo início da síntese dos ácidos graxos, transformando o acetil-coa em malonil-coa. A enzima FAS é responsável pela elongação da cadeia do ácido graxo. Baumgard et al. (2002) obteve redução,

em ambas as enzimas, ao redor de 40%, com infusão do CLA trans-10 cis-12. Tsuboyama-Kasaoka et al. (2000) relataram que os suplementos alimentares ricos em CLA causaram uma diminuição na abundância de mRNA para ACC e FAS no tecido adiposo de ratos em crescimento.

Ácidos graxos circulantes derivados das reservas corpóreas ou da dieta também são importantes contribuintes para a composição da gordura do leite. A enzima LPL hidrolisa triacilgliceróis circulantes, e a enzima FABP está envolvida na captação e tráfico intracelular de ácidos graxos. Foi demonstrada que pequena quantidade de CLA trans-10, cis-12 (3,5 g/d), reduziram a produção de gordura no leite em 25%, diminuindo a produção de ácidos graxos de cadeia longa, média e principalmente curta (BAUMGARD et al., 2002). Baumgard et al. (2002) relataram uma redução da quantidade dessas duas enzimas-chave para o processo de absorção dos ácidos graxos presentes na circulação sanguínea, o que explica os resultados obtidos pelo mesmo autor em um estudo realizado anteriormente.

A enzima Δ9 dessaturase desempenha um papel importante na regulação da fluidez dos triglicerídeos do leite através da introdução de uma dupla ligação cis nos ácidos graxos, que reduz o seu ponto de fusão (PARODI, 1982). A relação entre os ácidos graxos do leite representa um excelente índice para avaliação da atividade dessa enzima (CHOUINARD et al., 1999). Baumgard et al. (2000) demonstraram que infusões abomasal de trans-10, cis12-CLA alteram a atividade dessa enzima. Baumgard et al. (2002), mostraram uma redução da expressão da do mRNA da enzima Δ -9 dessaturase em 54%.

Com esses resultados Baumgard et al. (2002) concluíram que, o isômero CLA trans-10, cis-12 é um potente inibidor da produção de gordura do leite e que diversos são os mecanismos pelos quais esse ácido graxo pode agir. Especificamente, este ácido graxo reduz dramaticamente a taxa de lipogênese da glândula mamária, diminuiu a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese De Novo, e na captação e transporte de ácidos graxos presentes circulação sanguínea para a glândula mamária.

Em suas compilações de dados, Onetti e Grummer (2004) não observaram redução na produção de gordura no leite no início de meio de lactação com suplementação de ácidos graxos saturados inertes no rúmen. Diversos estudos investigaram a influência da suplementação de C18:2 n-6, via grão de soja integral sobre a produção de gordura do leite, porém não foi detectada nenhuma alteração (SANTOS et al., 2001; VARGAS et al., 2002; DUARTE et al., 2005;). Theurer et al. (2009) compararam a suplementação de Ca-AGCL rico em óleo de palma

com Ca-AGCL rico em ácidos graxos poli-insaturados e não observaram alteração na gordura do leite. Indo de encontro a esses resultados, Freitas Júnior et al. (2010) avaliaram a utilização de três fontes de lipídeo (óleo de soja, grão de soja e sais de cálcio de ácidos graxos insaturados(C18:2 n-6) mantendo 5% de EE nas dietas baseado na MS, e não foram observados efeitos sobre a composição do leite. Barletta et al. (2012) avaliaram a inclusão de diferentes níveis de grão de soja cru e integral (0, 8, 16 e 24% na MS total da dieta) na dieta de vacas leiteiras no terço inicial de lactação com média de produção de 31,21 kg/dia, e também não observaram efeitos sobre a composição do leite.

Warntjes et al. (2007) analisaram o fornecimento de ácidos graxos saturados inertes no rúmen de vacas em lactação e observaram redução na gordura do leite quando comparado ao grupo controle. Cerri et al. (2009) compararam vacas leiteiras alimentadas com Ca-AGCL de óleo de palma e Ca-AGCL de C:18:2 n-6 e obtiveram redução da gordura do leite pelo grupo tratado com a fonte de ácido graxo poli-insaturado. Esse resultado também foi obtido por Juchem et al. (2004) e Piperova et al. (2002) quando suplementaram vacas de leite com fonte de ácidos graxos poli-insaturados (trans-octadenóico). Harvatine e Allen (2006) avaliaram o fornecimento de ácidos graxos poli-insaturados inertes no rúmen (Ca-AGCL) e observaram redução linear na gordura do leite conforme o aumento do fornecimento de ácidos graxos poli-insaturados. Freitas Junior et al. (2009) avaliaram a inclusão de óleo de soja, sais de cálcio e grão de soja em dietas com 5,5 % de EE na matéria seca total em vacas no terço médio de lactação com média de produção de 25kg/vaca/dia e relataram menor teor de gordura no leite para os animais suplementados com sais de cálcio em relação às demais dietas experimentais e atribuíram este resultado a formação de ácidos graxos intermediários da biohidrogenação no rúmen já que não houve redução da digestibilidade de fibra ou alterações no padrão de fermentação no rúmen. Contrariamente a esses dados, Wang et al. (2010) analisaram doses crescentes de ácidos graxos saturados (0; 1,5; 3% na MS) e relataram aumento na gordura do leite.

O uso de fontes de lipídeo nas rações de vacas leiteiras pode também promover redução no teor de proteína do leite. Essa redução pode ocorrer pelo simples efeito de diluição devido ao aumento da produção de leite (GARNSWORTHY, 2002). No entanto, essa variação no teor de proteína do leite em resposta a suplementação de lipídeo tem sido citada na literatura (WU; WUBER, 1993; WU et al., 1994) e algumas hipóteses tem sido propostas procurando explicar a razão para este decréscimo. A primeira teoria foi denominada de “deficiência de glicose” onde, teoricamente, a substituição de carboidratos rapidamente fermentáveis no rúmen por

suplementos de lipídeo resultaria em menores quantidades de precursores para a síntese de glicose.

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 lipídeos. Durante a suplementação de lipídeo a síntese de novo de ácidos graxos do leite é diminuída devido à incorporação de ácidos graxos da dieta ao leite. Essa diminuição pode reduzir as exigências de acetato e aumentar o aproveitamento de glicose para síntese de lactose, a qual é associada com o aumento da produção de leite ou eficiência de produção de leite, resultando em diminuição do fluxo sanguíneo mamário. Assim, a redução do fluxo sanguíneo mamário poderia reduzir o fornecimento de aminoácidos para a síntese de proteína do leite, levando a redução da concentração de proteína no leite.

A hipótese mais aceita descreve que os microrganismos ruminais são incapazes de utilizar a energia presente nas fontes de ácidos graxos, o que resultaria em uma redução na síntese de proteína microbiana e na quantidade de proteína metabolizável (CANT et al., 1993). Onetti e Grummer (2004) utilizaram fontes de lipídeo e observaram baixa concentração de N-NH3 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 consequentemente o aproveitamento de aminoácidos disponíveis para a glândula mamaria e para síntese de proteína.

Smith et al. (1978) avaliaram a inclusão da suplementação de lipídeo contendo 40% de sebo e 60% farelo de soja tratado com formaldeído, perfazendo dieta total com 14,3% de extrato etéreo em vacas leiteiras no início de lactação. Estes autores verificaram redução no teor de proteína do leite para os animais suplementados com lipídeo. 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 lipídeo em vacas leiteiras, e observaram que na maioria dos casos o teor de proteína foi reduzido pela adição de fontes de lipídeo nas rações. Em sua compilação de dados, Onetti e Grummer (2004) relataram redução na porcentagem de proteína do leite no início de lactação e tendência ($p = 0.07$) de redução na porcentagem de proteína do leite no meio de lactação para vacas suplementadas com fontes de ácidos graxos saturados inertes no rúmen. 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 de lipídeo utilizada e resposta a suplementação. Cerri et

al. (2009) compararam a suplementação de Ca-AGCL de óleo de palma e Ca-AGCL rico em ácido linoleico, e relataram redução da proteína do leite com a suplementação de ácidos graxos poli-insaturados. Contrariamente a esses dados, Warntjes et al. (2007) forneceram gordura saturada inerte no rúmen para vacas em lactação sob stress térmico e observaram tendência de aumento para a proteína do leite.

4.5.2 Perfil Metabólico

O período de transição compreende diversas adaptações metabólicas que alteram a vaca de um estado gestante e não lactente, para um estado lactente e não gestante. É um período marcado por grandes alterações metabólicas e hormonais responsáveis por permitir e sustentar o parto e toda a lactação. Essas alterações, as quais são muito mais dramáticas do que em qualquer outra fase produtiva do animal, influenciam diretamente o metabolismo e a utilização de nutrientes pelos diferentes tecidos (GRUMMER, 1995). Esse período é caracterizado por grandes mudanças nas demandas de nutrientes no organismo da vaca leiteira, sendo necessárias coordenadas alterações no metabolismo animal para atender suas exigências nutricionais (BELL, 1995). A suplementação lipídica pode atenuar essas alterações melhorando o desempenho dos animais suplementados.

Bu et al. (2007) ao estudarem o efeito de óleos ricos em ácido linoleico (óleo de soja), ácido linolênico (óleo de semente de linhaça) ou uma combinação dos dois óleos encontraram concentrações de colesterol, fosfolipídios, colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL),e AGNE no sangue aumentadas em relação a dieta controle. O aumento nas concentrações desses parâmetros foi similar em estudos anteriores (PETIT et al., 2002). As concentrações de beta-hidroxibutirato (BHBA) não foram alteradas relativamente durante a suplementação dos óleos comparando-se com o controle. Vacas alimentadas com óleo de linhaça (1,35% da MS no pré-parto e 1,5% da MS no pós- parto) também tiveram maiores concentrações de AGNE na segunda e quinta semana pós-parto, e ainda maiores concentrações de gordura hepática na segunda semana pós-parto quando comparadas com vacas alimentadas com dieta de alta concentração de ácido linoleico (AMARAL, 2008).

Petit et al. (2007) analisaram o perfil metabólico de 33 vacas alimentadas com diferentes fontes de lipídeo (controle, inclusão de semente de linhaça e gordura saturada na forma de

“energy buster”) com início há 6 semanas antes da data prevista para o parto até 28 dias de lactação. Foi observado que as porcentagens relativas de C18:3 tenderam a serem maiores nos momentos do parto e duas semanas antes do parto (P=0,06 e 0,07, respectivamente) para vacas alimentadas com semente de linhaça e houve diferença nas segunda e quarta semanas pós-parto. Houve interação entre o tratamento e tempo para as concentrações de AGNE em vacas multíparas. Não foi observada diferença no pré-parto, mas no pós-parto observaram que vacas alimentadas com “energy buster” tiveram concentrações maiores de AGNE quando comparadas com o grupo controle e alimentadas com semente de linhaça. No entanto as dietas não influenciaram os níveis de AGNE nas vacas primíparas. No mesmo experimento observou-se efeito de interação entre os tratamentos e o período para concentração plasmática de BHBA após o parto nas vacas primíparas e multíparas, sendo que o efeito do aumento de BHBA foi notado nas vacas alimentadas com fonte de gordura saturada logo após o parto para as multíparas e após duas semanas para as primíparas.

Mandebu et al. (2003) compararam a suplementação de lipídeos em forma de sais de cálcio sendo que as concentrações de AGNE e BHBA durante as duas primeiras semanas pós-parto não sofreram efeito das dietas (óleo de palma e óleo de soja), e os níveis estavam dentro dos limites normais para espécie (DRACKELY et al., 1998;). Ballou et al. (2009) observaram que a suplementação lipídica tendeu a aumentar a glicose plasmática e diminuir a concentração plasmática de AGNE. A concentração plasmática de BHBA foi menor durante o pós-parto para as vacas suplementadas com lipídios (saturados ou insaturados). No entanto o grau de saturação do suplemento lipídico não teve influência sobre os metabólitos sanguíneos. Cerri et al. (2009), avaliando a suplementação de Ca-AGCL de óleo de palma e Ca-AGCL rico em C18:2 n-6, não observaram alterações nas concentrações sanguíneas de AGNE, BHBA e glicose.

Gonthier et al. (2005) observaram aumento do colesterol plasmático e das concentrações de AGNE no sangue para vacas alimentadas com AGPI (semente de linhaça) em relação as vacas do grupo controle. No entanto os tratamentos não influenciaram na concentração plasmática de glicose assim como mencionado em estudo de Zachut et al. (2010a). Em contra partida Zachut et al. (2010b) não notaram alterações nas concentrações plasmáticas de AGNE. Fuentes et al. (2007) ao alimentarem vacas no início da lactação com semente de linhaça não observaram alterações nas concentrações de colesterol, triacilglicerol e AGNE aos 40 dias pós-parto quando comparada com o grupo controle. Resultado semelhantes ao de Petit et al. (2004) que não encontraram diferenças nas concentrações de AGNEs e colesterol entre vacas que receberam dietas isolipídicas suplementadas com semente de linhaça e sais de cálcio de ácidos graxos.

4.6 FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS E A REPRODUÇÃO DE VACAS LEITEIRAS

Existe forte relação entre o balanço energético no pós-parto e desempenho reprodutivo de vacas leiteiras (ZACHUT et al., 2010; SILVESTRE et al., 2011). São esperadas diferenças significativas no balanço energético das vacas antes do parto e no início de lactação, uma vez que estão bem estabelecidas as diferenças existentes entre as exigências nutricionais para mantença na vaca gestante em terço final de lactação em comparação a alta energia exigida para mantença e produção de leite na vaca em início de lactação (MCNAMARA et al., 2003). O BEN, provavelmente através da sinalização metabólica de baixas concentrações de glicose e insulina associadas com o nível elevado de ácidos graxos não esterificados e cetona, pode influenciar negativamente nos pulsos de LH no início da lactação, necessários para estimular o desenvolvimento dos folículos ovarianos (BUTLER, 2004). Secundariamente, baixas concentrações de insulina na corrente sanguínea também são responsáveis pela baixa produção de IGF-1 no fígado (BUTLER et al., 2004), que juntas reduzem a capacidade de resposta dos ovários e gonadotrofinas. O intervalo para a primeira ovulação no período pós-parto depende da recuperação da função normal do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (BUTLER; SMITH, 1989). O aumento da concentração energética das rações pós-parto aumenta a ingestão voluntária de energia melhorando a condição corporal das vacas, contribuindo com a redução da mobilização de lipídeo do tecido adiposo e consequentemente diminuindo as concentrações plasmáticas de AGNE, enquanto que as concentrações plasmáticas de IGF-1 e glicose nessas condições normalmente aumentam (MCNAMARA et al., 2003; THATCHER et al., 2004).

Entretanto, segundo Grummer (2004), apesar de, em teoria, inicialmente o principal papel do fornecimento de lipídeo suplementar na dieta de vacas em lactação é aumentar o consumo de energia no início da lactação, recentemente alguns estudos tem demonstrado que os ácidos graxos são mais do que fonte energética. Na verdade, ácidos graxos poli-insaturados, são potentes reguladores do metabolismo (efeito nutracêutico), podendo influenciar as funções hepática, adiposa e mamária, alterando também a resposta reprodutiva e imunológica. Sendo assim, a importância não deve ser dada apenas a quantidade da lipídeo suplementada, mas também para qual ácido graxo utilizado (STAPLES et al., 1998; SANTOS et al., 2008). Dentro deste cenário, o ácido linoleico (C18:2 n-6) ganha grande importância.

4.6.1 Síntese de Prostaglandinas e Saúde Uterina Pós-Parto

A saúde uterina é um importante fator de risco para fertilidade em vacas leiteiras. Durante o parto, eicosanoides são produzidos em quantidades substanciais e possuem grande importância na regulação do parto, contração uterina, e expulsão da placenta. Dentro desse grupo de eicosanoides, destaca-se a prostaglandina F2α (PGF2α). A síntese uterina de PGF2α é regulada em partes pela disponibilidade de substratos, e o ácido araquidônico (AA; C20:4 n-6) é um precursor para sua síntese. Certamente é plausível sugerir que aumentos nas concentrações endometriais de AA deverá aumentar a secreção de PGF2α, o que, em partes, melhoraria a qualidade uterina (SANTOS et al., 2008). O ácido linoleico (C18: 2 n-6) é um AG essencial necessário para a função normal da reprodução em mamíferos (BURR; BURR, 1930). À medida que há maior ingestão deste ácido graxo, há maior disponibilidade deste precursor para a síntese endógena de ácido araquidônico, o que se pode resultar em aumento de incorporação desse ácido graxo em membranas das células do endométrio resultando em aumento na síntese de PGF2α (MATTOS et al., 2003.). A PGF2α desempenha um importante papel no pós-parto durante a involução uterina. Melhorar a saúde uterina, durante o período de pós-parto imediato, tem potencial efeito para melhorar a fertilidade de vacas leiteiras, obtido por uma melhor saúde uterina e, por conseguinte, melhor fertilização (CERRI et al., 2009) e prenhez (RUTIGLIANO et al., 2008).

A suplementação com C18:2 n-6 no pré-parto, aumentou a secreção de PGF2α (CULLENS et al., 2004). Robinson et al. (2002) e Petit et al. (2004) encontraram um aumento na síntese de PGF2α causada pela suplementação com ácido linoleico, após desafio com aplicação de ocitocina. Santos et al. (2008) concluíram que o aumento da síntese de PGF2α em vacas suplementadas com a suplementação de C18:2 n-6 podem aumentar o potencial das células uterinas e de defesa em produzir e secretar eicosanoides o que poderia influenciar a saúde uterina e resposta imune da vaca. Alguns estudos avaliaram os efeitos do fornecimento pré-parto de fontes de lipídeo na saúde uterina de vacas de leite no pós-parto. Quando vacas foram suplementadas com fontes ricas em C18:2 n-6, incidência de doenças pós-parto (retenção de placenta, metrites e mastites) foram reduzidas de 42,9% para 8,3% quando comparados a animais não suplementados (CULLENS et al., 2004). Já Juchem (2007) comparou a suplementação de óleo de palma com a suplementação com uma fonte rica em C18:2 n-6. A incidência de retenção de placenta não diferiu entre os tratamentos (6.6%). O risco de doenças

uterinas também foi similar, porém vacas suplementadas com ácidos graxos poli-insaturados reduziram a probabilidade de metrites puerperais (8,8% vs 15.1%). A taxa de involução uterina também não diferiu entre os tratamentos, tendo todos os animais completado sua completa involução uterina até a 6 semana pós-parto (JUCHEM, 2007).

4.6.2 Dinâmica Folicular

Lipídeos dietéticos influenciam a dinâmica folicular, ou por balanço de energia crescente (BUTLER; SMITH, 1989) ou por ações em processos reprodutivos que não estão relacionados à energia (THATCHER et al., 2003). A dinâmica folicular pode ser influenciada pelo estado nutricional e metabólico do animal (DISKIN et al., 2003). Este efeito é mediado por alterações nos metabólitos plasmáticos e hormônios, tais como a insulina e fator de crescimento semelhante à insulina -1 (IGF-1) (ARMSTRONG et al., 2001) e / ou fatores de hormônios de crescimento presentes no fluido folicular (LANDAU et al., 2000).

Um dos mecanismos nos quais a suplementação de lipídeo pode melhorar a fertilidade em vacas de leite é influenciando o crescimento folicular e a ovulação (LUCY et al., 1993). Lucy et al. (1991) substituíram milho por ácidos graxos trans-octadecenóicos em dietas em início de lactação. A suplementação lipídica aumentou o número de folículos médios (6 – 9 mm), e de folículos acima de 15 mm. O diâmetro médio do maior folículo também foi maior para o grupo suplementado com lipídeo. Quando esse experimento foi realizado com dietas isoenergéticas, os resultados foram semelhantes (LUCY et al., 1993). Staples e Thatcher (2005), resumiram os efeitos da suplementação lipídica sobre o diâmetro do folículo dominante. Na média, o folículo dominante foi 3,2 mm maior, o que representa 23% de aumento para os animais suplementados com lipídeo. Diversos estudos demonstraram aumento no folículo dominante com o fornecimento de ácidos graxos poli-insaturados quando comparados aos monoinsaturados, sugerindo efeitos diferentes sobre o crescimento folicular (BILBY et al., 2006). Isto sugere que o tipo da fonte da lipídeo utilizada é de suma importância para sua resposta no animal. No entanto, o impacto de folículos ovarianos maiores devido à suplementação lipídica ainda não foram bem definidos (SANTOS et al., 2008), porém vacas que apresentaram ovulação pós-partos mais recentes possuíam folículos maiores (BEAM; BUTLER, 1997). Dessa forma, é possível que aumentando o número e o tamanho folicular com suplementação lipídica possa reduzir o intervalo entre parto e primeira ovulação (DE

FRIES et al., 1998). Apesar alguns estudos indicarem que a suplementação com lipídeos acelera o crescimento folicular, o qual poderia influenciar a ovulação pós-parto, está inconclusivo como as diferentes fontes de ácidos graxos influenciam esses parâmetros. Juchem (2007) alimentou 699 vacas multíparas com 400g de sebo ou 400g de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa (Ca-AGCL) contendo óleo de palma e óleo de peixe, e não observou diferença na proporção de vacas ciclando após 65 dias de paridas (83,2% 82,2%, respectivamente). Subsequentemente, vacas leiteiras suplementadas com Ca-AGCL contendo óleo de palma ou Ca-AGCL conteúdo mistura de C18:2 n-6 e ácidos graxos trans-octadenóico, de 25 dias pré-parto até 80 dias pós-parto obtiveram intervalo similares para primeira ovulação (30.5 e 32.2 dias respectivamente) (JUCHEM, 2007).

4.6.3 Função Luteal e a Progesterona

Aumentos na fertilidade têm sido associados ao aumento na concentração de progesterona circulante durante a fase luteal, antes e depois da inseminação artificial (SANTOS et al., 2008). A suplementação lipídica tem consistentemente aumentado o colesterol plasmático, no líquido folicular e no corpo lúteo (STAPLES et al., 1998). O colesterol é a substância precursora para a síntese de progesterona pelos tecidos esteroidogênicos, e o HDL e o LDL fornecem colesterol aos tecidos ovarianos para a síntese de hormônios esteroides (GRUMMER, 1991). A hipercolesterolemia pode aumentar a concentração plasmática de progesterona em bovinos (SANTOS et al., 2008). No entanto, Hawkins et al. (1995) sugeriram que os aumentos na concentração de progesterona plasmática em vacas alimentadas com lipídeo não são devidos ao aumento na sua síntese, mas sim devido à uma menor taxa de metabolização. Estes resultados podem explicar a razão pela qual vacas de leite e de corte têm maiores níveis de progesterona no plasma, sem efeito no número ou no tamanho (área) do CL, quando elas são alimentadas com dietas com adição de lipídeo (LAMMOGLIA et al., 1997).

4.6.4 Qualidade Oocitária e Embrionária

A capacidade oocitária e embrionária está diretamente relacionada à composição dos ácidos graxos. Especificamente, os fosfolipídeos que compõem a membrana celular possuem papel crucial no desenvolvimento durante e depois da fertilização. A composição lipídica dos oócitos de ruminantes consiste aproximadamente 50% de triacilgliceróis, 20% de fosfolipídeos, 20% de colesterol e 10% de ácidos graxos livres (MCEVOY et al., 2001). Estudos prévios demonstraram que C16:0 e C18:1 são os ácidos graxos mais abundantes, porém essas concentrações estão inter-relacionadas com as reservas energéticas. Ácidos graxos poli-insaturados compõem menos de 20% do total dos ácidos graxos, sendo o C18:2 n-6 o mais abundante deles (SANTOS et al., 2008).

Alterações nos teores de ácidos graxos da dieta podem resultar em alterações no perfil lipídico nos tecidos reprodutivos e isso pode influenciar diretamente o desempenho reprodutivo (BILBY et al., 2006a). Devido ao balanço energético negativo ocorre aumento na concentração de AGNE no soro e fluido folicular (LEROY et al., 2005). Foi demonstrado, *in vitro*, efeito prejudicial do AGNE sobre o desenvolvimento de oócitos (LEROY et al., 2005). Em contraste, os ácidos graxos poli-insaturados, influenciam positivamente a qualidade dos oócitos, onde foi observado melhora da integridade da membrana após o congelamento (ZERON et al., 2002). Aardema et al. (2011) mostraram in vitro um efeito negativo sobre a qualidade do oócito quando os ácidos palmítico ou esteárico foram suplementados ao meio de cultura. No entanto, quando o ácido oleico foi adicionado aos meios, o desenvolvimento e qualidade dos oócitos não foram prejudicados. Zeron et al. (2001) demonstraram que a composição de ácidos graxos da membrana dos oócitos variam de acordo com a estação do ano. Este autor relatou uma relação entre diminuição da concentração de AG poli-insaturados, e baixa fertilidade de vacas durante o verão.

O número de oócitos de boa qualidade aumentaram em ovelhas alimentadas com ácidos graxos poli-insaturados quando comparados aos animais não suplementados (74,3% e 57,0%), e a suplementação lipídica aumentou a proporção de ácidos graxos de cadeia longa no plasma e nas células do *cumullus* (ZERON et al., 2002). No entanto, essas alterações nos ácidos graxos foram relativamente pequenas, indicando que a absorção de ácidos graxos poli-insaturados pelo oócito ou é seletiva ou altamente regulada, o que pode limitar os potenciais impactos da nutrição de ácidos graxos na composição dos oócitos (SANTOS et al., 2008). Marei et al. (2009), em estudo *in vitro*, demonstraram que a incorporação de C18:2 n-6 ao meio de maturação de oócitos aumentou a expansão das células do *cummulus* e desenvolvimento dos oócitos para metáfase II. No entanto, em termos de análise qualitativa e quantitativa de fontes de ácidos graxos, dados

sobre oócitos ainda são limitados, assim como o conhecimento sobre o metabolismo lipídico durante a maturação oocitária (STURMEY et al., 2009).

Poucos estudos pesquisaram a influência dos ácidos graxos sobre o desenvolvimento embrionário em vacas de leite. Fouladi-Nashta et al. (2007) forneceram 200 ou 800 g/dia de Ca-AGCL de óleo de palma, e os folículos foram aspirados transvaginalmente, posteriormente maturados e fertilizados *in vitro.* Grande porcentagem dos oócitos que desenvolveram em blastocisto obteve maior número de células totais devido ao aumento nas células da trofoderme. Apesar de estudos *in vitro* demonstrarem uma melhora no desenvolvimento com suplementação lipídica (SANTOS et al., 2008), não está claro qual ácido graxo é o mais benéfico. Bilby et al. (2006a) não conseguiram demonstrar efeitos diferentes com diferentes fontes de ácidos graxos em vacas de leite durante o verão. Porém, sistemas *in vitro,* podem não mimetizar as respostas *in vivo*, o que poderia mascarar os efeitos potenciais das diferentes fontes de ácidos graxos sobre o desenvolvimento embrionário (SANTOS et al., 2008). Além disso, as vacas foram submetidas a estresse térmico, o que poderia comprometer a qualidade embrionária, limitando os benefícios potenciais da suplementação lipídica (BILBY et al., 2006). Embriões de vacas de leite não super-ovuladas obtiveram aumento no número de espermatozoides acessórios, porcentagem de células vivas, e melhora da qualidade, quando as vacas foram suplementadas com Ca-AGCL rico em C18:2 n-6 comparadas com vacas suplementadas com Ca-AGCL de óleo de palma (CERRI et al., 2004). Cerri et al**.** (2009**)** verificaram um aumento na qualidade embrionária quando as vacas foram alimentadas com Ca-AGCL de ácido trans-octadecenóico em comparação com vacas alimentadas com Ca-AGCL de óleo de palma**.** Dessa forma, estudos *in vivo* têm sugerido que a suplementação de vacas de leite com ácidos graxos poli-insaturados pode melhorar a qualidade oocitária e o desenvolvimento embrionário.

4.6.5 Fertilidade

Suplementação lipídica para vacas de leite pode aumentar a taxa de concepção por IA, apesar das respostas não serem muito consistentes (SANTOS et al., 2008). Quando a suplementação com lipídeo aumentou a perda de peso pós-parto, vacas primíparas obtiveram redução nas taxas de concepção na primeira IA (SKLAN et al., 1994). No entanto, Fergunson et al. (1994) observaram uma probabilidade de emprenhar na primeira inseminação 2,2 vezes

maior em vacas em lactação alimentadas com 0,5 kg/dia de lipídeo, o que causou uma tendência (P=0.08) no aumento da proporção de vacas prenhas no final do experimento (93% vs 86.2%). A suplementação com Ca-AGCL de óleo de palma melhorou a taxa de prenhez de vacas de leite (SKLAN et al., 1991), porém os autores não relataram os valores estatísticos. Por outro lado, outros autores não demonstraram diferenças com a suplementação com Ca-AGCL em vacas de leite (SKLAN et al., 1994; SCOTT et al., 1995) ou sementes oleaginosas (SCHINGOETHE; CASPER, 1991), o que pode ser atribuído aos aumentos na produção de leite e perda de peso corpóreo (SKLAN et al., 1991, 1994). Juchem (2007) avaliou os efeitos da suplementação de vacas no pré e pós-parto com Ca-AGCL de óleo de palma ou uma mistura com C18:2 n-6 e ácido graxo trans-octadenóico. Vacas alimentadas com ácidos graxos insaturados apresentaram maior facilidade para emprenhar quando comparadas as vacas suplementadas com óleo de palma. Aumentos no número de prenhes de vacas quando alimentadas com Ca-AGCL de C18:2 n-6 e ácido graxo trans-octadenóico foram confirmadas com aumento da fertilização e na qualidade embrionária em vacas leiteiras não super-ovuladas (CERRI et al., 2004). Reis et al. (2012) encontraram uma diminuição na perda de gestação quando as vacas foram alimentadas com Ca-AGCL de ácidos graxos poli-insaturados**.** No entanto**,** estes resultados não são sempre consitentes**,** com diversos estudos mostrando nenhuma diferença de alimentar PUFA sobre o desempenho reprodutivo (PETIT; TWAGIRAMUNGU**,** 2006), provavelmente causados pela falta de poder estatístico observada em muitos estudos nutricionais avaliando a reprodução (SANTOS et al**.,** 2008**).**

De forma geral, apesar de ainda não consistentes, os resultados da literatura sugerem que a suplementação com lipídeos para vacas leiteiras geralmente melhora a fertilidade, sendo as respostas obtidas pelos efeitos de incremento calórico da dieta e pelos efeitos nutracêuticos de acordo com o tipo de ácido graxo utilizado (GRECO, 2014).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em Pirassununga, no período de março de 2012 a janeiro de 2013. As análises bromatológica do alimento fornecido e as de composição do leite foram realizadas, respectivamente, no Laboratório de Bromatologia e Tecnologia de Produtos de Origem Animal, do VNP. As análises relacionadas ao metabolismo plasmático foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), em Pirassununga.

Foram selecionadas 36 vacas da raça Holandesa, multíparas e gestantes, com parto previsto para 35 dias após o início da avaliação e fornecimento das dietas experimentais. Foram divididos 12 animais por tratamento. Devido às enfermidades metabólicas e infecciosas não relacionados à dieta, 6 animais foram retirados do experimento. Os animais foram avaliados durante o período pré-parto (35 dias antes), ao parto, e até o 90º dia de lactação (13 semanas). As vacas foram alojadas em estábulo tipo “free-stall”, providos de baias individuais de 7,5 m², com cama de areia e ventilação forçada, sendo ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia.

Para melhor distribuição entre os tratamentos, os animais selecionados apresentaram características semelhantes entre si. As variáveis utilizadas para a seleção dos animais foram: produção de leite na lactação anterior; ordem de partos e “frame” animal.

5.2 DIETAS EXPERIMENTAIS E ANÁLISE DE ALIMENTOS

Os animais foram distribuídos aleatoriamente para receber uma das três dietas experimentais. No período pré-parto foram utilizadas as dietas: Controle (CON) (n=11), composto por uma dieta basal de aproximadamente 2,8% de extrato etéreo (EE) baseado na matéria seca (MS) da dieta total, sem adição de fonte de lipídeo; Gordura Saturada (SAT) (n=11) - MAGNAPAC® (Tectron Ltda.) composto por uma dieta com aproximadamente 4,7% de EE baseado na MS da dieta total, com inclusão de 2,4% de MAGNAPAC na MS da dieta total; Gordura Insaturada (INS) (n=8) - Grão de Soja, composto por uma dieta com aproximadamente 4,7% de EE baseado na MS da dieta total, com inclusão de 11% de grão de soja cru e integral na MS da dieta total.

No período pós-parto foram utilizadas as dietas: Controle (CON), composto por uma dieta basal de aproximadamente 2,8% de extrato etéreo baseado na matéria seca da dieta total, sem adição de fonte de lipídeo; Gordura Saturada (SAT) - MAGNAPAC® (Tectron Ltda.) composto por uma dieta com aproximadamente 5,0% de extrato etéreo baseado na matéria seca da dieta total, com inclusão de 2.6% de MAGNAPAC na matéria seca da dieta total; Gordura Insaturada (INS) - Grão de Soja, composto por uma dieta com aproximadamente 5,0% de extrato etéreo baseado na matéria seca da dieta total, com inclusão de 13% de grão de soja cru e integral na matéria seca da dieta total.

Em ambos os períodos, as dietas experimentais contendo fontes de lipídeo possuíram a mesma concentração de extrato etéreo, porém o perfil de ácidos graxos foi diferente para permitir avaliar o efeito nutracêutico entre elas.

As dietas experimentais foram fornecidas a partir de 35 dias da data de parto prevista, sendo fornecida até 90º dia após o parto. As dietas foram formuladas conforme as recomendações do NRC (2001) para cada período (pré e pós-parto) e nível de produção de leite estimado durante o início da lactação, sendo esta produção baseada em registros de produção anteriores. As respectivas dietas e água foram fornecidas *ad libitum* durante todo período experimental. No período pré-parto foi utilizada silagem de milho como volumoso, em uma relação volumoso:concentrado de 70:30, enquanto que no período pós-parto foram utilizados 5% de feno de tifton e 45% de silagem de milho como fonte de volumoso, com uma relação entre volumoso:concentrado de 50:50.

Foram realizadas análises químico-bromatológicas dos ingredientes da dieta de acordo com os procedimentos da AOAC, (2000) (Tabela 1), nas dependências do Laboratório de Bromatologia do Laboratório de Pesquisa de Bovinos de Leite (LPBL) do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP e, em seguida, foram formuladas as dietas experimentais. A dieta CON foi calculada para oferecer aproximadamente 2,0-2,5% de extrato etéreo (%MS), enquanto que a dieta SAT e INS foram calculadas para oferecer aproximadamente 5,0-5,5% de ácidos graxos (%MS), utilizando a adição do produto MAGNAPAC (fonte de ácidos graxos saturados baseado em óleo de palma) e grão de soja cru e integral, respectivamente (Tabelas 2 e 3).

As vacas que receberam a dieta SAT e INS foram alimentadas com a dieta CON durante uma semana anteriormente ao início do período experimental, com substituição parcial da dieta CON pelas dietas com adição de lipídeo, na proporção de 20% ao dia até chegar a 100% destas dietas. Foi considerado o primeiro dia experimental quando as vacas ingeriram 100% da dieta contendo lipídeo suplementar. As vacas durante o período pré-parto ficaram no mínimo 3 semanas recebendo as dietas experimentais antes do parto previsto.

Os animais foram arraçoados de acordo com o consumo de matéria natural no dia anterior, de forma a ser mantido um porcentual de sobras das dietas, diariamente, entre 5 e 15% do fornecido para não haver limitação de consumo.

Tabela 1 - Composição bromatológica dos ingredientes

Nutrientes	Ingredientes					
	Farelo de soja	Milho fubá	Grão de soja	Sais de cálcio	Feno tifton	Silagem de milho
Matéria seca (%MN[1])	88,70	88,00	90,00	95,3	87,30	31,00
Matéria orgânica (%MS[2])	93,10	97,10	94,70	79,8	93,60	94,70
Proteína bruta (%MS)	48,80	9,10	39,20	0,00	13,70	8,00
PIDN[3] (%MS)	0,80	1,60	2,30	0,00	5,30	1,00
PIDA[4] (%MS)	0,50	1,00	0,60	0,00	1,20	0,80
Extrato etéreo (%MS)	1,70	4,10	19,20	84,50	2,70	2,80
FDN (%MS)	15,60	14,00	19,50	0,00	76,90	50,00
FDA (%MS)	9,90	4,10	13,10	0,00	36,20	25,00
Lignina (%MS)	1,30	1,20	1,20	0,00	5,40	4,50
Cinzas (%MS)	6,30	1,60	5,90	15,50	6,50	5,00
NDT[5]	79,30	86,80	101,00	163,50	55,30	63,00

[1]MN = matéria natural; [2]MS= matéria seca; [3]PIDN = proteína insolúvel em detergente neutro; [4]PIDA = proteína insolúvel em detergente ácido; [5]Estimado pelas equações do NRC (2001).

Tabela 2 - Composição percentual de ingredientes nos concentrados experimentais

Ingredientes (%)	Concentrados Experimentais					
	Pré-parto			Pós-parto		
	CON[1]	SAT[2]	INS[3]	CON[1]	SAT[2]	INS[3]
Milho fubá	62,27	52,99	53,24	53,13	49,85	44,77
Farelo de soja	30,40	32,13	-	39,97	39,59	22,38
Sais de Cálcio	-	8,69	-	-	5,34	-
Grão de Soja	-	-	39,43	-	-	26,49
Ureia	3,47	3,47	3,47	0,51	0,51	0,00
Sulfato de amônia	0,57	0,57	0,57	0,35	0,31	0,31
Fosfato Bicalcico	0,00	0,00	0,00	1,02	1,02	1,02
Calcário	1,14	0,00	1,14	2,06	0,41	2,08
Nutron VitMin[4]	0,86	0,86	0,86	0,41	0,41	0,41
Nutron Vita Bovi 500 ADE[5]	0,57	0,57	0,57	-	-	-
Sal comum	0,72	0,72	0,72	0,61	0,61	0,61
Bicarbonato de Sódio	-	-	-	1,63	1,65	1,63
Óxido de Magnésio	-	-	-	0,31	0,31	0,31

[1]Controle; [2]Saturada (sais de cálcio) [3]Insaturada (grão de soja cru e integral); [4]Composição por kg do produto: Mg-10g; S-9g; Zn- 23,750 mg; Cu- 5625 mg; Mn -18125 mg; Fe - 5,000 mg; Co- 125 mg; I-312 mg; Se - 144mg; F (máx,) 900 mg; vit A - 2000UI; vit E – 12500 mg; vit D – 5000UI. [5]Composição por kg do produto: Vit A- 8000UI; vit E – 50000 mg; vit D – 2300 UI.

Nos ingredientes utilizados para a formulação da dieta foram determinados os teores de MS, matéria orgânica, nitrogênio total (Kjehldal), cinzas e extrato etéreo, de acordo com as metodologias descritas por Silva e Queiroz (2002), nitrogênio insolúvel em detergente neutro, nitrogênio insolúvel em detergente ácido e lignina de acordo com as metodologias descritas por Silva e Queiroz (2002). O teor de proteína bruta foi obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25. Os teores de fibra detergente neutro (FDN) e fibra detergente ácido foram obtidos conforme método descrito por Van Soest et al. (1991), utilizando-se α-amilase e sem adição de sulfito de sódio na determinação do FDN.

Os teores de carboidratos não-fibrosos foram calculados como proposto por Hall (2000), e os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados segundo Weiss (1999), conforme metodologia descrita no NRC (2001).

Tabela 3 - Composição de ingredientes e bromatológica das dietas experimentais

Ingredientes (%)	Dietas Experimentais Experimentais					
	Pré-parto			Pós-parto		
	CON[1]	SAT[2]	INS[3]	CON[1]	SAT[2]	INS[3]
Silagem de Milho	72,04	72,05	72,05	40,04	40,01	39,98
Feno de Tifton	-	-	-	10,00	10,00	10,00
Milho fubá	17,41	14,81	14,88	26,99	25,40	22,92
Farelo de soja	8,50	8,98	-	19,59	19,41	10,98
Sais de Cálcio	-	2,43	-	-	2,62	-
Grão de Soja	-	-	11,02	-	-	13,00
Ureia	0,97	0,97	0,97	0,25	0,25	-
Sulfato de amônia	0,16	0,16	0,16	0,17	0,15	0,15
Fosfato Bicalcico	-	-	-	0,50	0,50	0,50
Calcário	0,32	-	0,32	1,01	0,20	1,02
Nutron VitMin[4]	0,24	0,24	0,24	0,20	0,20	0,20
Nutron Vita Bovi 500 ADE[5]	0,16	0,16	0,16	-	-	-
Sal comum	0,20	0,20	0,20	0,30	0,30	0,30
Bicarbonato de Sódio	-	-	-	0,80	0,81	0,80
Óxido de Magnésio	-	-	-	0,15	0,15	0,15
Composição Bromatológica						
Matéria seca (%MN[6])	47,24	47,38	47,40	65,65	65,76	65,85
Matéria orgânica (%MS[7])	93,07	92,94	93,15	91,75	92,10	92,04
Proteína bruta (%MS)	14,40	14,40	14,40	17,20	17,00	17,00
PIDN (%MS)	1,08	1,04	1,23	1,53	1,50	1,69
PIDA (%MS)	0,79	0,76	0,79	0,80	0,78	0,80
Extrato etéreo (%MS)	2,80	4,80	4,70	2,80	5,00	5,00
CNF (%MS)	38,70	37,00	36,40	41,00	39,80	38,40
FDN (%MS)	39,70	39,40	40,30	33,00	32,70	33,70
FDA (%MS)	19,60	19,50	20,10	26,40	16,00	16,80
Lignina (%MS)	3,56	3,53	3,55	2,92	2,90	2,91
NDT[8]	67,00	69,00	69,00	70,00	73,00	73,00
EL_L (Mcal/kg MS[8])	1,57	1,64	1,64	1,58	1,66	1,66

[1]Controle; [2]Saturada (sais de cálcio) [3]Insaturada (grão de soja cru e integral);); [4]Composição por kg do produto: Mg-10g; S-9g; Zn- 23,750 mg; Cu- 5625 mg; Mn -18125 mg; Fe - 5,000 mg; Co- 125 mg; I-312 mg; Se - 144mg; F (máx,) 900 mg; vit A - 2000UI; vit E – 12500 mg; vit D – 5000UI. [5]Composição por kg do produto: Vit, A- 8000UI; vit E – 50000 mg; vit D – 2300 UI; [6]Matéria natural; [7]Matéria seca; [8]Calculado pelo NRC 2001.

5.3 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

A produção de leite foi medida diariamente, com amostras de leite coletadas uma vez por semana, compreendendo amostras proporcionais das ordenhas realizadas diariamente de manhã e a tarde. A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura, segundo fórmula descrita por Sklan et al. (1992).

As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos com conservante (Bronopol®) mantidos entre 2 e 6ºC, e encaminhadas para o Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP para a obtenção da composição do leite. Foram avaliados os teores de proteína bruta, gordura, lactose e extrato seco total, segundo a metodologia descrita pela International Dairy Federation (1996).

5.4 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS

A avaliação do perfil dos ácidos graxos do leite foi realizada utilizando-se uma alíquota de 2% da produção de leite, que foi congelada para posterior análise. As amostras de leite utilizadas para avaliação do perfil de ácidos graxos foram obtidas semanalmente durante o período experimental, sendo cada amostra proveniente das duas ordenhas diárias. Inicialmente as amostras serão centrifugadas a 17.800 × g por 30 minutos a 4°C e em seguida a 19.300 x g por 20 minutos a 4°C de acordo com Feng et al. (2004). A gordura separada foi extraída de acordo com Hara e Radin (1978) e metilada de acordo com Christie (1982) como modificado por Chouinard et al. (1999).

A gordura separada do leite foi metilada e os ésteres metílicos foram formados de acordo com Kramer et al. (1997). Dois padrões internos C18:0 e C19:0 foram utilizados para corrigir as perdas durante o processo de metilação. 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 ºC por 4 minutos (13º C/minuto) até chegar a 175 ºC, mantendo por 27 minutos. Depois, um novo aumento de 4 °C/minuto, foi iniciado até 215 °C, mantendo durante 31 minutos. Hidrogênio (H_2) 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 ®).

5.5 ULTRASSONOGRAFIA OVARIANA

A atividade ovariana foi avaliada em todos os animais do experimento, sendo utilizando um aparelho de ultrassom portátil contendo a modalidade B-mode (escala de cinza), acoplado a um transdutor linear multifrequencial A ultrassonografia foi realizada via transretal, diariamente, iniciando após o 14º dia até o 90º dia pós-parto, pela manhã. A seguir, segue descrição das avaliações ultrassonográficas nos modos que foram utilizados:

Ultrassonografia modo B. Medidas gerais de diâmetro e comprimento foram feitas utilizando-se o modo B. Dentre outras variáveis, serão estudadas: duração do período inter-ovulatório, emergência do 1°, 2° e 3° (caso haja) ondas foliculares, persistência do folículo ovulatório, número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular, número de folículos dentro das classes: 1, 2, 3, 4 e 5 (folículos < 3, de 3 – 5, de 6 – 9, 10 -15 e folículos > 15 mm de diâmetro, respectivamente), e diâmetro folículo ovulatório, bem como a identificação do CL e mensuração de sua área. Cavidades luteínicas, caso presentes, tiveram a mesma mensuração.

A fase de crescimento do CL (metaestro) irá do dia da ovulação ao dia em que o CL cessar o seu crescimento progressivo. A fase estática (diestro) irá do último dia de crescimento ao primeiro dia de início da regressão progressiva do diâmetro e, a fase regressiva (pro-estro) do último dia da fase estática ao dia da ovulação ou quando o CL não for mais detectável.

5.6 QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA

O procedimento de OPU foi realizado em três períodos, sendo realizadas nos dia 30, 60 e 90 dias pós-parto. As variáveis mensuradas na OPU foram número total de oócitos aspirados, oócitos de grau I, II e III, número de oócitos viáveis, degenerados e atrésicos. Na avaliação da qualidade embrionária foram avaliados o número e a porcentagem de embriões clivados e viáveis. As aspirações foliculares foram realizadas pela empresa *In Vitro (*Rod. SP 340 - KM 166, Mogi Mirim - SP), realizadas por médicos veterinário experientes, treinados e aptos que realizam este tipo de procedimento de aspiração com frequência diária.

As sessões de OPU foram realizadas com aparelho portátil de ultra-som, equipado com transdutor endocavitário, micro-convexo, mulifrequencial, adaptado a uma guia de biopsia WTA Ltda (Cravinhos/SP, Brasil) para aspiração folicular e conectado a agulha V-OPAA-1855 (Cook Austrália, Queensland, Austrália) descartável de 18g e linha de aspiração VBOAS 18l (Cook Austrália, Queensland, Austrália) de teflon de 1,7 mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento, conectadas a um recipiente para coleta dos oócitos (tubos cônicos de centrífuga de 50 ml da Corning Life Science Incorporated – Massachusetts/EUA). Este sistema de aspiração foi acoplado à bomba de vácuo portátil V-MAR 5000 (Cook Austrália, Queensland, Austrália), calibrada e regulada com pressão negativa de 68 MMHG (12 a 15 ml de água/minuto; KRUP et al., 1994).

A montagem do transdutor foi feita segundo instruções do fabricante e a agulha inserida no mandril de forma asséptica para evitar contaminação. Na montagem dos equipamentos envolvidos na OPU, foi mantida rigorosa assepsia, principalmente com as partes que entravam em contato direto com o material aspirado ou com as mucosas das doadoras.

O meio de aspiração utilizado para lubrificação e lavagem do sistema de OPU e para o recebimento dos oócitos no tubo de coleta foi preparado com 1,0% de solução salina fosfatada (DPBS – Dmpbs Flush, Nutricell, SP/Brasil), acrescido de 5000 UI de heparina sódica (5,0 ui/ml, Liquemine®, Roche Brasil, SP/Brasil) e 10,0 ml de soro fetal bovino (SFB – Nutricell, SP/Brasil), mantidos a aproximadamente 37°C.

Após a contenção física do animal em brete apropriado, foi realizada anestesia epidural baixa entre a última vértebra coccígena e a primeira vértebra caudal, com 2,0 a 3,0 ml de cloridrato de lidocaína 2% (LIDOVET® BRAVET, RJ/BRASIL), sem vasoconstritor (KRUIP

et al., 1994). Esta dosagem variou de acordo com o tamanho, raça, idade, sensibilidade individual e estado geral de cada vaca.

Após a perda dos reflexos caudais, a cauda da vaca foi amarrada e se procedeu a remoção manual de fezes da ampla retal e higienização mecânica da região perineal, com água. A vulva e o vestíbulo vaginal também foram cuidadosamente higienizados, tomando-se o cuidado de não jogar água dentro da vagina.

Após anestesia e higienização da doadora, o braço esquerdo do operador foi mantido posicionado no reto do animal evitando assim a entrada de ar na ampola retal, o que dificulta a realização da OPU. Visando a padronização da técnica e devido à dificuldade de acesso, o ovário esquerdo foi o primeiro a ser aspirado. O ovário foi palpado, inspecionado e isolado de outros tecidos (vasos sanguíneos, porções intestinais, tecido adiposo) para evitar sua perfuração acidental e, em seguida, o transdutor, acoplado a guia de biopsia e agulha, foi introduzido na vagina até alcançar o fundo de saco vaginal no lado correspondente ao ovário que foi acessado. Por meio de manipulação transretal, o ovário foi apresentado ao transdutor na face abdominal da parede da vagina, de forma que os folículos a serem aspirados fiquem no percurso da agulha, indicado na tela do ultra-som pela linha de biópsia ou linha de punção (*punction line*).

Antes do início da OPU, foi feito um mapeamento do ovário a fim de se planejar a aspiração, evitando perfurações desnecessárias, otimizando o procedimento e preservando os ovários da doadora. Seguiu a aspiração transpassando a agulha através da parede do fundo de saco vaginal ao mesmo tempo em que foi acionada a pressão negativa de vácuo por um pedal e os folículos foram aspirados (NIBART et al., 1995). Desta forma, foram aspirados todos os folículos visíveis (com diâmetro ≥ 1,0 mm) e acessíveis de cada ovário.

Ao término da OPU de cada animal o tubo contendo o líquido aspirado foi trocado, identificado com a ordem da aspiração e RGD da doadora e enviado para o técnico do laboratório-campo, para lavagem do conteúdo, procura, seleção e envase dos oócitos aspirados.

O tubo com o conteúdo aspirado foi despejado em filtro de coleta de embriões WTA (Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, SP/Brasil). O conteúdo contendo o fluido aspirado presente no filtro de coleta de embriões foi lavado até se obter um líquido translúcido com cerca de 1.0 cm de altura e com um sedimento contendo os oócitos recuperados. Este conteúdo foi vertido em placas de petri para observação em esteriomicroscópio (Neovet Ind. e

Com. e Serviços Ltda, Uberaba, MG/Brasil) e realização da procura, lavagem, classificação e seleção dos CCO.

Os critérios considerados para a avaliação dos CCO foram a presença, o número de camadas e o grau de expansão das células do *cumulus*, bem como o aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade. Desta maneira, os oócitos recuperados foram classificados de acordo com sua morfologia, mensurando-se a quantidade de camadas e compactação das células do *cumulus* e a homogeneidade do ooplasma, em sete categorias, semelhante ao descrito por Lonergan et al. (1992).

Foram considerados como viáveis os oócitos classificados como graus I, II e III, enquanto os demais, que não apresentarem aspecto de granulações citoplasmáticas homogêneo, foram descartados. No entanto, foram somados àqueles para compor o número total de oócitos.

Após a classificação, os oócitos foram lavados em solução de TCM199 GIBCO® Invitrogen Corporatio, Califórnia/EUA, suplementada com 10% de SFB. Em seguida, foram efetuados a contagem por categoria e o envase dos oócitos para transporte em Criotubos (Corning Life Science Incorporated, Massachusetts/EUA) com a mesma solução de lavagem, acrescido de HEPES Nutricell (Campinas, SP/Brasil), em banho-maria a 37°C. O tempo médio de transporte foi de 1,5 horas, totalizando média de 5,0 horas desde o início da aspiração da primeira vaca até a chegada dos oócitos viáveis ao laboratório de FIV.

A fase de produção *in vitro* foi totalmente executada em laboratório de PIVE, onde os oócitos aspirados foram submetidos à maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, num período total de oito dias.

Após transporte controlado, os oócitos foram transferidos para as placas de MIV, agrupados e maturados em microgotas de 100,0 µl de meio de maturação tcm199 suplementado com 10% de SFB, piruvato (22 µg/ml), gentamicina, (50 µg/ml), 5,0 µg/ml de FSH FOLTROPIN® (Bioniche Animal Health, Belleville, Ontário, Canadá), 50,0 µg/ml de LH PROFASI® (Serono, SP/Brasil) e 1 µg de estradiol/ml, sendo cada microgota referente a um animal.

As microgotas de MIV foram cobertas com óleo mineral sigma (Aldrich, São Paulo, SP/Brasil) e os oócitos permaneceram incubados durante 22 a 24 horas a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO_2 em ar e com máxima umidade (WATANABE et al., 1998a,b).

Uma vez maturados, os oócitos foram submetidos à FIV, em microgotas de 100 µg de meio talp suplementado com heparina (10 µg/ml), piruvato (22 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml), albumina sérica bovina (6 mg/ml), solução de PHE (2 µm de penicilamina, 1 µm de hipotaurina e 0,25 µm de epinefrina) e recobertas com óleo mineral. O sêmen utilizado em todo o experimento foi do mesmo reprodutor (raça Holandesa) e mesma partida. As palhetas contendo o sêmen diluído foram descongeladas em banho-maria a 35°C durante 30 segundos e o seu conteúdo foi centrifugado por meio da técnica de gradiente de percoll (45 e 90%) para obtenção dos espermatozóides móveis e remoção do diluidor e do plasma seminal. A concentração foi ajustada para $2{,}0x10^6$ espermatozóides/ml e os gametas permanecerão incubados nas microgotas, durante um período de 18 a 20 horas a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO_2 em ar.

Após os procedimentos de MIV e FIV, os possíveis zigotos foram lavados e transferidos para microgotas com 50 µl de meio Cr_2 modificado e suplementado com 10% SFB, 30 mg BSA/ml, acrescido de aminoácidos essenciais e não essenciais (WATANABE et al., 1999), onde permaneceram em desenvolvimento embrionário por sete dias, em incubadora a 38,5°c, com 5% de co_2 em ar e umidade máxima, até atingirem os estágios de mórula (MO) e blastocisto (BL). Decorridas 48 horas de CIV, foi avaliada a taxa de clivagem e, em seguida os embriões viáveis foram congelados em nitrogênio líquido a -196ºC.

5.7 METABÓLITOS PLASMÁTICOS

Foram realizadas coletas de sangue na artéria ou veia coccígea sempre anteriormente ao fornecimento das dietas na manhã, para dosagens de metabólitos. As amostras de sangue foram coletadas semanalmente nos períodos pré e pós-parto. Amostras de sangue foram coletadas também no dia do parto (nas primeiras 24 horas).

As amostras foram coletadas em tubos vacuolizados (vacutainer) de 10 ml para dosagem de metabólitos sanguíneos. Imediatamente após coleta os tubos foram refrigerados até a centrifugação à 3000 rpm durante 15 minutos, para a separação do plasma. O plasma obtido foi transferido para tubetes plásticos, identificados e armazenados a -20ºC, até o procedimento das análises laboratoriais.

As análises laboratoriais dos metabólitos plasmáticos (glicose, β-hidroxibutirato, colesterol total, colesterol HDL, proteínas totais, albumina, enzimas hepáticas, aspartato aminotransferase, gama-glutamiltransferase e uréia) foram realizadas por meio de kits comerciais, que utilizam o método enzimático colorimétrico de ponto final que são analisados em aparelho automático para bioquímica sanguínea sistema de bioquímica automático SBA-200, CELM). As análises dos ácidos graxos não esterificados foram realizadas em aparelho leitor de microplacas (ELISA). As análises foram realizadas no LPBL-VNP-FMVZ-USP

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi utilizado delineamento inteiramente ao acaso, com os animais distribuídos aleatoriamente, de acordo com as dietas experimentais. As variáveis produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite, e metabolitos plasmáticos foram analizadas pelo procedimento PROC MIXED do SAS (SAS, 2004), utilizando seguinte modelo:

$$Y_{ij}= \mu+ D_i+ S_j+D_i(s_j)+ e_{ij}$$

Onde: μ = média avaliada, D_i= efeito fixo de dieta; S_j= efeito fixo de semana (semanas); $D_i(T_j)$= interação semana * dieta; e_{ij} =erro aleatório.O modelo acima foi utilizado para as análises do pré e pós parto, sendo a variável tempo no pré parto as semanas -3 -2, -1 semanas em realação ao parto, e no pós parto as semanas 1 a 13 em relação ao parto. O efeito de animal foi considerado como aleatório em todos os modelos.

Essas variáveis foram analisadas pelos seguintes contrastes ortogonais C1: controle *vs* insaturada e saturada (C *vs* INS + SAT), e C2: insaturada *vs* saturada (INS *vs* SAT). Foram utilizados para as análises entre os tratamentos nível de 5% de significância.

A análise da dinâmica folicular foi analisada pelo PROC MIXED do SAS (SAS, 2004) utilizando o seguinte modelo:

$$Y_{ij}= \mu+ D_i+ T_j+D_i(T_j)+ e_{ij}$$

Onde: μ = média avaliada, D_i= efeito fixo de dieta; T_j= efeito aleatório de tempo (dias de ultrassonografia); $D_i(T_j)$= interação tempo * dieta; e_{ij} =erro aleatório.O modelo acima foi utilizado para as análises do dia 14 ao 90 dias de lactação.

As análises de qualidade oocitária e embrionária foram analisadas de acordo com o PROC MIXED do SAS (SAS, 2004) utilizando o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + D_i + A_j + D_i(A_j) + e_{ij}$$

Onde: μ = média avaliada, D_i= efeito fixo de dieta; A_j= efeito aleatório de tempo (dias da aspiração folicular); $D_i(A_j)$= interação aspiração folicular * dieta; e_{ij} =erro aleatório.O modelo acima foi utilizado para as análises nos dias das aspirações foliculares dias 35±7, dias 65±7 dias, e 92±7 de lactação.

Essas variáveis foram analisadas pelos seguintes contrastes ortogonais C1: controle *vs* insaturada e saturada (C *vs* INS + SAT), e C2: insaturada *vs* saturada (INS *vs* SAT). Foram utilizados para as análises entre os tratamentos, utilizando-se o nível de 5% de significância.

Todas as análises estatísticas passaram pela análise de homogeneidade das variâncias e normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk). Nos casos necessários, foram excluídos outliers ou realizada transformação das variáveis.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PARÂMETROS SANGUÍNEOS

Os resultados dos parâmetros sanguíneos estão listados na tabela 4. No período pré-parto, houve uma tendência de aumento nas concentrações de AGNE (P=0.064) com a suplementação de gordura quando comparado a dieta controle. Quando comparada as duas fontes de lipídeo, a suplementação de gordura insaturada aumentou (P<0,05) as concentrações de beta-hidroxibutirato e apresentou uma tendência em aumentar a concentração de colesterol HDL (P=0.053) quando comparado à suplementação de gordura saturada. Houve efeito de tempo (P<0,05) para as variáveis: proteína total, ureia, triglicerídeos, AGNE e VLDL.

No período pós-parto, a suplementação de lipídeo aumentou as concentrações de AGNE e obteve uma tendência de aumento nas concentrações de BHB (P= 0.07) quando comparado à dieta controle. Quando comparada a suplementação entre as diferentes fontes de lipídeo, a gordura insaturada reduziu (P<0,05) as concentrações de proteínas totais e de BHB e apresentou tendência de redução nas concentrações de colesterol HDL (P=0,093). Houve interação entre tempo e dieta paras as variáveis colesterol total, LDL e BHB, e efeito de tempo para as variáveis colesterol HDL, AGNE, AST e GGT.

Tabela 4 - Parâmetros Sanguíneos de acordo com as dietas experimentais

(Continua)

Item	Dietas[1]			Média	EPM[2]	P-valor[3]				
	COM	INS	SAT			Dieta	Tempo	D*T	C1	C2
AGNE[4] (mmol/L)										
Pré-parto	0.50	0.72	0.70	0.64	0.033	0.172	0.002	0.246	0.064	0.982
Pós-parto	0.62	0.91	1.10	0.87	0.040	0.003	<.0001	0.846	0.002	0.157
BHB[5](mmol/L)										
Pré-parto	0.62	0.53	0.74	0.64	0.032	0.064	0.192	0.114	0.968	0.021
Pós-parto	0.64	0.61	1.04	0.78	0.045	0.001	<.0001	0.025	0.070	<.0001
Glicose (mg/dL)										
Pré-parto	63.38	57.03	68.31	63.55	2.721	0.274	0.532	0.228	0.992	0.113
Pós-parto	62.18	59.20	64.21	62.07	2.161	0.723	0.311	0.184	0.942	0.425
Colesterol Total (mg/dL)										
Pré-parto	92.94	104.50	123.67	108.23	4.870	0.328	0.124	0.586	0.317	0.313
Pós-parto	106.96	112.08	134.59	117.98	4.540	0.119	<.0001	0.039	0.178	0.141
Colesterol HDL (mg/dL)										
Pré-parto	44.48	46.52	61.23	51.73	1.914	0.039	0.577	0.705	0.124	0.053
Pós-parto	56.31	55.73	65.13	59.37	1.650	0.137	<.0001	0.824	0.345	0.095
Colesterol -VLDL (mg/dL)										
Pré-parto	9.98	11.08	11.41	10.84	0.319	0.643	0.012	0.229	0.411	0.722
Pós-parto	8.06	9.27	9.77	9.01	0.227	0.203	0.954	0.737	0.110	0.520
Colesterol - LDL (mg/dL)										
Pré-parto	38.47	45.43	49.81	44.83	4.815	0.920	0.504	0.804	0.795	0.776
Pós-parto	42.53	47.07	59.27	49.60	4.182	0.428	0.034	0.024	0.347	0.414
Triglicerídeos (mg/dL)										
Pré-parto	49.91	55.38	57.06	54.18	1.595	0.643	0.012	0.229	0.411	0.722
Pós-parto	40.30	46.34	48.85	45.04	1.136	0.203	0.954	0.737	0.110	0.520

(Conclusão)

Item	Dietas[1]			Média	EPM[2]	P-valor[3]				
	CON	INS	SAT			Dieta	Tempo	D*T	C1	C2
Proteínas Totais (mg/dL)										
Pré-parto	9.02	8.03	8.29	8.45	0.224	0.351	<.0001	0.835	0.159	0.663
Pós-parto	9.99	8.83	10.37	9.81	0.211	0.090	0.173	0.708	0.535	0.033
Ureia (mg/dL)										
Pré-parto	44.70	41.46	44.25	43.65	1.343	0.857	<.0001	0.079	0.687	0.679
Pós-parto	53.15	54.60	49.66	52.26	1.106	0.530	0.198	0.578	0.708	0.310
AST[6] (mg/dL)										
Pré-parto	30.51	29.85	20.70	26.41	1.255	0.073	0.216	0.634	0.230	0.640
Pós-parto	39.05	40.05	34.34	37.62	1.492	0.481	<.0001	0.992	0.616	0.297
GGT[7] (mg/dL)										
Pré-parto	33.03	33.61	31.77	32.68	0.908	0.873	0.165	0.735	0.999	0.607
Pós-parto	36.69	39.76	35.42	37.11	0.616	0.247	0.024	0.581	0.476	0.119

[1]Dietas: CON: controle; INS: insaturada; SAT: saturada; [2]EPM: erro padrão da média; [3]D*T: Interação dieta*tempo; C1: C0N *vs* (INS + SAT); C2: INS *vs* SAT; [4]Ácidos graxos não esterificados; [5]Beta-hidroxibutirato; [6]Aspartato aminotransferase; [7]Gama glutamiltransferase.

Durante o período de transição a vaca leiteira passa por um processo de balanço energético negativo, onde o animal é incapaz de ingerir a quantidade de energia necessária para atingir sua exigência. Nesse contexto, a primeira adaptação no metabolismo animal é a mobilização de gordura corpórea (DRACKLEY, 1999), sendo as concentrações plasmáticas de AGNE e BHB, excelentes indicadores da magnitude da mobilização do tecido adiposo. (BOBE et al., 2004). No presente experimento a suplementação de lipídeo aumentou a concentração de AGNE e apresentou tendência de aumento (P=0,07) de BHB no pós-parto o que sugere uma maior mobilização de tecido adiposo nesses animais. Esse resultado pode ser explicado pela maior produção de leite corrigido para 3,5% de gordura para os animais suplementados com Ca-AGCL rico em óleo de palma. Esse fato explica também a interação tempo e dieta nas concentrações de BHB, demonstrando que, nas semanas 1,2 e 3 (Gráfico 9) a suplementação de lipídeo aumentou as concentrações sanguíneas de BHB. Quando comparadas as diferentes fontes de lipídeo, a suplementação de gordura insaturada obteve menores concentrações de BHB no período pré e pós-parto quando comparado a suplementação com gordura saturada, sugerindo um BEN mais severo nos animais alimentados com gordura saturada, o que pode ser atribuído à maior produção de leite corrigida para 3,5% de gordura apresentada por esses animais. Assim como o presente experimento, Gonthier et al. (2005) observaram aumento da

concentração plasmática de AGNE para vacas alimentadas com AGPI (semente de linhaça) em relação as vacas do grupo controle. Ao contrário desses resultados, Cerri et al. (2009); Gandra (2012) e Greco (2014) não observaram alterações nas concentrações de AGNE, e Ballou et al. (2009) observaram que a suplementação lipídica reduziu a concentração plasmática de AGNE, concluindo que a suplementação de lipídeo reduziu a mobilização de gordura naquelas condições experimentais.

Devido às diferentes composições das dietas, (menor inclusão de milho moído nas dietas com inclusão de lipídeo) os animais que receberam o tratamento controle, possivelmente, apresentaram maior ingestão de CNF. No entanto, essa maior ingestão de CNF não foi suficiente para influenciar a concentração de glicose plasmática. Como as coletas de sangue foram realizadas antes do fornecimento da alimentação matinal, houve tempo hábil para que a produção e liberação da insulina tenham equilibrado a glicemia dos animais no presente experimento. Cerri et al. (2009), avaliando a suplementação de Ca-AGCL de óleo de palma e Ca-AGCL rico em C18:2 n-6, Gonthier et al. (2005) e Gandra (2012) que avaliaram a suplementação de AGPI, também não observaram alterações nas concentrações sanguíneas de glicose. Contrariando esses resultados, Ballou et al. (2009) observaram que a suplementação lipídica tendeu a aumentar a glicose plasmática, e Greco (2014) observou aumento da glicose plasmática com a suplementação de gordura saturada quando comparada à gordura insaturada.

A homeostase do colesterol é mantida por uma complexa cadeia biosintética com mecanismos regulatórios, de transporte e secreção. Entre esses processos, a circulação entero-hepática do colesterol e os sais biliares estão envolvidos em papéis cruciais. A inclusão de lipídeo na dieta aumenta o colesterol total sanguíneo devido a maior formação de apolipoproteínas nos enterócitos para o transporte de ácidos graxos que chegam ao intestino delgado. O HDL é a principal lipoproteína plasmática (>80% do total de lipoproteínas) dos ruminantes. Essas são as principais partículas relacionadas ao sistema de transporte reverso do colesterol que retornam o excesso de colesterol das células periféricas para o fígado para excreção biliar e re-síntese de novas partículas de VLDL. Como a suplementação de fontes de lipídeo, teoricamente, aumentariam o consumo de EE era esperado que houvesse um aumento nos níveis de colesterol plasmático. Foi o ocorrido, onde houve interação tempo e dieta para colesterol total e LDL no período pós-parto, demonstrando que nas semanas 6 e 12 (Gráfico 1) a suplementação de lipídeo aumentou a concentração de colesterol total e de LDL plasmático. Por sua vez, tanto no período pré e pós-parto, a suplementação de gordura insaturada apresentou uma tendência de redução na concentração de colesterol HDL quando comparado à gordura

saturada. Como mencionado anteriormente, o HDL é a principal lipoproteína transportadora nos ruminantes, e a redução da sua concentração, sugere um menor consumo de ácidos graxos do grupo tratado com grão de soja cru e integral quando comparado ao Ca-AGCL de óleo de palma. Essa possível redução no consumo de EE explicaria os altos valores de AGNE, mesmo com uma menor produção de leite corrigida apresenta pelos animais pertencentes a esse tratamento. Assim como esses resultados, Bu et al. (2010) ao estudarem o efeito de óleos ricos em ácido linoleico (óleo de soja), ácido linolênico (óleo de semente de linhaça) ou uma combinação dos dois óleos encontraram concentrações de colesterol total, e colesterol LDL aumentadas em relação a dieta controle. O aumento nas concentrações desses parâmetros foi similar em estudos anteriores (GRUMMER; CARROL, 1991; PETIT et al., 2002). No entanto, contrariando o resultado desse experimento, diversos trabalhos comparam a suplementação de fontes AG saturados com insaturados (PETIT et al., 2004; FUENTES et al., 2007; GANDRA, 2012) e não obtiveram diferenças nas concentrações de colesterol HDL, porém, em nenhum desses experimentos, houve diferença de consumo entre as fontes de lipídeo, que seria a principal suspeita para explicar o resultado obtido.

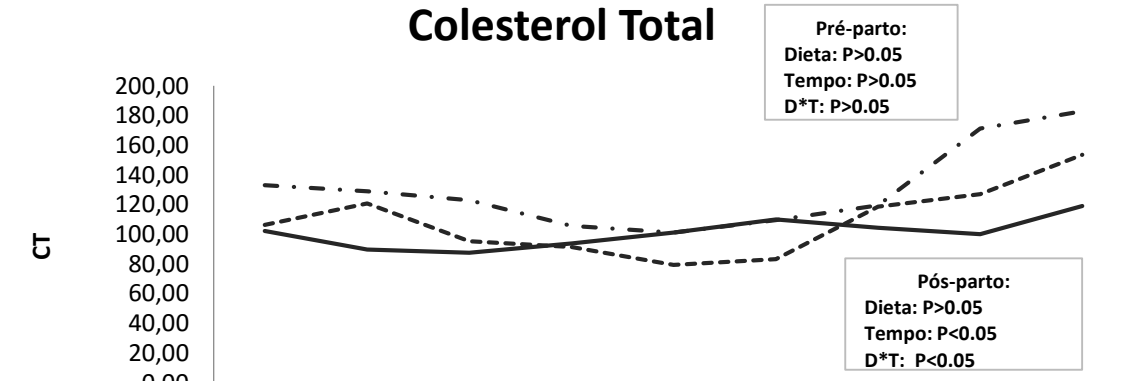
A lipoproteína é o agregado molecular responsável pelo transporte de lipídeos em meios líquidos, já que eles não se misturam facilmente com o plasma sanguíneo. Desta forma, os lipídeos são revestidos com fosfolipídeos, colesterol e proteínas. Sendo assim, é esperado que quando maior a quantidade de lipídeos sendo transportados, maior será a concentração de proteínas totais plasmática. Como a suplementação de lipídeo saturada aumentou a concentração de proteínas totais quando comparada com suplementação de gordura insaturada, sugere-se que as vacas alimentadas com gordura saturada apresentam uma maior quantidade de lipídeos circulantes, resultados esses que condizem com os encontrados para a variável Colesterol HDL.

Grande parte da metabolização dos ácidos graxos presentes na corrente sanguínea é realizada no tecido hepático, e um grande aporte de gordura no fígado pode representar danos para esse tecido, o que seria evidenciado pelo aumento das enzimas hepáticas AST e GGT. Como não houve diferença entre os tratamentos para essas enzimas, conclui-se que a suplementação de lipídeo, independente da fonte, não causa danos hepáticos nos animais.

As curvas que representam o perfil metabólico dos animais estão demonstradas nos gráficos abaixo.

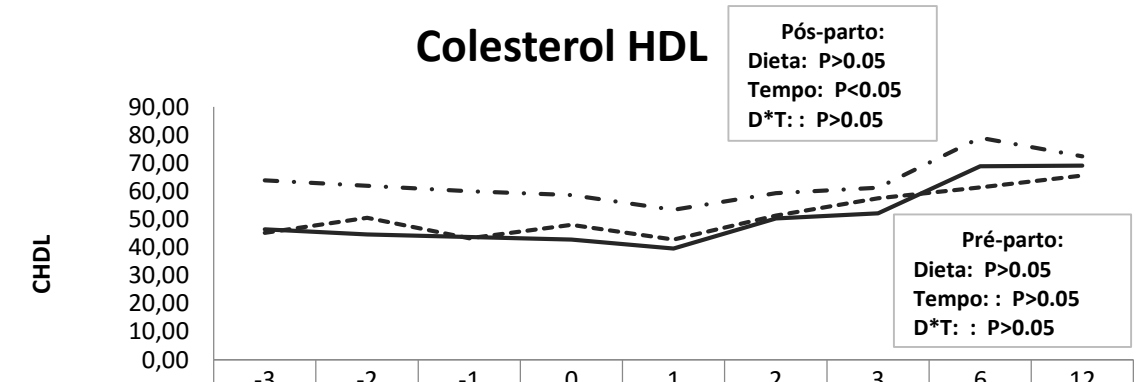
Gráfico 1 - Colesterol Total (A) e colesterol HDl (B) de acordo com as dietas experimentais

A



	-3	-2	-1	0	1	2	3	6	12
Controle	102,38	89,78	87,60	94,00	101,30	110,18	104,55	100,18	119,20*
Insaturada	106,43	120,86	95,43	91,60	79,50	83,38	118,63	127,14	153,63
Saturada	133,10	129,10	123,09	105,88	101,18	109,55	119,67	171,25	183,00

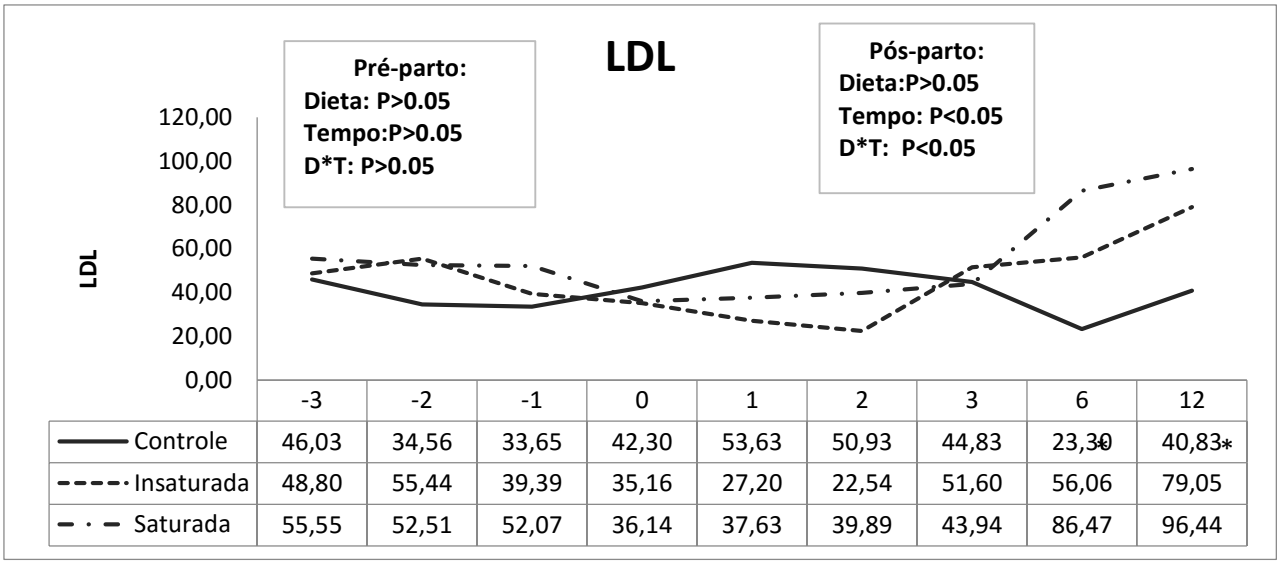
B



	-3	-2	-1	0	1	2	3	6	12
Controle	46,50	44,67	43,70	42,83	39,60	50,36	52,09	68,91	69,09
Insaturada	45,14	50,57	43,25	48,00	42,75	51,38	57,50	61,38	65,63
Saturada	63,90	61,91	60,00	58,63	53,36	59,27	61,30	79,00	72,36

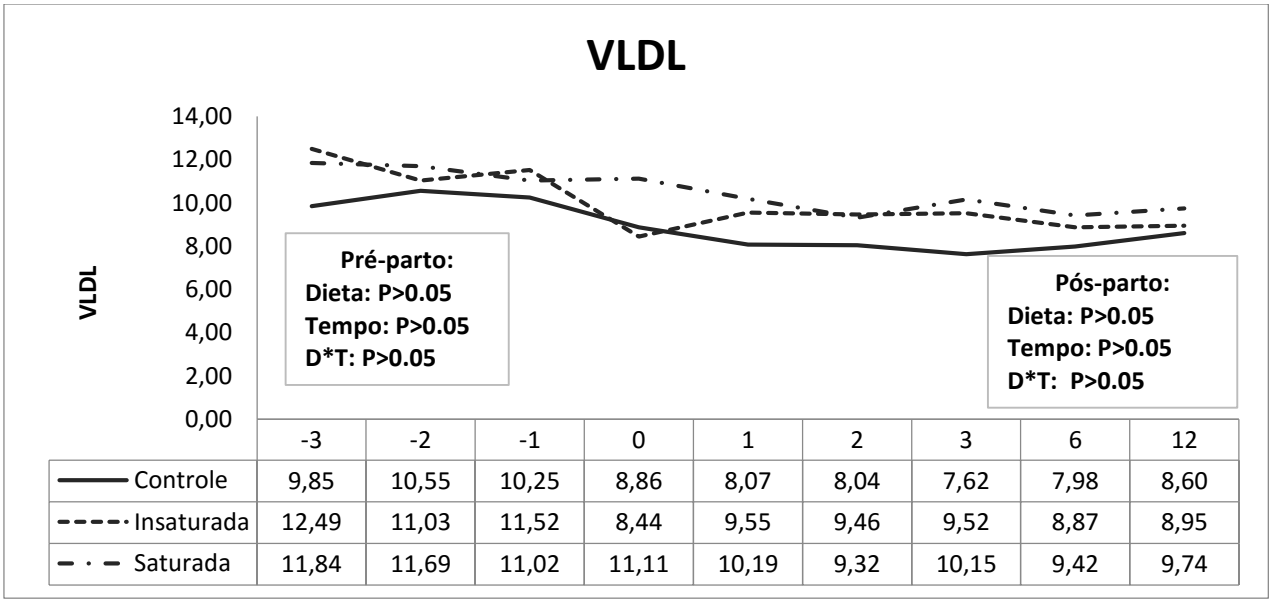
Gráfico 2 - Colesterol LDL (A) e colesterol VLDL (B) de acordo com as dietas experimentais

A



	-3	-2	-1	0	1	2	3	6	12
Controle	46,03	34,56	33,65	42,30	53,63	50,93	44,83	23,30*	40,83*
Insaturada	48,80	55,44	39,39	35,16	27,20	22,54	51,60	56,06	79,05
Saturada	55,55	52,51	52,07	36,14	37,63	39,89	43,94	86,47	96,44

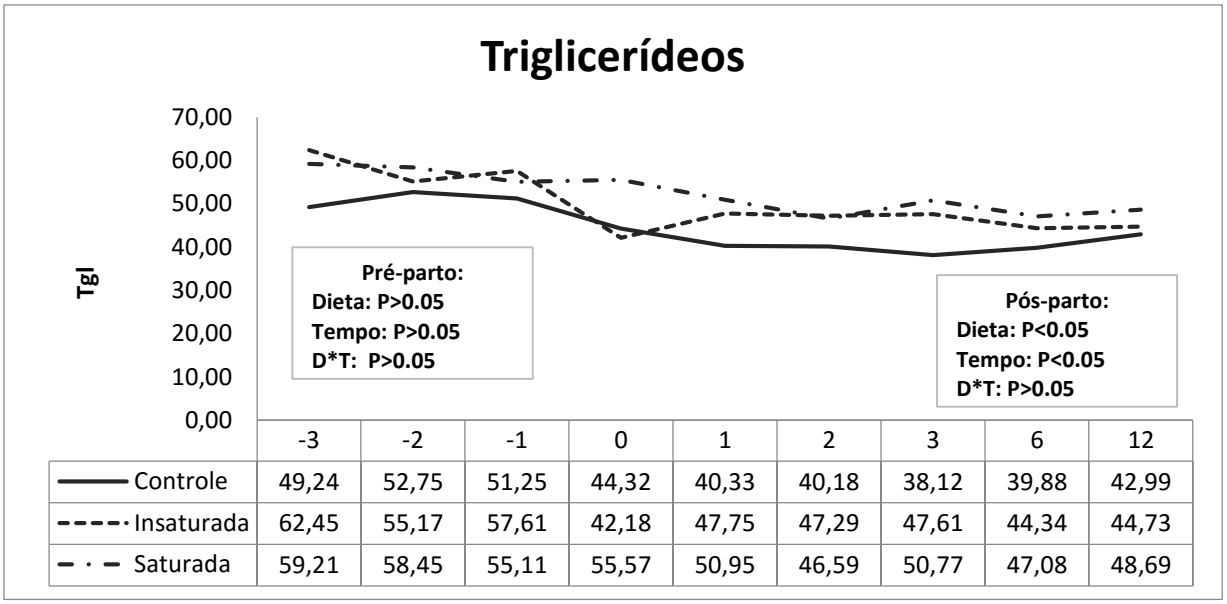
B



	-3	-2	-1	0	1	2	3	6	12
Controle	9,85	10,55	10,25	8,86	8,07	8,04	7,62	7,98	8,60
Insaturada	12,49	11,03	11,52	8,44	9,55	9,46	9,52	8,87	8,95
Saturada	11,84	11,69	11,02	11,11	10,19	9,32	10,15	9,42	9,74

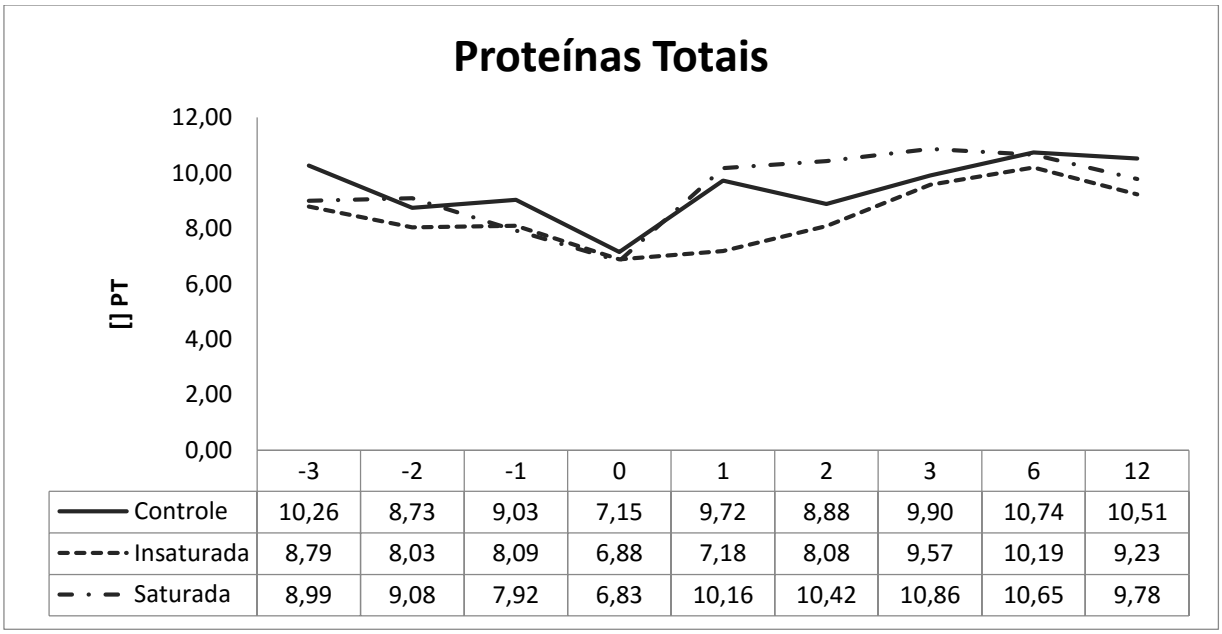
Gráfico 3 - Triglicerídeos (A) e proteínas totais (B) de acordo com as dietas experimentais

A



	-3	-2	-1	0	1	2	3	6	12
Controle	49,24	52,75	51,25	44,32	40,33	40,18	38,12	39,88	42,99
Insaturada	62,45	55,17	57,61	42,18	47,75	47,29	47,61	44,34	44,73
Saturada	59,21	58,45	55,11	55,57	50,95	46,59	50,77	47,08	48,69

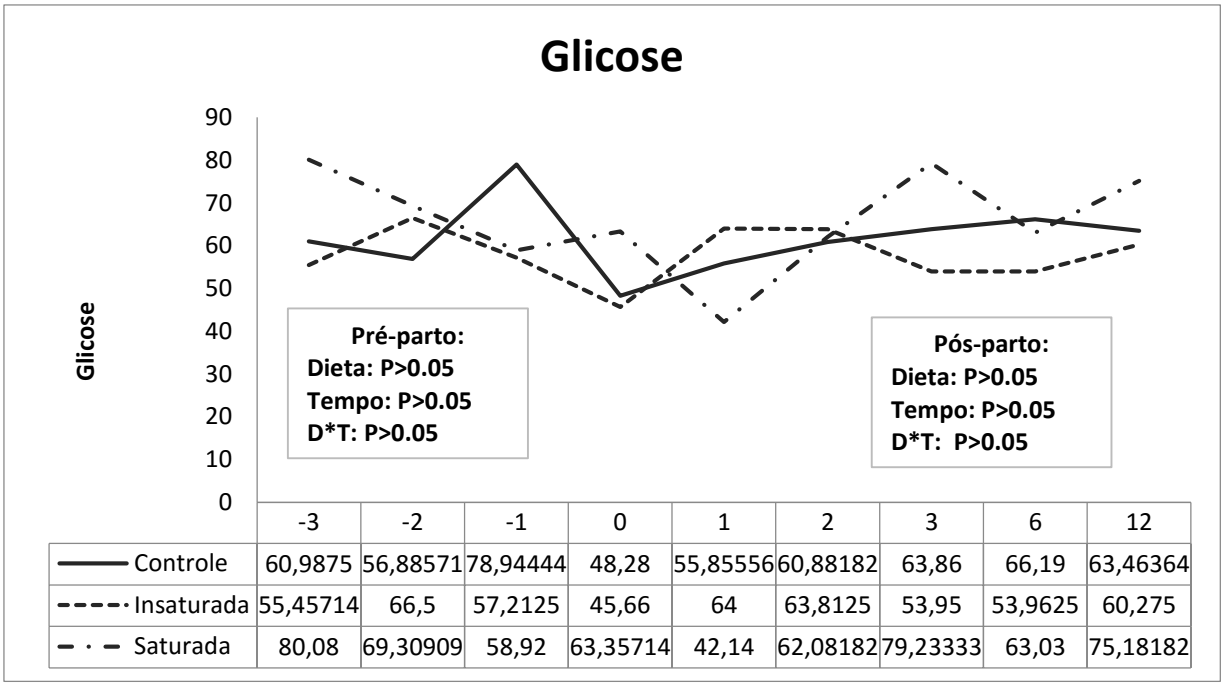
B



	-3	-2	-1	0	1	2	3	6	12
Controle	10,26	8,73	9,03	7,15	9,72	8,88	9,90	10,74	10,51
Insaturada	8,79	8,03	8,09	6,88	7,18	8,08	9,57	10,19	9,23
Saturada	8,99	9,08	7,92	6,83	10,16	10,42	10,86	10,65	9,78

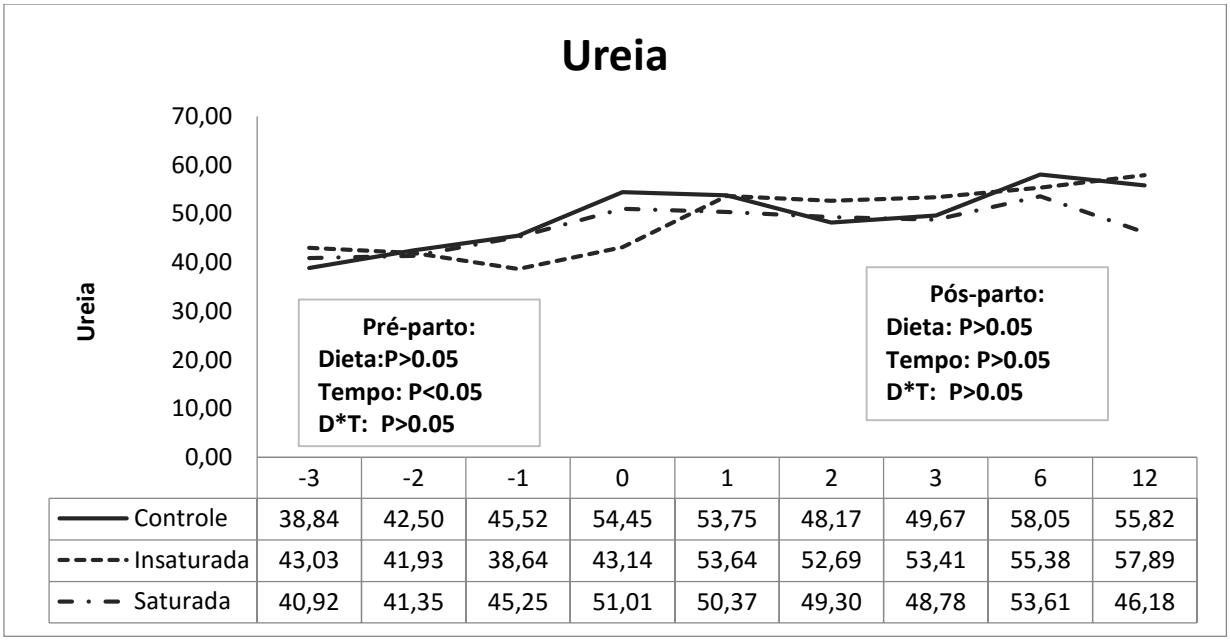
Gráfico 4 - Glicose (A) e ureia (B) de acordo com as dietas experimentais

A



	-3	-2	-1	0	1	2	3	6	12
Controle	60,9875	56,88571	78,94444	48,28	55,85556	60,88182	63,86	66,19	63,46364
Insaturada	55,45714	66,5	57,2125	45,66	64	63,8125	53,95	53,9625	60,275
Saturada	80,08	69,30909	58,92	63,35714	42,14	62,08182	79,23333	63,03	75,18182

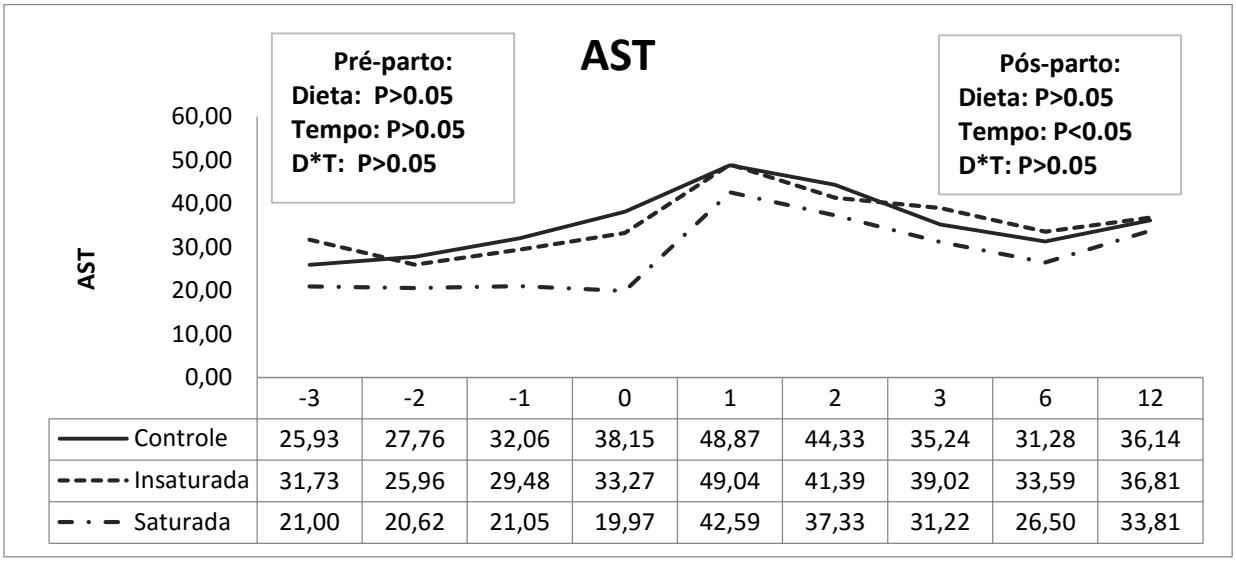
B



	-3	-2	-1	0	1	2	3	6	12
Controle	38,84	42,50	45,52	54,45	53,75	48,17	49,67	58,05	55,82
Insaturada	43,03	41,93	38,64	43,14	53,64	52,69	53,41	55,38	57,89
Saturada	40,92	41,35	45,25	51,01	50,37	49,30	48,78	53,61	46,18

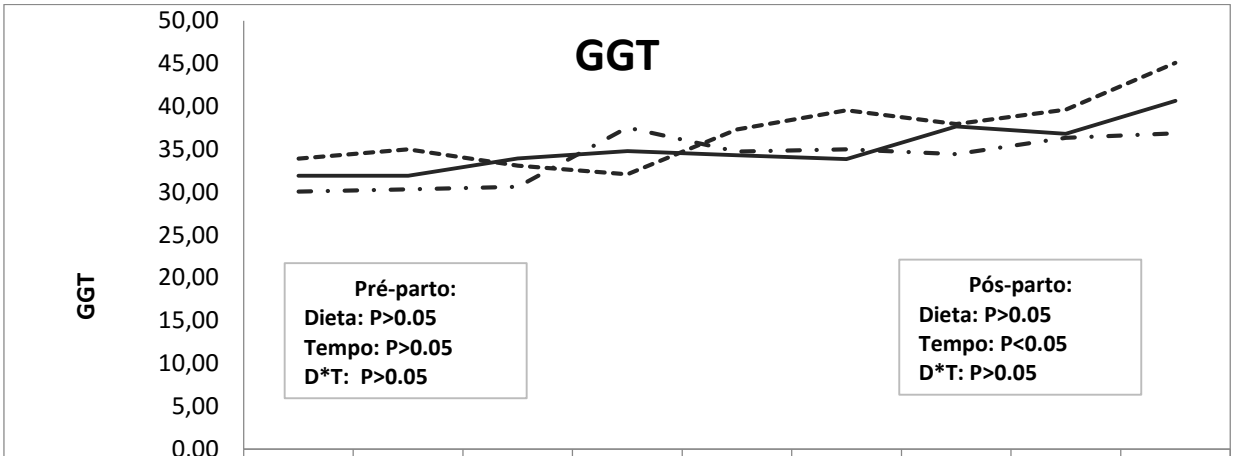
Gráfico 5 - AST (A) e GGT (B) de acordo com as dietas experimentais

A



	-3	-2	-1	0	1	2	3	6	12
Controle	25,93	27,76	32,06	38,15	48,87	44,33	35,24	31,28	36,14
Insaturada	31,73	25,96	29,48	33,27	49,04	41,39	39,02	33,59	36,81
Saturada	21,00	20,62	21,05	19,97	42,59	37,33	31,22	26,50	33,81

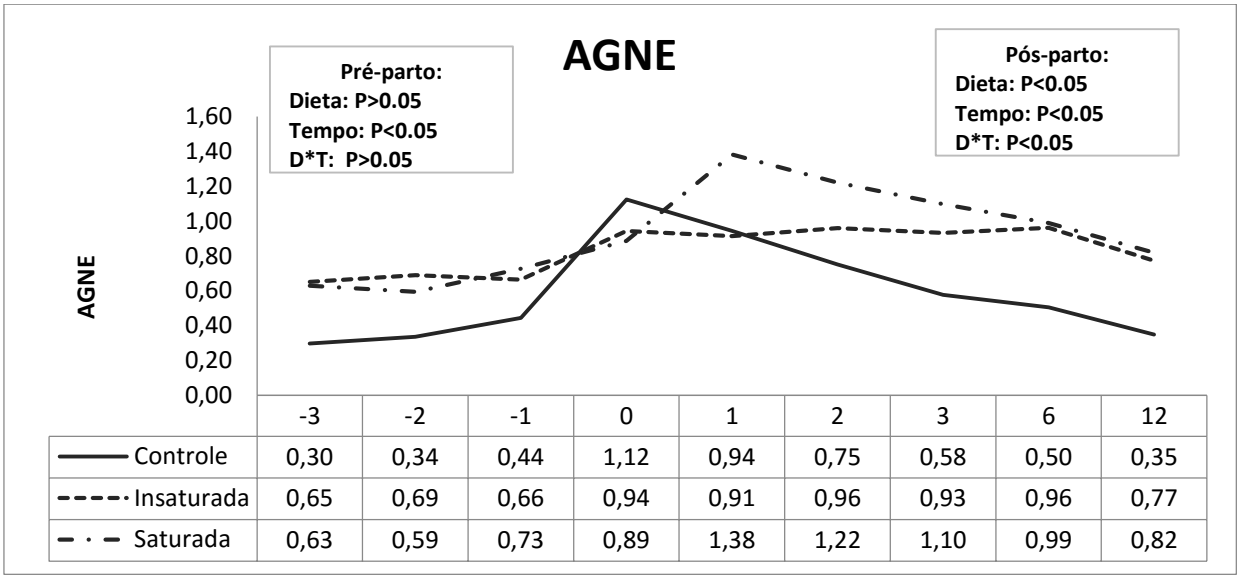
B



	-3	-2	-1	0	1	2	3	6	12
Controle	31,90	31,89	33,91	34,79	34,30	33,84	37,66	36,79	40,66
Insaturada	33,91	35,00	33,09	32,07	37,30	39,53	37,94	39,61	45,09
Saturada	30,03	30,31	30,60	37,54	34,71	35,00	34,43	36,34	36,84

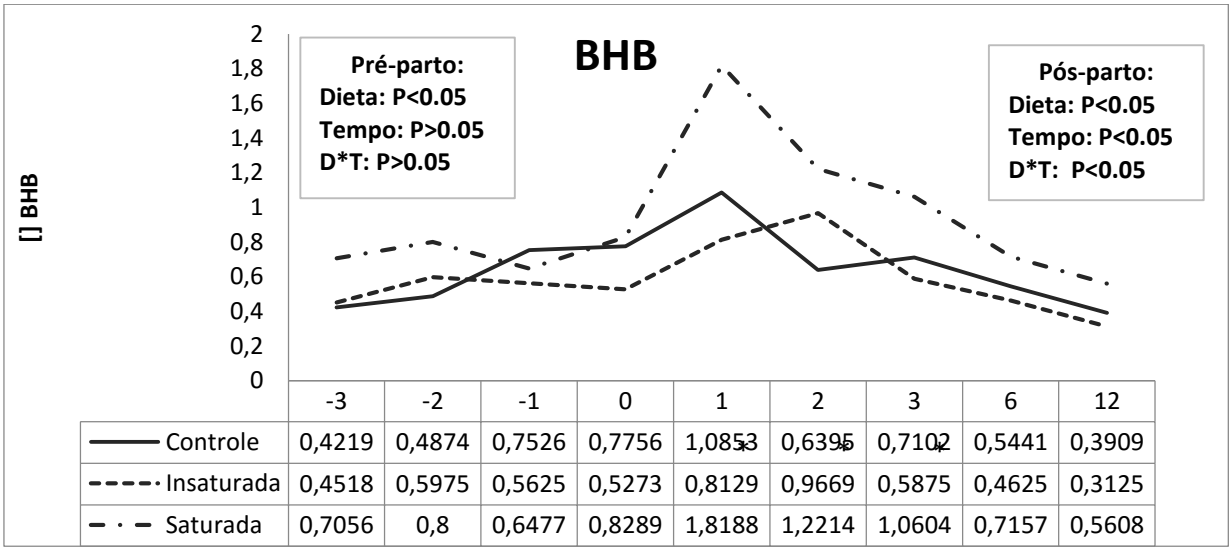
Gráfico 6 - AGNE (A) e BHB (B) de acordo com as dietas experimentais

A



	-3	-2	-1	0	1	2	3	6	12
Controle	0,30	0,34	0,44	1,12	0,94	0,75	0,58	0,50	0,35
Insaturada	0,65	0,69	0,66	0,94	0,91	0,96	0,93	0,96	0,77
Saturada	0,63	0,59	0,73	0,89	1,38	1,22	1,10	0,99	0,82

B



	-3	-2	-1	0	1	2	3	6	12
Controle	0,4219	0,4874	0,7526	0,7756	1,0853	0,6395	0,7102	0,5441	0,3909
Insaturada	0,4518	0,5975	0,5625	0,5273	0,8129	0,9669	0,5875	0,4625	0,3125
Saturada	0,7056	0,8	0,6477	0,8289	1,8188	1,2214	1,0604	0,7157	0,5608

6.2 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Os resultados de produção e composição do leite estão listados na Tabela 5. Foram encontrados efeitos de dieta (P<0,05) para as variáveis produção (kg) e teor (%) de gordura, e efeitos de tempo (P<0,05) para todas as variáveis, exceto produção de gordura no leite. Foi

encontrado (P<0,05) interação tempo dieta, para produção de leite. Quando comparada a suplementação de lipídeos com a dieta controle, não foram observadas diferenças, porém quando comparada as duas fontes de lipídeo, a suplementação de grão de soja integral reduziu (P>0,05) o teor de gordura no leite, e as produções de proteína gordura e no leite e consequentemente a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura quando comparada à dieta com Ca-AGCL de óleo de palma.

Dados da literatura sobre a influência lipídica na produção de leite são inconsistentes. Apesar das fontes de gordura possuírem elevado teor energético (CHILLIARD et al., 1993), sua influência negativa sobre o consumo de matéria seca (ALLEN, 2000), muitas vezes diminui a ingestão de energia pelo animal, gerando resultados, em alguns casos, negativos para a produção de leite. No presente estudo, a suplementação de lipídeo não alterou a produção de leite, demonstrando que a maior densidade energética com a inclusão de fontes de lipídeo (Tabela 3) não foi suficiente para aumentar o desempenho produtivo dos animais.

Condizendo com os resultados do presente estudo, diversos trabalhos compararam a suplementação de lipídeo com dietas sem inclusão de lipídeos e, ou não obtiveram alteração dos animais tratados. Gandra (2012), comparando dietas sem inclusão de lipídeo, com 3 dietas com fontes diferentes de gordura inertes no rúmen (uma fonte de n-3 e duas fontes de n-6) não observaram alteração na produção de leite. Freitas Júnior et al. (2010) compararam dieta sem inclusão de fontes de lipídeo, com dietas com inclusão de lipídeos (óleo de soja, grão de soja e Ca-AGCL de óleo de soja) e também não observaram alteração na produção de leite.

Contrariando esses dados, Chilliard (1993) sumarizou diversos estudos envolvendo a suplementação de lipídeo para vacas leiteiras, e observou 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. Onetti e Grummer (2004) compilaram dados de 41 experimentos que avaliaram a suplementação de diferentes fontes e níveis de lipídeo nas rações de vacas em lactação e relataram diversos aumentos na produção de leite. Em meta-análise comparando 38 estudos, Rabiee et al. (2012) observaram aumento de 1,05 Kg/animal em vacas suplementadas com fontes de lipídeo. Já Simas et al. (1995) suplementaram vacas no início de lactação com Ca-AGCL e observaram redução na produção de leite, assim como Petit et al. (2007), que observaram nas vacas tratadas com dieta controle maior produção de leite quando comparada aos animais tratados com dietas com gordura saturada ou com gordura insaturada.

Quando comparado especificamente as fontes de suplementação de lipídeos sobre a produção de leite, não houve diferença entre os tratamentos. Alguns estudos obtiveram resultados semelhantes ao desse estudo. Cerri et al. (2009); Theurer et al. (2009) e Caldari-

Torres et al. (2011) compararam a suplementação de Ca-AGCL de óleo de palma e Ca-AGCL de ácidos graxos poli-insaturados e ambos, não obtiveram alteração na produção de leite. Já, Harvatine e Allen (2006) avaliaram a suplementação de sais de cálcio de ácidos graxos comparando níveis de insaturação e descreveram redução linear na produção de leite de acordo com a quantidade de ácidos graxos insaturados utilizados. Essa queda na produção de leite foi explicada pelos autores pela também redução linear de ingestão de matéria seca conforme o aumento da concentração de ácidos graxos poli-insaturados na dieta.

A gordura do leite é derivada de duas fontes: os ácidos graxos de cadeia curta e média (respectivamente 4 a 8 carbonos e de 10 a 14 carbonos) são sintetizadas pela glândula mamária através da síntese *De Novo*, enquanto que os ácidos graxos de cadeia longa (< 18c) são absorvidos diretamente da glândula mamária, sendo ácidos graxos provenientes da dieta ou da metabolização do tecido adiposo.

Os ácidos graxos de 16 carbonos podem ser derivados das duas fontes (BAUMAN; GRIINARI, 2003). No presente estudo, a suplementação de grão de soja integral reduziu o teor e a produção total de lipídeo quando comparado à dieta com Ca-AGCL de óleo de palma. A principal hipótese para esse resultado era a produção do CLA trans-10 cis-12. Bauman e Griinari (2001) demonstraram efeito negativo na síntese da gordura do leite causado por esse AG, através da inibição de diversas enzimas responsáveis pela síntese “de novo” e ,em menor proporção, da absorção de ácidos graxos da corrente sanguínea pela glândula mamária. O CLA trans-10, cis-12 é produzido pela rota alternativa de biohidrogenação ruminal de ácidos graxos poli-insaturados. Dentre alguns fatores, o pH ruminal é o que mais influência essas rotas bioquímicas, sendo que, quanto menor o pH maior o deslocamento da rota principal para a rota alternativa, aumentando a produção desse isômero do CLA (BAUMANN; LOCK, 2006). Assim características intrínsecas inerentes à dieta interferem de forma direta o perfil de ácidos graxos que chegam ao intestino delgado, alterando a produção de gordura na glândula mamária. No entanto, a análise do perfil de ácidos graxos do leite não detectou alteração desse ácido graxo entre os tratamentos, o que reduz a possibilidade desse fato ser a explicação desse resultado.

No entanto, o perfil metabólico dos animais (Tabela 4), sugere que houve uma redução da ingestão e transporte de ácidos graxos com a suplementação de grão de soja quando comparada à dieta com Ca-AGCL de óleo de palma, sendo, portanto, a possível explicação pela menor produção de gordura no leite desses animais. Concordando com esse estudo, Harvatine e Allen (2006) avaliaram a suplementação de Ca-AGCL diferindo na concentração de ácidos graxos insaturados. Foi observado redução linear na produção de gordura do leite conforme o

aumento da instauração dos ácidos graxos. Cerri et al. (2009) compararam a suplementação de Ca-AGCL de óleo de palma com Ca-AGCL rico em C18:2 n-6 e também observaram redução na gordura do leite com a utilização de ácidos graxos poli-insaturados.

No presente experimento as diferentes dietas não influenciaram o teor de proteína do leite, porém a suplementação com grão de soja integral reduziu a produção de proteína (Kg/dia) quando comparada à suplementação com Ca-AGCL. Dados sobre a influência da suplementação lipídica sobre proteína do leite são inconsistentes. No entanto, diversos estudos têm demonstrado redução na produção de proteína do leite, sendo as principais teorias o efeito de diluição devido ao aumento na produção de leite (GARNSWORTHY, 2002), e a falta de energia em nível ruminal diminuindo a síntese de proteína microbiana (CANT et al., 1993). Wu e Hurber (1993) revisaram dados de 49 experimentos, envolvendo 83 comparações entre rações com e sem adição de lipídeo em vacas leiteiras, e observaram que na maioria dos casos o teor de proteína foi reduzido pela adição de fontes de lipídeo nas rações. Em sua compilação de dados, Onetti e Grummer (2004) relataram redução na proteína do leite no início de lactação e tendência ($p=0.07$) de redução de proteína do leite no meio de lactação para vacas suplementadas com fontes de ácidos graxos saturados inertes no rúmen. Condizendo com esse experimento, Cerri et al. (2009) compararam a suplementação de Ca-AGCL de óleo de palma e Ca-AGCL rico em ácido linoleico, e também relataram redução da proteína do leite com a suplementação de ácidos graxos poli-insaturados. Já Harvatine e Allen (2006) compararam suplementação de lipídeo com diferentes níveis de saturação e não relataram diferença para proteína do leite em relação ao tipo de ácido graxo utilizado. Contrariamente a esses dados, Warntjes et al. (2007) relataram aumento na proteína do leite com a suplementação lipídica de gordura saturada, porém os animais estavam sobre estresse térmico.

Tabela 5 - Média (±EPM) da produção e composição do leite de acordo com as dietas experimentais

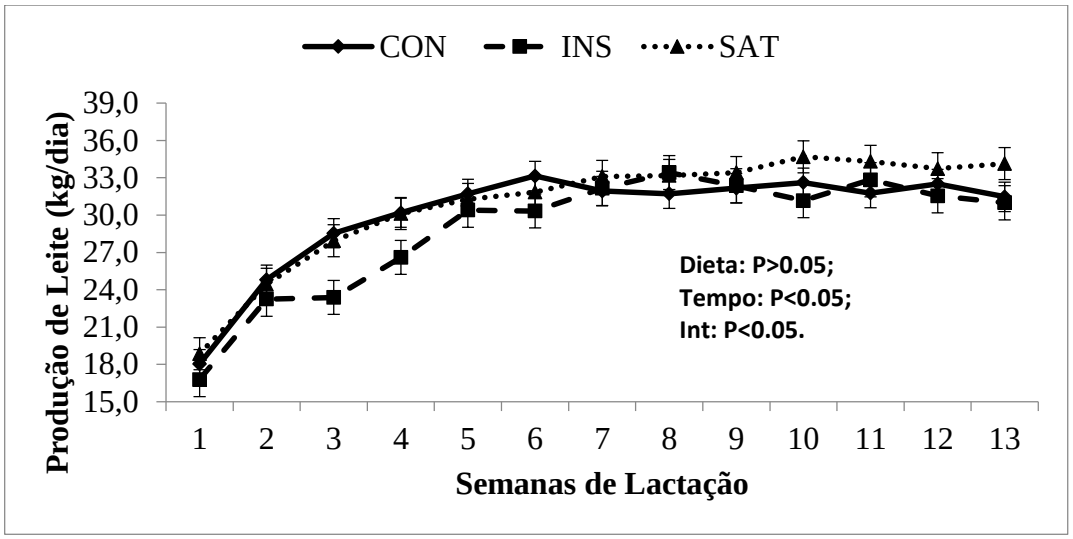
	Dietas Experimentais[1]			Probabilidades[2]				
	CON	INS	SAT	Dieta	Tempo	Int	C1	C2
Kg/dia								
PL[3]	30,16± 1,58	29,27±1,85	30,98±1,58	0,784	<,0001	0,131	0,984	0,490
PLC[4]	31,16±1,52	28,12±1,79	33,41±1,52	0,098	0,0005	0,205	0,842	0,033
Gordura	1,09 ±0,05	0,96±0,07	1,22±0,05	0,025	0,259	0,471	0,959	0,007
Proteína	0,9±0,01	0,88±0,01	0,94±0,01	0,068	<,0001	0,576	0,822	0,024
Lactose	1,35±0,07	1,29±0,08	1,40±0,07	0,612	<,0001	0,172	0,939	0,326
Teor (%)								
Gordura	3,59 ± 0,12	3,31±0,14	4,05±0,12	0,002	0,043	0,251	0,577	0,006
Proteína	3,01±0,03	3,01±0,03	3,03±0,03	0,796	<,0001	0,059	0,665	0,639
Lactose	4,51±0,04	4,51±0,05	4,54±0,04	0,864	<,0001	0,051	0,811	0,651

[1]CON (controle); INS (grão de soja); SAT (saís de cálcio de óleo de palma). [2]INT (interação dieta X tempo); C1: contraste 1 (CON x INS e SAT); C2: contraste 2 (INS x SAT). [3]Produção de leite; [4]Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura.

Como não houve efeito na produção de leite, porém com efeito negativo para produção de gordura do leite, a suplementação com grão de soja reduziu a produção de leite corrigida para 3,5% em relação à suplementação com gordura saturada, demonstrando que nas características do presente estudo, a suplementação de grão de soja reduziu o desempenho produtivo dos animais. Esse resultado condiz com outros experimentos que compararam suplementação de ácidos graxos saturados e insaturados e obtiveram redução na gordura do leite, sem no entanto, alterar a produção de leite (CERRI et al., 2009), e em experimentos que deprimiram tanto a produção de leite como a gordura do leite (HARVATINE; ALLEN, 2006).

Gráfico 7 - Produção de leite (A) e produção de leite corrigida (B) de acordo com as dietas experimentais.

A



B

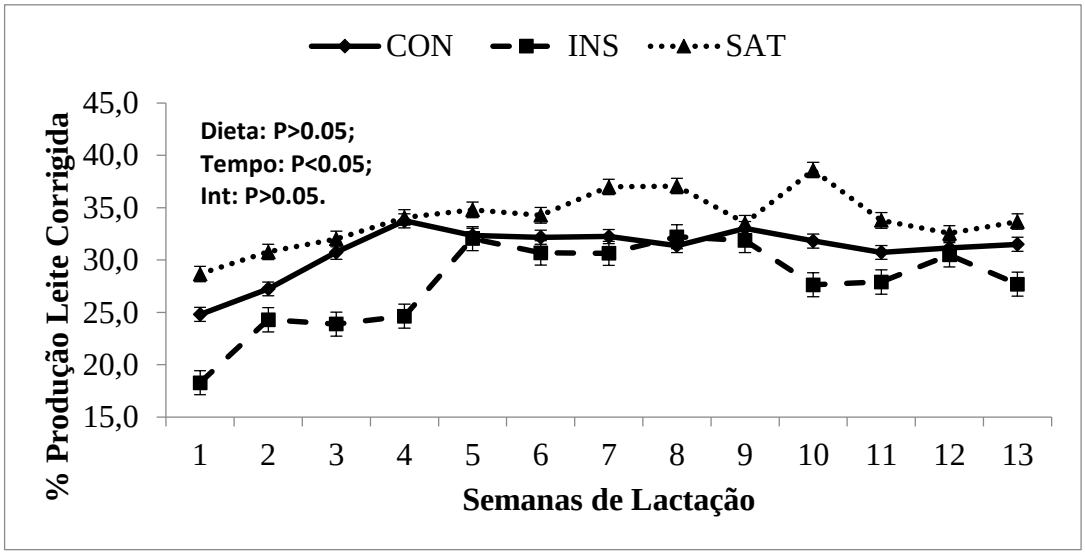
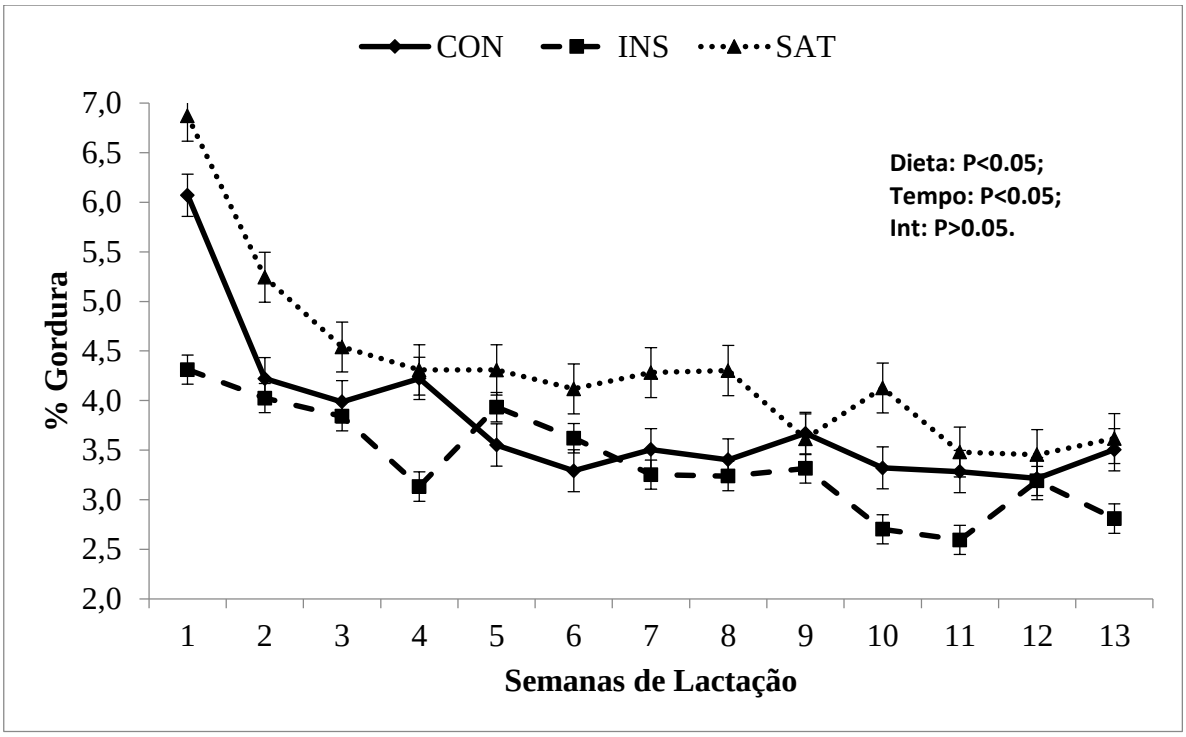


Gráfico 8- Teor de gordura (A) e produção de gordura (B) de acordo com as dietas experimentais

A



B

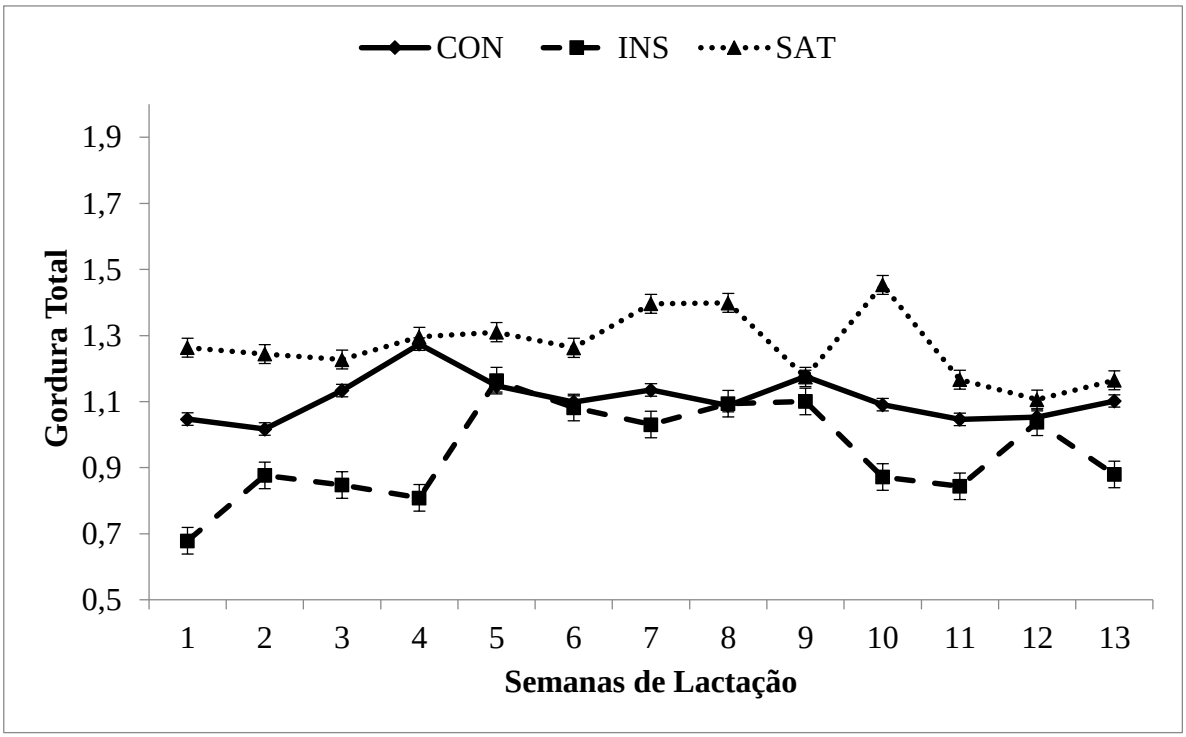
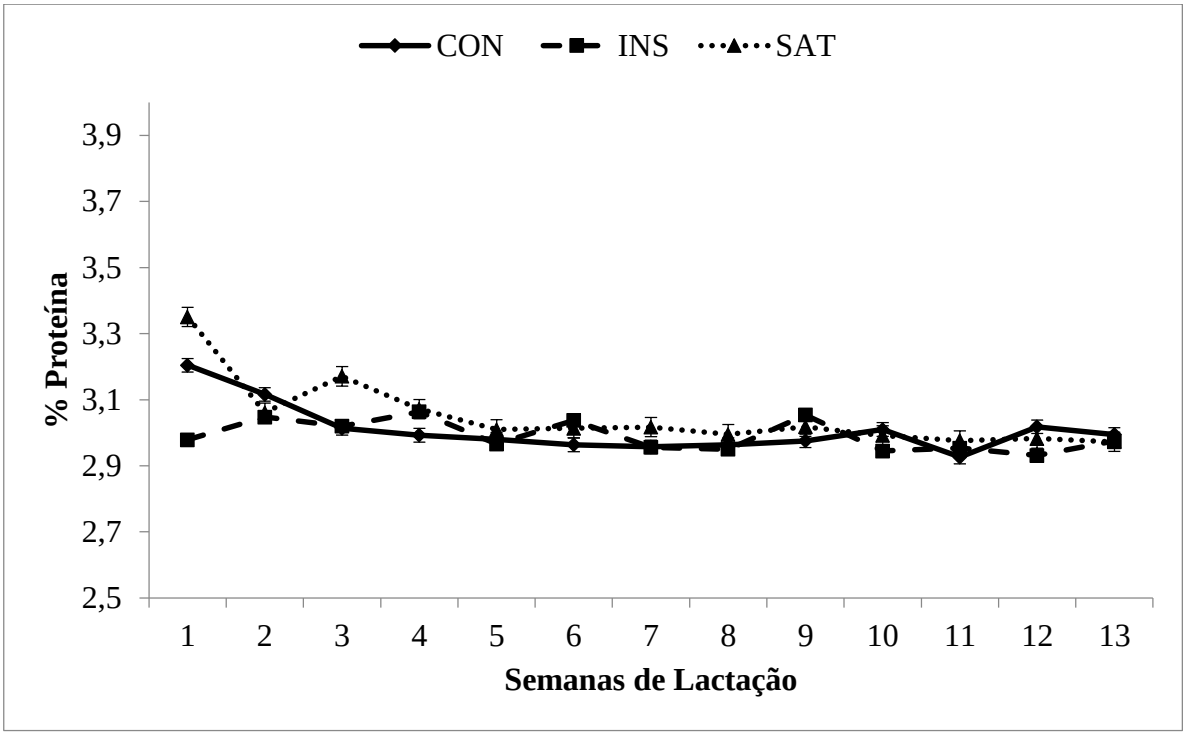
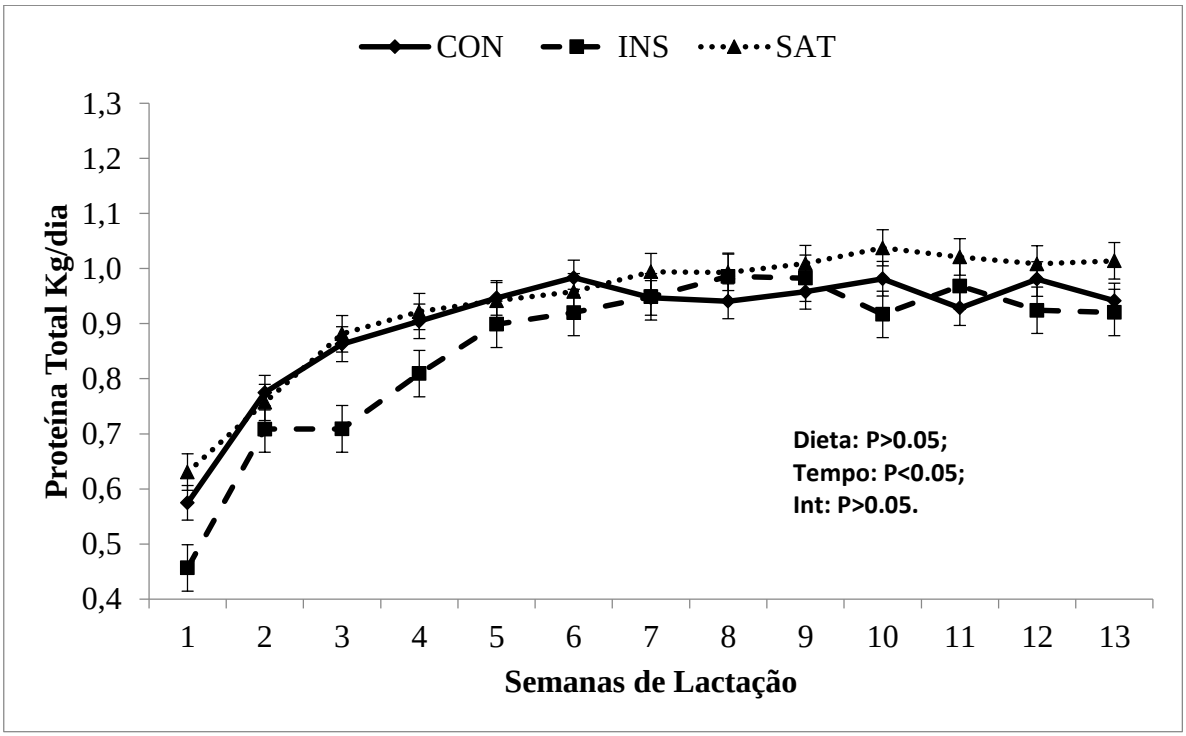


Gráfico 9 - Teor de proteína (A) e produção de proteína (B) de acordo com as dietas experimentais

A



B



6.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE

O resultado do perfil de ácido graxo do leite está na tabelas 6 e 7. Analisando individualmente, a grande maioria dos ácidos graxos analisados apresentaram efeito de dieta ($p<0,05$), excetuando os ácidos graxos C4:0, C14:1, C16:1, C17:1, C18:1 n9,c, C20:0, CLA c9, CLA t10*, e C20:3 n6. Também foi observado efeito ($p<0,05$) de tempo para a grande maioria dos ácidos graxos, exceto C6:0, C8:0 , C17:1*, C18:1 n9,t, C18:2 n6,c, C20:0, C18:3 n3, CLA c9, CLA t10*, C22:0, C20:4 n6. Foi observado interação ($p<0,05$) entre dieta e tempo para os ácidos graxos C11:0 e C14:1. (Tabela 6).

Tabela 6 - Perfil de ácido graxos do leite de acordo com as dietas experimentais – Análise individual

(Continua)

Item		Dietas[1]			Média	EPM[2]	P-valor[3]				
		CON	INS	SAT			DIETA	TEMP	INT	*C1*	*c2*
C4:0	Butírico	1.22	1.10	1.26	1.20	0.021	0.059	<0.001	0.553	0.494	0.020
C6:0	Capróico	1.51	1.26	1.19	1.32	0.032	0.012	0.975	0.433	0.004	0.569
C8:0	Caprílico	1.06	0.89	0.75	0.90	0.029	0.008	0.078	0.538	0.007	0.153
C10:0	Cáprico	2.53	2.13	1.64	2.09	0.081	0.005	<0.001	0.658	0.007	0.076
C11:0	Undecanóico	0.06	0.09	0.03	0.06	0.005	0.007	<0.001	0.006	0.883	0.002
C12:0	Láurico	2.96	2.51	1.90	2.45	0.096	0.004	<0.001	0.538	0.006	0.063
C13:0	Tridecanóico	0.16	0.14	0.09	0.13	0.006	0.001	<0.001	0.761	0.023	0.004
C14:0	Mirístico	10.25	8.62	7.38	8.76	0.222	<0.001	<0.001	0.596	<0.001	0.048
C14:1	Miristoleico	0.64	0.61	0.53	0.59	0.020	0.221	<0.001	0.032	0.235	0.245
C15:0	Pentadecanóico	0.86	0.87	0.61	0.77	0.027	0.002	<0.001	0.344	0.082	0.003
C16:0	Palmítico	31.17	28.21	33.21	31.13	0.375	<0.001	<0.001	0.057	0.615	<0.001
C16:1	Palmitoleico	1.24	1.05	1.33	1.22	0.034	0.119	0.039	0.326	0.672	0.042
C17:0	Heptadecanóico	0.55	0.57	0.45	0.52	0.008	<0.001	0.747	0.128	0.019	<0.001
C17:1*	Heptadecanóico	0.01	0.01	0.02	0.01	0.005	0.797	0.664	0.361	0.539	0.840
C18:0	Esteárico	11.42	13.17	11.62	11.96	0.216	0.027	<0.001	0.635	0.078	0.024
C18:1 n9,t	Elaídico	0.25	0.26	0.41	0.31	0.013	<0.001	0.207	0.495	0.019	0.001
C18:1 trans11	Vacênico	0.74	0.70	0.98	0.81	0.028	0.001	0.002	0.466	0.133	0.001
C18:1 n9,c	Oleico	24.89	27.50	28.07	26.75	0.509	0.163	<0.001	0.740	0.067	0.764
C18:2 n6,c	Linoleico	2.64	3.71	2.67	2.94	0.075	<0.001	0.306	0.133	0.007	<0.001
C20:0	Araquídico	0.12	0.13	0.11	0.12	0.002	0.063	0.133	0.446	0.412	0.023
C20:1 n9	Eicosaenóico	0.04	0.05	0.05	0.05	0.002	0.015	<0.001	0.371	0.004	0.770
C18:3 n3	alfa-Linolênico	0.14	0.28	0.14	0.17	0.008	<0.001	0.776	0.211	<0.001	<0.001
CLA c9	Linoleico conj.	0.35	0.35	0.41	0.37	0.012	0.174	0.622	0.336	0.406	0.111

(Conclusão)

Item		Dietas[1]			Média	EPM[2]	P-valor[3]				
		CON	INS	SAT			DIETA	TEMP	INT	*C1*	*c2*
CLA t10*	Linoleico conj.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.001	0.425	0.231	0.344	0.293	0.384
C22:0*	Behênico	0.00	0.02	0.00	0.01	0.002	<0.001	0.157	0.356	0.010	<0.001
C20:3 n6	Eicosatrienóico	0.08	0.10	0.07	0.08	0.004	0.105	<0.001	0.751	0.874	0.035
C20:4 n6	Araquidônico	0.14	0.15	0.11	0.13	0.004	0.008	0.579	0.105	0.235	0.005

[1]Dietas: CON: controle; INS: insaturada; SAT: saturada; [2]EPM: erro padrão da média; [3]D*T: Interação dieta*tempo; C1: C0N vs (INS + SAT); C2: INS vs SAT;

Tabela 7 - Perfil de ácido graxos do leite de acordo com as dietas experimentais – Análise em grupo

Item		Dietas[1]			Média	EPM[2]	P-valor[3]				
		CON	INS	SAT			DIETA	TEMP	INT	*C1*	*c2*
Σ											
Σ A.G. Saturados	(SFA)	63.99	59.84	60.26	61.52	0.582	0.074	<0.001	0.486	0.024	0.836
Σ AG Insaturados		31.42	35.02	35.06	33.71	0.545	0.096	<0.001	0.649	0.033	0.982
Σ A.G. Monoinsaturados	(MUFA)	27.99	30.43	31.66	29.99	0.531	0.128	<0.001	0.731	0.063	0.529
Σ A.G. Polinsaturados	(PUFA)	3.36	4.59	3.40	3.71	0.089	<0.001	0.283	0.163	0.010	<0.001
Σ Outros A.G.		4.47	4.73	4.68	4.61	0.075	0.688	0.390	0.369	0.393	0.853
Σ SFA/(MUFA+PUFA)		2.07	1.76	1.77	1.88	0.047	0.068	<0.001	0.650	0.022	0.988
Total											
<C16		21.34	18.33	15.39	18.36	0.491	0.001	<0.001	0.462	0.001	0.051
C16		32.47	29.33	34.60	32.41	0.374	<0.001	<0.001	0.021	0.581	<0.001
>C16		41.60	47.19	45.33	44.46	0.626	0.019	<0.001	0.295	0.007	0.343
Total C18											
Saturados	(SAT)	11.42	13.17	11.62	11.96	0.216	0.027	<0.001	0.635	0.078	0.024
Insaturados	(INS)	28.70	32.35	32.34	31.01	0.530	0.077	<0.001	0.562	0.025	0.996
INS/SAT		2.55	2.54	2.82	2.65	0.056	0.329	0.134	0.981	0.475	0.218

[1]Dietas: CON: controle; INS: insaturada; SAT: saturada; [2]EPM: erro padrão da média; [3]D*T: Interação dieta*tempo; C1: C0N vs (INS + SAT); C2: INS vs SAT;

Quando analisados em grupos (Tabela 7), a somatória das concentrações dos ácidos graxos poli-insaturados totais, os ácidos graxos com menos 16 carbonos (<C16) e os com mais de 16 carbonos (>C16) apresentaram efeito (p<0,05) de dieta. Todos os grupos de ácidos graxos analisados presentaram efeito de tempo, exceto a somatória de ácidos graxos poli-insaturados (Σ AG poli-insaturados), somatória de outros ácidos graxos (Σ Outros AG) e a relação insaturado/saturado nos ácidos graxos com 18C. O total de ácidos graxos com 16C apresentou (p<0,05) interação tempo e dieta.

A suplementação de lipídeo (C1) reduziu (p<0,05) as concentrações do somatório dos ácidos graxos saturados (Σ A.G. Saturados), dos ácidos graxos com menos de 16 carbonos (>C16), e da relação entre ácidos graxos saturados com insaturados (Σ SFA/(MUFA+PUFA)); e aumentou (p<0,05) as concentrações de ácidos graxos acima de 16 carbonos (>C16), de ácidos graxos insaturados com 18 carbonos, da somatória dos ácidos graxos insaturados (Σ AG Insaturados) e dos ácidos graxos poli-insaturados (Σ A.G. Poli-insaturados). Analisando individualmente, a suplementação de lipídeo, reduziu (p<0,05) as concentrações dos ácidos graxos C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C13:0, C14:0 e C17:0, e aumentou (p<0,05) as concentrações dos ácidos graxos C18:1 n9,t, C18:2 n6,c, C20:1 n9, C18:3 n3, C22:0*.

Quando comparada as duas fontes de lipídeo (C2), o grão de soja, aumentou (p<0,05) a concentração de ácidos graxos poli-insaturados totais (Σ A.G. poli-insaturados), e reduziu (p<0,05) o total de ácidos graxos de 16 carbonos (C16), quando comparado ao Ca-AGCL rico em ácido palmítico. Analisando individualmente os ácidos graxos (C2), a suplementação de grão de soja, quando comparada ao sal de cálcio rico em ácido palmítico, aumentou (p<0,05) as concentrações dos ácidos graxos C11:0, C13:0, C15:0, C:17:0, C18:0, C18:2 n6,c, C20:0, C18:3 n3, C22:0*, C20:3 n6 e C20:4 n6, e reduziu as concentrações (p<0,05) dos C4:0, C14:0, C16:0, C16:1, C18:1 n9,t, e C18:1 trans11.

O lipídeo é um dos componentes mais abundantes do leite e o mais variável. Ela é composta primariamente por triglicerídeos que compõem aproximadamente 98% do total da gordura do leite, e em menores quantidades por diacilglicerídeos (0,25-0,48%); monoacilglicerídeos (0,02-0,4%); glicolipídeos (0,006%) e ácidos graxos livres (0,1 0,4%). Os ácidos graxos saturados são responsáveis por aproximadamente 70% do conteúdo total, sendo o mais abundante o C16, sendo seu conteúdo de 30% aproximadamente. Aproximadamente 25% são monoinsaturados sendo o mais abundante o C18:1 (23,8%). Os poli-insaturados correspondem aproximadamente 2,3%, sendo os mais importantes o C18:2 (1,7%) e C18:3 (0,7%) (CHILLIARD et al., 2007). Grandes variações do teor de gordura do leite são observadas, sendo a magnitude desta variação muito superior à observada para os demais componentes do leite (lactose, proteína e outros nutrientes presentes em menores quantidades).

A gordura do leite pode ser proveniente de duas formas: absorção direta, via corrente sanguínea, de ácidos graxos provenientes da dieta ou da mobilização do tecido adiposo; e/ou através da síntese de ácidos graxos na própria glândula mamária, processo conhecido como síntese de novo. A síntese de novo é responsável pelos ácidos de 4 a 14 carbonos e por parte dos ácidos graxos de 16 carbonos, sendo o restante, absorvido diretamente da corrente sanguínea. Os resultados demonstraram que a suplementação de lipídeo aumentou as

concentrações dos ácidos graxos insaturados totais, dos ácidos graxos poli-insaturados e de ácidos graxos de cadeia longa (>C16), e reduziu as concentrações de ácidos graxos saturados totais e a relação ácidos graxos saturados/insaturados e ácidos graxos de cadeira curta (<16C). Essa alteração é explicada pelo perfil dos ácidos graxos das fontes de lipídeo utilizadas, sendo o grão de soja rico em ácidos graxos insaturados, sendo eles, C18:2 (50,8 %) e C18:1 (22,8 %) (Palmquist, 1980) e o Ca-AGCL de óleo de palma, que apesar de ser fonte de C16:0 possui altas concentrações de C16:1. Esses resultados indicam também, que o processo de biohidrogenação foi, de certa forma, evitado ou reduzido, permitindo a chegada de ácidos graxos insaturados no duodeno e posterior absorção.

Quando comparadas as duas fontes de lipídeo, a suplementação com grão de soja em relação ao Ca-AGCL de óleo de palma, aumentou a concentração de ácidos graxos poli-insaturados. Novamente, essas alterações são perfeitamente justificadas pelas composições das respectivas fontes de lipídeo utilizadas, sendo o grão de soja rico em ácidos graxos poli-insaturados com 18 carbonos (C18:2), e o óleo de palma rico em ácidos graxos saturados de 16 carbonos (C16:0) e ácidos graxos monoinsaturados de 16 carbonos (C16:1). Diversos estudos em que estudada a suplementação de lipídeo para vacas de leite apresentaram o mesmo padrão de resposta obtida no presente experimento onde a o perfil de ácidos graxos do leite acompanhou o perfil de ácidos graxos da fonte de gordura protegida utilizada (referência duplicadas?PETIT, 2002; PETIT, et al, 2002, 2004; PETIT et al., 2007; ZACHUT et al., 2010a,b; BENCHAAR et al., 2012; GANDRA, 2012).

Sabe-se que vários ácidos graxos insaturados possuem propriedades benéficas à saúde, como os ácidos oleico, eicosapentaenoico (EPA), docosaexaenoico (DHA) e os ácidos linoleicos conjugados (CLAs) (Leite e Lanna, 2009). Como resultado, há um aumento do interesse em manipular as dietas de vacas leiteiras para aumentar as concentrações dos ácidos graxos poli-insaturados na gordura do leite (CORTES et al., 2010). No presente experimento, a suplementação com grão de soja aumentou a concentração de ácidos graxos poli-insaturados e dos ácidos graxos C18:2 n6,c, C18:3 n3, C20:3 n6 e C20:4 n6, comprovando que a suplementação de grão de soja é capaz de melhorar o perfil de ácidos graxos do leite, podendo causar benefícios à saúde humana.

A menor produção de gordura no leite dos animais suplementados com grão de soja cru e integral (Tabela 5) sugere uma influência negativa dessa suplementação sobre o metabolismo da glândula mamária. Quando se avalia o processo de inclusão e digestão de lipídeo 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, quando ocorre biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poli-insaturados, aumenta o fluxo duodenal de ácidos graxos C18:1 trans e ácido linoleico conjugado CLA cis-9, trans-11 e CLA trans-10, cis-12, apresentando comprovado efeito inibidor sobre a síntese de gordura do leite (BAUMAN; GRIINARI, 2003; PETERSON et al., 2003), principalmente sobre os ácidos graxos menores que 16C (cadeia curta e média). No entanto, quando avaliada a suplementação de grão de soja com a suplementação de Ca-AGCL de óleo de palma, não houve diferença nas concentrações desses CLAs e de AG menores de 16C entre os tratamentos, o que demonstra a ausência de influência dessa suplementação na síntese de-novo da glândula mamária. Com essa possibilidade descartada, a redução da gordura do leite apresentada pelo grupo tratado com grão de soja é ocasionada pela menor absorção de gordura em nível intestinal, fato esse comprovado pelo perfil metabólico dos animais, descritos na tabela 4, onde os animais alimentados com grão de soja, apresentaram menor quantidade de proteínas totais, e em algumas semanas, menor quantidade de colesterol total, elementos esses cruciais para o transporte plasmático de ácidos graxos. A menor quantidade de AG transportados resulta em um menor aporte de AG na glândula mamária ocasionando redução na produção de gordura do leite, explicando o resultado obtido pelo grupo suplementado com grão de soja.

6.4 DINÂMICA FOLICULAR

Os dados sobre a população folicular ovariana estão demonstrados na tabela 8. Foi observado efeito de tempo para as variáveis número de folículos classe 1 (NC1), número de folículos classe 3 (NC3), número de folículos classe 4 (NC4) e consequentemente, número total de folículos (NT Fol). Quando analisado os tratamentos, houve redução na NC1, NC2 e NTFol com suplementação de gordura, independente da fonte. Quando comparada as duas fontes de lipídeos, a suplementação de gordura saturada aumentou o número de folículos classe 5 (NC5) quando comparado à fonte de gordura insaturada.

Tabela 8 - População folicular de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas[1]			Média	EPM[2]	P-valor				
	CO	INS	SAT			Dieta	Tempo	D*T[3]	C1[4]	C2[5]
NC1[6]	2.12	1.94	1.30	1.76	0.069	0.012	0.007	0.368	0.016	0.101
NC2[7]	3.39	2.59	2.75	2.93	0.058	0.008	0.269	0.159	0.004	0.124
NC3[8]	2.67	2.61	2.62	2.63	0.050	0.867	0.020	0.366	0.931	0.598
NC4[9]	1.11	1.06	1.03	1.06	0.023	0.486	0.018	0.815	0.406	0.435
NC5[10]	0.28	0.21	0.43	0.32	0.014	0.030	0.549	0.901	0.538	0.012
NTFol[11]	9.57	8.41	8.13	8.70	0.081	0.001	0.019	0.426	0.002	0.750

[1]Dietas: CT controle; INS: insaturada; SAT: saturada; [2]EPM: erro padrão da média; [3]D*T: Interação dieta*tempo; [4]C1: CT *vs* (INS + SAT); [5]C2: INS *vs* SAT; [6]NC1: número de folículos classe 1, [7]NC2: número de folículos classe 2, [8]NC3: número de folículos classe 3, [9]NC4: número de folículos classe 4, [10]NC5: número de folículos classe 5, [11]NTFOL: número total de folículos.

Esses resultados diferiram da hipótese do presente estudo, que consistia na obtenção de aumento na eficiência reprodutiva (nesse caso, aumento do número de folículos) com a suplementação de lipídeos devido ao aumento da densidade energética da dieta, com uma vantagem ainda maior para a dieta com grão de soja, devido aos possíveis efeitos nutracêuticos ocasionados pelos ácidos graxos poli-insaturados. No entanto, a suplementação de lipídeo reduziu o número de NC1, NC2, e NTFol. Diversos autores têm demonstrado estreita relação entre nutrição e reprodução (GARNSWORTHY et al., 2008; SALES et al., 2011.; THATCHER et al., 2011), porém esta relação é extremamente complexa (SALES et al., 2015). Diversos fatores nutricionais podem interferir no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, o que resulta em diversas respostas reprodutivas (LEROY et al., 2008). Alterações no plano nutricional podem alterar a síntese e liberação de hormônios reprodutivos e proteínas que possuem efeitos diretos sobre o desenvolvimento folicular (ARMSTRONG et al., 2003). O IGF-1 é uma dessas proteínas, este é um polipeptídio de 70 aminoácidos que, entre outros efeitos, exerce influência no desenvolvimento periférico de diferenciação celular e na sobrevivência de diversas células e tecidos do organismo, apresenta ações como regulação da liberação de GnRH, liberação de gonadotrofinas pela hipófise e aumenta a sensibilidade das células da granulosa para as gonadotrofinas (LUCY, 1993). Gong et al., (1997) demonstraram que o aumento de IGF-1 ocasiona um aumento da população folicular, principalmente de pequenos folículos, devido à ação desse fator na camada de células da granulosa dos folículos, tornando-os mais sensíveis

às gonadotrofinas e estimulando a proliferação e a produção de esteroides (GONG et al., 1997). Dessa forma, o nível sérico de insulina e como consequência os níveis de IGF-1 podem ser as possíveis explicações para o aumento na população de folículos pequenos (NC1 e NC2) e consequentemente no número total de folículos (NTFol).

Apesar da maior densidade energética das dietas com inclusão de lipídeo (1.58; 1.66; e 1.66 Mcal/kg MS; respectivamente para as dietas controle, saturada e insaturada), a dieta controle possui maior quantidade de CNF (41.00; 39.80; e 38.4 %; respectivamente para as dietas controle, saturada e insaturada) em sua composição que as dietas com inclusão de lipídeo (Tabela 3). CNF é o principal substrato para a produção do ácido propiônico, que por sua vez, é o precursor para a gliconeogênese resultando em maiores concentrações de glicose, insulina e consequentemente de IGF-1. No entanto, não houve diferença estatística para as concentrações de glicose plasmática nos animais do presente experimento (tabela 4), descartando essa hipótese. A explicação para esse fato, é a maior concentração plasmática de AGNE apresentada pelos animais suplementados com lipídeo quando comparados ao tratamento controle.

O BEN, provavelmente através da sinalização metabólica com nível elevado de ácidos graxos não esterificados, pode influenciar negativamente nos pulsos de LH no início da lactação, necessários para estimular o desenvolvimento dos folículos ovarianos (BUTLER, 2004), o que justifica as menores quantidades de NC1, NC2 e NTFol apresentados pelos animais suplementados com lipídeo quando comparados ao tratamento controle. Esses resultados diferem nos estudos de Gandra (2012) que relatou aumento de folículos NC1 dos animais tratados com lipídeo, quando comparados ao tratamento controle, Lucy et al. (1991 e 1993) que substituíram milho por ácidos graxos trans-octadecenoicos em dietas em início de lactação, obtendo aumento no número de folículos médios (6 – 9 mm), e de folículos acima de 15 mm. Staples e Thatcher (2005), resumiram os efeitos da suplementação lipídica sobre o diâmetro do folículo dominante. Na média, o folículo dominante foi 3,2 mm maior, o que representa 23% de aumento para os animais suplementados com lipídeo.

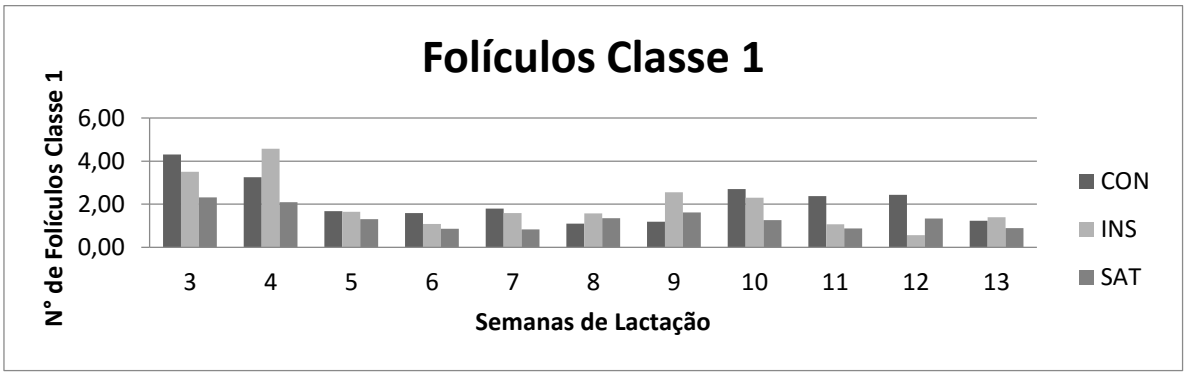
A suplementação com gordura saturada aumentou o número de folículos classe 5 (NC5) quando comparada à suplementação com gordura insaturada, o que, mais uma vez, discorda da nossa hipótese que acredita que a suplementação com AGPI possua efeitos melhoradores no desempenho reprodutivo. No entanto, o perfil metabólico dos animais sugere uma redução de consumo e, consequentemente, de performance dos animais tratados com grão de soja, o que

justificaria essa redução no número de folículos classe 5 (NC5) apresentado pelos animais presentes nesse tratamento. Esses resultados diferem de Staples e Thatcher (2005) que resumiram os efeitos da suplementação lipídica sobre o diâmetro do folículo dominante. Na média, o folículo dominante foi 3,2 mm maior, o que representa 23% de aumento para os animais suplementados com lipídeo, e Bilby et al. (2006), que lista diversos trabalhos em que a suplementação de AGPI aumentou o tamanho do folículo dominante quando comparado à suplementação de ácidos graxos monoinsaturados.

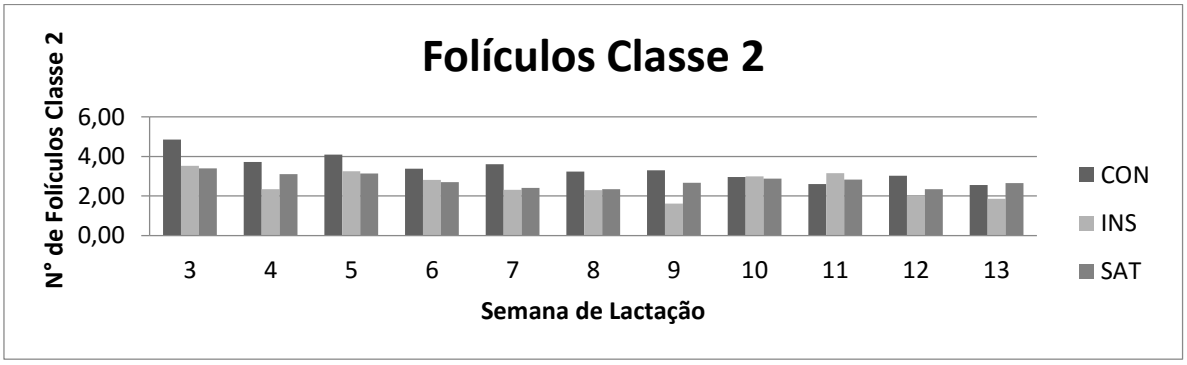
Os números de folículos por semana analisados de acordo com suas respectivas classes estão demonstrados no gráficos 10 e 11.

Gráfico 10 - Número de folículos classe 1 (A), Número de folículos classe 2 (B), Número de folículos classe 3 (C) de acordo com as dietas experimentais

A



B



C

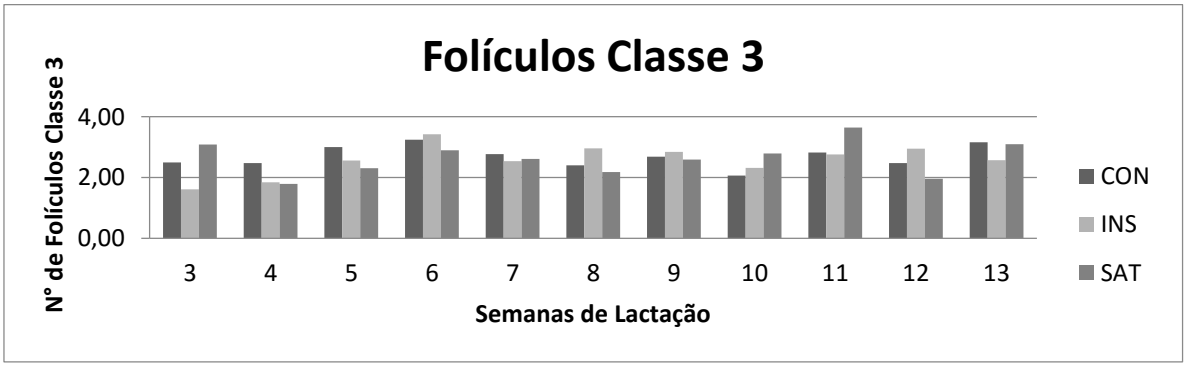
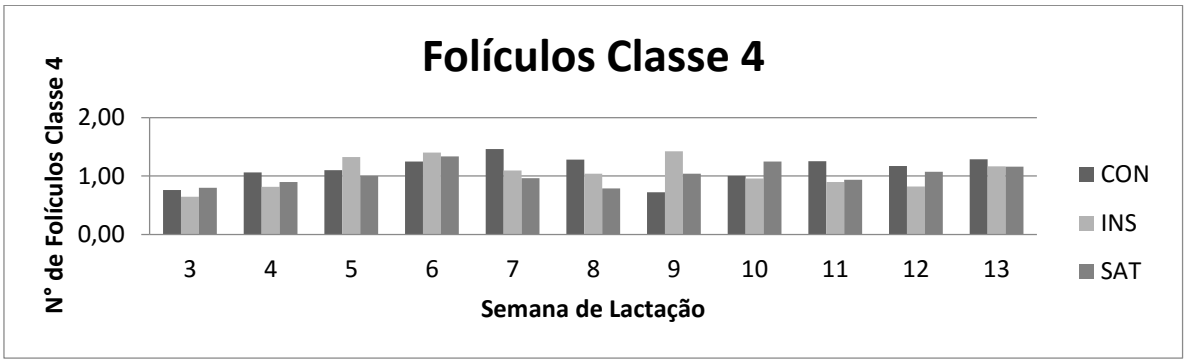
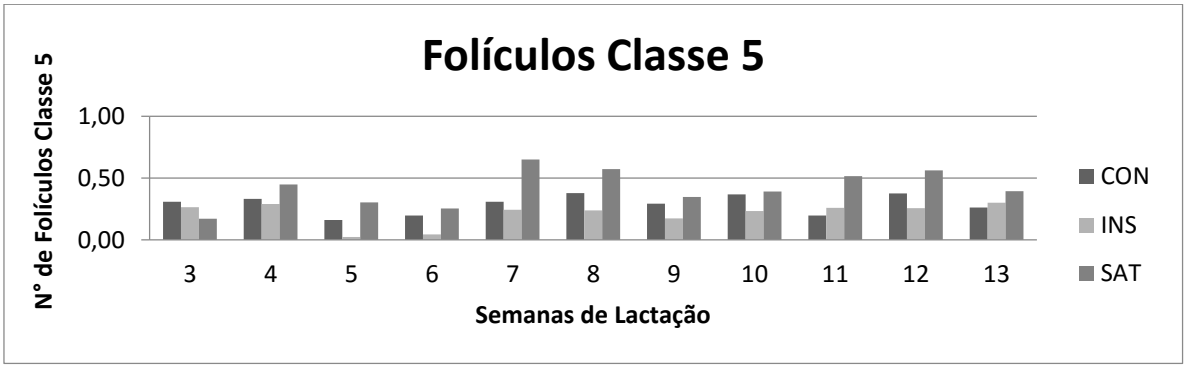


Gráfico 11 - Número de folículos classe 4 (A), Número de folículos classe 5 (B), Número total de folículos (C), de acordo com as dietas experimentais

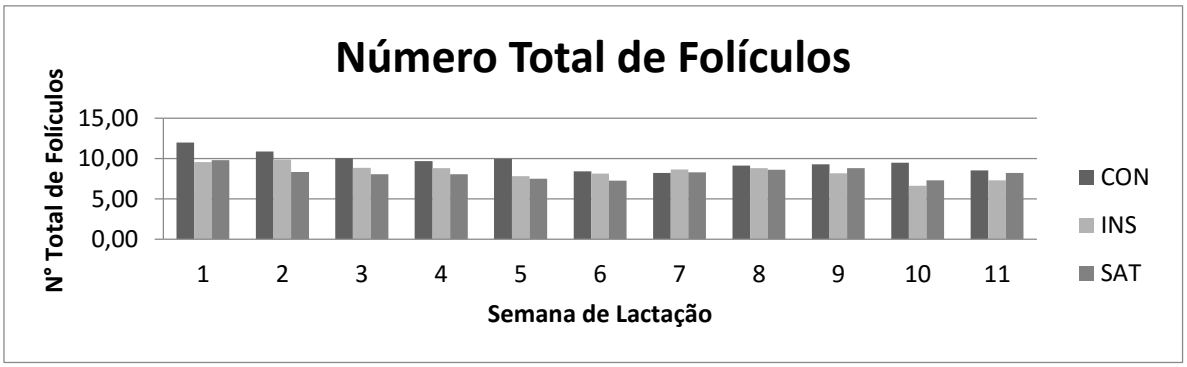
A



B



C



Os resultados das variáveis, intervalo parto-1° ovulação, área de corpo lúteo, e número de ondas foliculares estão apresentados na tabela 9. Não foi encontrado diferenças estatística para essas variáveis.

Tabela 9 - Intervalo parto-1°ovulação, área do corpo lúteo, e número de ondas foliculares de acordo com as dietas experimentais

Item	Dietas[1]			Média	EPM[2]	P-valor	
	CO	INS	SAT			C1[3]	C2[4]
Parto-1 ovu[5]	32,88	30,40	34,75	33,00	3,3806	0,5185	0,7717
Área CL[6]	4,66	4,39	3,72	4,24	0,2601	0,2745	0,3252
N° Onda fol.[7]	2,00	1,25	2,00	1,81	0,1875	0,1791	0,3169

[1]Dietas: CT controle; INS: insaturada; SAT: saturada; [2]EPM: erro padrão da média; [3]C1: CT *vs* (INS + SAT); [4]C2: INS *vs* SAT; [5]Intervalo parto 1° ovulação, [6]Área do corpo lúteo, C2: número de folículos classe 2, [7]Número de Ondas Foliculares.

O intervalo para a primeira ovulação no período pós-parto depende da recuperação da função normal do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (BUTLER; SMITH, 1989). O aumento da concentração energética das rações pós-parto teoricamente aumentaria a ingestão voluntária de energia melhorando a condição corporal das vacas, contribuindo com a redução da mobilização de gordura do tecido adiposo e consequentemente reduzindo o intervalo entre partos. No entanto, no presente experimento, a suplementação de lipídeo não atenuou o BEN não causando a antecipação da 1° ovulação. Esses resultados estão de acordo com Juchem (2007) alimentou 699 vacas multíparas com 400g de sebo ou 400g de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa (Ca-AGCL) contendo óleo de palma e óleo de peixe, e não observou diferença na proporção de vacas ciclando após 65 dias de paridas (83,2% 82,2%, respectivamente). Subsequentemente, vacas leiteiras suplementadas com Ca-AGCL contendo óleo de palma ou Ca-AGCL conteúdo mistura de C18:2 n-6 e ácidos graxos trans-octadenóico, de 25 dias pré-parto até 80 dias pós-parto obtiveram intervalo similares para primeira ovulação (30.5 e 32.2 dias respectivamente) (JUCHEM, 2007).

Em sua revisão Santos relata que alguns estudos relacionam tamanho folicular com área de corpo lúteo, mostrando uma relação positiva, onde folículos maiores pré-ovulatórios originam corpos lúteos com áreas maiores. No entanto, no presente estudo, apesar da gordura saturada ter produzido um maior número de NC5 (tabela 7) não alterou a área do corpo lúteo. Esse resultado confirma os resultados de Gandra (2012) que não encontrou diferença na área do corpo lúteo com a suplementação de lipídeo, porém difere de Maturana (2009) que relatou redução da área de corpo lúteo com a suplementação de lipídeo. Essa relação suplementação de lipídeo, folículos e corpo lúteo é complexa e necessita de maiores estudos.

Poucos estudos avaliaram a influência da suplementação de lipídeo no número de ondas foliculares. Não houve alteração dessa variável. No entanto, os valores obtidos estão abaixo da média encontrada, que seria entre 2 e 3 ondas (HAFEZ, 2004). Esse fato é explicado pelas aspirações foliculares realizadas em média de 30, 60 e 90 dias pós parto, o que alterou o perfil das ondas foliculares, dificultando a análise final.

6.5 QUALIDADE OOCITÁRIA E EMBRIONÁRIA

Os resultados de qualidade oocitária e embrionária estão listados na tabela 10. Não foi encontrada diferença estatística, efeito de dieta, efeito de tempo (ordem de aspiração) e efeito de interação (dieta e ordem da aspiração) para nenhuma das variáveis avaliadas.

Tabela 10 - Qualidade oocitária e embrionária de acordo com as dietas experimentais

Item	Dieta[1]			Média	EPM[2]	Probabilidades (*P*)				
	CON	INS	SAT			Dieta	Tempo	D*T[3]	C1[4]	C2[5]
		Oócitos								
Total	8,69	6,21	7,78	7,77	0,651	0,525	0,735	0,402	0,303	0,542
Grau 1	0,97	0,53	1,09	0,92	0,14	0,237	0,913	0,495	0,764	0,092
Grau 2	1,19	0,79	1,13	1,07	0,131	0,618	0,915	0,728	0,628	0,362
Grau 3	2,84	1,89	2,06	2,33	0,287	0,478	0,480	0,164	0,245	0,619
Viáveis	5,00	3,21	4,28	4,31	0,409	0,466	0,865	0,093	0,307	0,403
Degenerados	2,28	2,31	2,30	2,30	0,361	0,865	0,456	0,343	0,567	0,645
Atrésicos	3,23	3,45	3,51	3,42	0,321	0,454	0,845	0,512	0,713	0,342
		Embriões								
Clivados (n)	3,53	1,95	2,78	2,88	0,38	0,588	0,122	0,602	0,335	0,630
Clivados (%)	39,54	36,77	36,88	38,20	3,182	0,935	0,059	0,403	0,720	0,991
Viáveis (n)	1,00	0,63	1,00	0,92	0,194	0,798	0,330	0,162	0,645	0,586
Viáveis (%)	9,06	11,47	10,03	9,99	1,94	0,925	0,150	0,104	0,769	0,764

[1]Dietas: CT controle; INS: insaturada; SAT: saturada; [2]EPM: erro padrão da média; [3]D*T: Interação dieta*tempo; [4]C1: CT *vs* (INS + SAT); [5]C2: INS *vs* SAT; [6]Taxas obtidas pela relação entre cada um dos itens com a quantidade de oócitos cultivados.

A qualidade oocitária e embrionária está diretamente ligada à composição de ácidos graxos. Os fosfolipídeos que compõem a membrana celular possuem papel importante no

desempenho durante e depois da fertilização, e sua alteração pode gerar ganhos ou prejuízos na eficiência reprodutiva (BILBY et al., 2006). No presente estudo, não foi observado diferenças na qualidade oocitária e embrionária dos animais tratados. Foi demonstrado, in vitro, que o AGNE possui efeito prejudicial sobre o desenvolvimento de oócitos (LEROY et al., 2005), e a suplementação lipídica, devido à sua maior densidade energética poderia, portanto, melhorar a qualidade oocitária. No entanto no presente estudo, a suplementação de lipídeo não apresentou esse efeito positivo esperado sobre a concentração plasmática de AGNE (Tabela 4).

Era esperado no presente experimento efeito direto dos ácidos graxos poli-insaturados sobre a qualidade oocitária e embrionária. Diversos autores tem citado influência positiva desses ácidos graxos sobre essas variáveis (ZERON et al., 2002; CERRI et al., 2004; FOULADI-NATASHTA et al., 2007; SANTOS et al., 2008; CERRI et al., 2009). No entanto, isso não aconteceu. O perfil plasmático dos animais (tabela 4) indica uma menor concentração de AG circulantes nos animais suplementados com grão de soja integral, o que pode ter gerado uma insuficiente concentração de ácidos graxos poli-insaturados na corrente sanguínea, o que foi incapaz de alterar o perfil de ácidos graxos do líquido folicular e dos fosfolipídeos de parede dos oócitos. Segundo Santos et al. (2008), a absorção ácidos graxos poli-insaturados pelo oócito ou é seletiva ou altamente regulada, o que pode limitar os potenciais impactos da nutrição de ácidos graxos na composição dos oócitos.

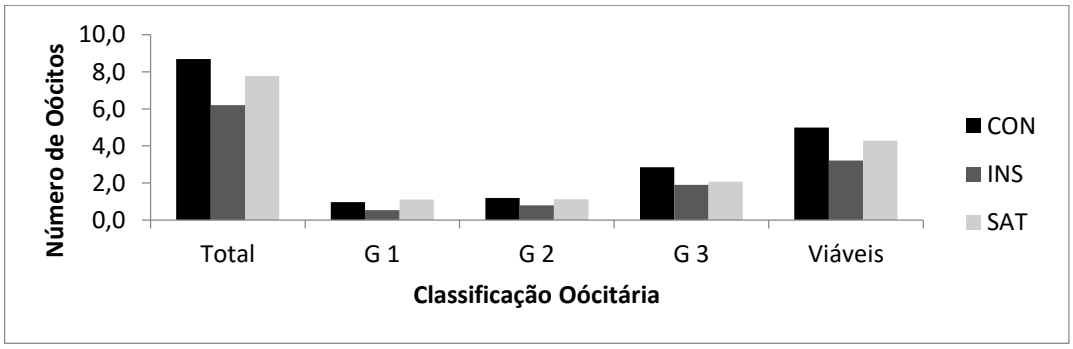
Resultados semelhantes a esse estudo foram encontrados por Gandra (2012) que avaliou a suplementação de fontes de n-6 e n-3 durante o período de transição e início de lactação de vacas leiteiras. As dietas experimentais não influenciaram o número total de oócitos aspirados e também qualidade oocitária. Fouladi-Nashta et al. (2007), avaliaram a qualidade oocitária e embrionária com rações alto e baixo teor de lipídios em vacas leiteiras de alta produção no início de lactação e não observaram diferenças para o número de oócitos de grau I, II, III e na taxa de clivagem dos embriões, resultados semelhantes ao deste estudo. Em outro estudo Fouladi-Nashta et al. (2009), utilizaram 3 fontes de ácidos graxos, sendo: sais de cálcio de óleo de palma, grão de soja, semente de linhaça para 12 vacas leiteiras com média de 45 dias pós parto, sendo suplementadas 25 dias com cada fonte de lipídeo. Os autores não observaram efeitos satisfatórios das diversas fontes de ácidos graxos sobre o número e qualidade de oócitos aspirados, bem como nos embriões.

Contrariando esses resultados, Cerri et al. (2009), compararam a suplementação de sais de cálcio de óleo de palma com sais de cálcio com ácido linoleico e ácido trans-octadenóico e relataram aumento no número de oócitos e embriões graus 1 e 2, e nos números de blastômeros e de espermatozoides acessórios. No entanto, diferindo do presente estudo, os autores utilizaram

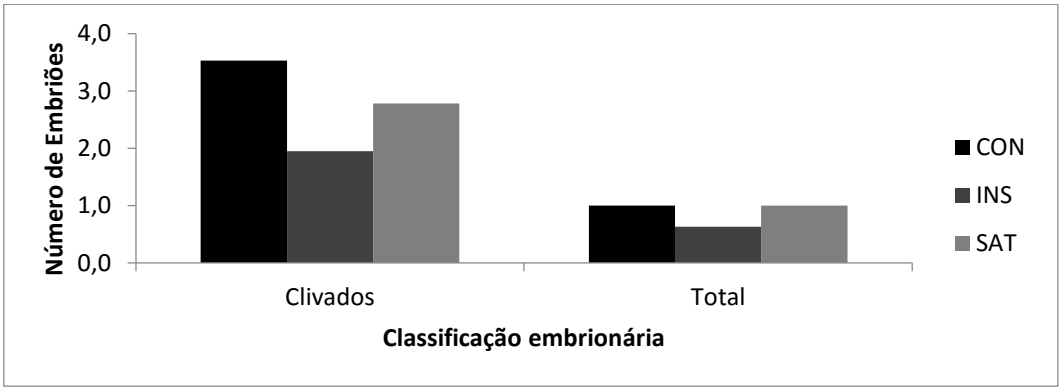
o ácido linoleico associado ao ácido trans-octadenóico, o que pode explicar essa disparidade nos resultados.

Gráfico 12 - Qualidade oocitária (A) e qualidade embrionária (B) de acordo com as dietas experimentais

A



B



7 CONCLUSÃO

A suplementação de lipídeos insaturados através da suplementação via grão de soja cru e integral, quando comparada à suplementação de lipídeos saturados, para vacas no período de transição e início de lactação, não interferiu na dinâmica folicular e qualidade oocitária e embrionária; e reduziu o desempenho produtivo, devido às reduções na produção de gordura do leite a na produção de leite corrigida para 3,5% dos animais suplementados.

REFERÊNCIAS

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.

AMARAL, B. C. D. Effect of supplemental fat source on production, immunity, hepatic gene expression, and metabolism of periparturient dairy cows. – Phd - University of Florida, Gainesville, 2008.

AMBROSE, D. J.; KASTELIC, J.P. Dietary fatty acids and dairy cow fertility. **Advanced Dairy Science and Technology**, v.15, p. 35-47, 2003.

ANDERSEN, J. B.;RIDDER, C.; LARSEN, T. Priming the cow for mobilization in the periparturient period: effects of supplementing the dry cow with saturated fat or linseed. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1029–1043, 2008.

ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; WEBB, R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. **Reprod. Suppl**., v. 61, p. 403-414, 2003.

ARMSTRONG, D. G.; McEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGGS, C. O; WOAD, K. J; Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1624–32, 2001.

BALLOU, M. A.; GOMES, R. A.; JUCHEM, S. O.; DePETERS, E. J.
Effects of dietary supplemental fish oil during
the peripartumperiod on blood metabolites and hepatic fatty acid compositionsand total triacylglycerol concentrations of multiparous Holsteincows. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 2, p. 657-669, 2009.

BARLETTA, R. V.; GANDRA, J. R. ; FREITAS JUNIOR, J. E. ; VERDURICO, L. C. ; MINGOTI, R. D. ; BETTERO, V. P. ; BENEVENTO, B. C. ; VILELA, F. G. ; RENNÓ, F. P. . High levels of whole raw soya beans in dairy cow diets: digestibility and animal performance. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** v. 1, p. n/a-n/a, 2015.

BARLETTA, R. V.; RENNÓ, F. P.; GANDRA, J. R.; FREITAS Jr, J. E.;VERDURICO, L. C.; MINGOTI, R. D.; VILLELA, F.G. Desempenho e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com grão de soja, **Archivos de Zootecnia**, v. 61, p. 1-10, 2012.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v.23, p.203-227, 2003.

BAUMAN, D. E., A. L. LOCK. Concepts in lipid digestion and metabolism in dairy cows. **Proc.Tri-State Dairy Nutr. Conf**. pp. 1-14, 2006.

BAUMGARD, L. H., MATITASHVILI, E., CORL, B.A., DWYER, D.A., BAUMAN, D.E. trans-10, cis-12 Conjugated Linoleic Acid Decreases Lipogenic Rates and Expression of Genes Involved in Milk Lipid Synthesis in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science** , vol. 85, No. 9, 2002.

BAUMGARD, L. H., B. A. CORL, D. A. DWYER, A. SAEBO, AND D. E. BAUMAN. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **Am. J. Physiol.**, v.278, p. 179-184, 2000.

BEAM, S. M.; BUTLER, W. R. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. **Biology of Reproduction,** v. 56, p.133-142, 1997.

BELL, A. W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science,** vol.73, p.2804-2819, 1995.

BENCHAAR, C.; ROMERO-PÉREZ , G.A.; CHOUINARD , P.Y.; HASSANAT, F.; EUGENE , M.; PETIT, H.V.; CÔRTES, C. Supplementation of increasing amounts of linseed oil to dairy cows fed total mixed rations: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, protozoal populations, and milk fatty acid composition. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 4578–4590, 2012.

BENNINK, M. R., R. W.MELLENBERGER, R. A. FROBISH, AND D. E. BAUMAN. Glucose oxidation and entry rate as affected by the initiation of lactation. **J. Dairy Sci**. 55:712, 1972

BILBY, T. R.; JENKINS, T.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Pregnancy, bovine somatotropin, and dietary n-3 fatty acids in lactating dairy cows: III. Fatty acid distribution. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3386–3399, 2006.

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

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

BU, D. P.; WANQ, J. Q.; DHIMAN, T. R.; LIU, S. J.
Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance
conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 998-1007, 2007.

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.

BUTLER, W. R. Efeito do balanço energético negativo na fertilidade de vacas leiteiras. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS., 7., 2004, Uberlândia. Anais do VII Curso de Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos.

BUTLER, W. R., SMITH R. D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. **Journal of Dairy Science,** v. 72, p. 767–783, 1989.

BYERS, F. M.; SCHELLING, G. T. Los lipidos en la nutricion de los ruminantes. In: CHURCH, D. C. El ruminante: Fisiología digestive y nutricion. Zaragoza: Acribia, 1993. cap.15.

CADORNIGA-VALINO, C.; GRUMMER, R. R.; ARMENTANO, L. E. Effects of fatty acids and hormones on fatty acid metabolism and gluconeogenesis in bovine hepatocytes. **Journal of Dairy Science,** v.80, p. 646-656, 1997.

CALDARI-TORRES, C.; LOCK, A.L.; STAPLES, C.R.; BADINGA, L. Performance, metabolic, and endocrine responses of periparturient Holstein cows fed 3 sources of fat. **Journal of Dairy Science**. v. 94, p. 1500–1510, 2011.

CALDER, P. C.;BOND, J. A.,; HARVEY, D. J.; GORDON, S.; NEWSHOLME. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. **Biochemistry Journal,** v. 269, p. 807–814, 1990.

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

CALDER, P.C. Dietary fatty acids and lymphocyte functions. **Proceedings Nutrition Society**. v. 57, p. 487–502, 1998.

CALDER, P.C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids,** v. 77, p. 327-335, 2007.

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.

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

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, 2009.

CERRI R.L.A.; CHEBEL, R. C.; GALVÕ, K. N.; RUTGLIANO, H.; JUCHEM, S. O.; THATCHER, W. W.; JUCHINI, D.; SANTOS, J. E. P. Effect of fat sources differing in fatty acid profile on fertilization rate and embryo quality in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 87, p. 297, 2004.

CHILDS, S.; HENNESSY, A. A.; SREENAN, J. M.; WATHES, D. C.; CHENG, Z.; STANTON, C.; DISKIN, M. G.; KENNY, D. A. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. **Theriogenology**, v. 70, p. 595– 611, 2008.

CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A.; BERNARD, L.; ROUEL, J.; DOREAU, M. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 828-855, 2007.

CHILLIARD, Y. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: a review. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.12, p.3897-3931, 1993.

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

CORRÊA, A. M. V. Utilização de grão de soja em diferentes formas na alimentação de vacas leiteiras. 2007. 128 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal Viçosa, Minas Gerais, Viçosa, 2007.

CULLENS, F,M.; STAPLES, C.R.; BILBY, T.;R.; SILVESTRE, F.T.; BARTOLOME, J.; SOZZI, A.; BADINGA L, THATCHER, W.W.; ARTHINGTON, J.D.Effect of timing of initiation of fat supplementation on milk production, plasma hormones and metabolites, and conception rates of Holstein cows in summer. **Journal of Dairy Science** , v.86, p-308-312, 2004.

DAVIS, C. L.; BROWN, R. E. Low-fat milk syndrome. Physiology of digestion and metabolism in the ruminant. Newcastle upon Tyne, UK: Oriel Press Limited, 1970. p.545- 565

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

DHIMAN, T. R.; NAM, S. H.; URE, A. L. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 6, p. 463-82, 2005.

DHIMAN, T. R.; SATTER, L. D.; PARIZA, M. W. 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.

DISKIN, M. G.; MACKEY, D. R.; ROCHE, J. F.; SREENAN, J. M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 345–70, 2003.

DIRANDEH E., A. TOWHIDI, Z. ANSARI PIRSARAEI, F. ADIB HASHEMI , M. GANJKHANLOU, S. ZEINOALDINI, A. REZAEI ROODBARI, T. SABERIFARA, H.V. PETIT. Plasma concentrations of PGFM and uterine and ovarian responses in early lactation dairy cows fed omega-3 and omega-6 fatty acids. **Theriogenology** , v.80, p- 131–137. 2013

DIRKSEN, G., H. LIEBICH, AND K. MAYER. 1985. Adaptive changes of the ruminal mucosa and functional and clinical significance. **Bov. Pract**. 20:116–120.

DONOVAN, D.C.; SCHINGOETHE, D.J.; BAER, R.J. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.11, p.2620-2628, 2000.

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

DRACKLEY, J. K. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? **Journal of Dairy Science,** v. 82, p. 2259–2273, 1999.

DRACKLEY, J. K.; LACOUNT, D. W.; ELLIOT, J. P; KLUSMEYER, T. H.; OVERTON, T. R.; CLARK, J. H.; BLUM, S. A. Supplemental fat and nicotinic acid for Holstein cows during an entire lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 201–214, 1998.

DUARTE, L. M. A.; STUMPF JÚNIOR, W.; FISCHER, V. 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.

DUSKE, K.; HAMMON, H. M.; LANGHOF, A.-K.; BELLMANN, O.; LOSAND, B.; NÜRNBERG, K. NÜRNBERG, G.; SAUERWEIN, H.; SEYFERT, H. M.; METGES, C. C. Metabolism and lactation performance in dairy cows fed a diet containing rumen-protected fat during the last twelve weeks of gestation. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p.1670-1684, 2009.

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

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.

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

FOULADI-NASHTA, A.A.;WONNACOT.,K.E.,GUTIERREZ,C.G.,GONG,J.G., SINCLAIR, K.D., GARNSWORTHY,P.C., WEBB,R. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. **Reproduction** . v.138, p. 771–781. 2009.

FREITAS JÚNIOR, J. E.; RENNÓ, F. P.; SILVA, L. F. P.; GANDRA, J. R.; MATURANA FILHO, M.; FODITSCH, C.; VENTURLLI, B. C. Parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras suplementadas com diferentes fontes de gordura. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 4, p. 1376-1380, 2010.

FUENTES, M. C.; CALSAMIGLIA, S.; SÁNCHEZ, B.; GONZÁLEZ, A.; NEWBOLD, J. R.; SANTOS, J. E. P.; RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L. M.; FONTECHA, J. Effect of estrused linseed on productive and reproductive performance of lactating dairy cows. **Livestock Science,** v.113, p. 144-154, 2007.

GANDRA, J.R.; Fontes de ácidos graxos ω 3 e ω 6 em dietas de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação. 2012. 187 f. Tese. Universidade de São Paulo, Pirassununga–SP.

GARNSWORTHY, P.C.; LOCK, A.; MANN, G.E.; SINCLAIR, K.D.; WEBB, R. Nutrition, metabolism, and fertility in dairy cows: 2. dietary fatty acids and ovarian function. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 3824–3833, 2008.

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, F. A.; QUELLET, D. R.; CHOULNARD, P. Y; BERTHLAUME, PETIT, H. V. Feeding micronized and extrused flaxseed to dairy cow on blood parameters and milk fatty adic compostition. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 748-756, 2005.

GRECO, L.F. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on lactation performance, tissue gene expression, and reproduction in dairy cows. 2014. 270f. Tese. University of Florida, Florida.

GRUM, D. E.; DRACKLEY, J. K.; CLARK, J. H. Fatty acid metabolism in liver of dairy cows fed supplemental fat and nicotinic acid during an entire lactation. **Journal of Dairy Science,** v. 85, n. 11, p. 3026-34.

GRUMMER, R. R. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, p. 3882-3896, 1993.

GRUMMER, R. R. Impact of changes in organic nutrients metabolism on feeding the transition cow. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2820-2833, 1995.

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

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

HARFOOT, C. G. Lipid metabolism in the rumen. In: CHRISTIE, W.W. (Ed). **Lipid metabolism in ruminant animals**. 1 st ed. Oxford: Pergamon Press, 1981. 452 p.

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.

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

HAWKINS, D.E.; NISWENDER, K.D.; OSS, G.M. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. **Journal of Animal Science,** v.73, p. 541-545, 1995.

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.

HERDT, T. H. Ruminant adaptation to negative energy balance. In: metabolic disorders of ruminants, (ed.) Herdt, t. H. Veterinary Clinical Of North American, v.16, n.2, p.215-230, 2000.

HIGHTSHOE, R.B.; COCHRAN, R.C.; CORAH, L.R; Effects of calcium soaps of fatty acids on postpartum reproductive function in beef cows. **Journal of Animal Science**, v.69, p.4097-4103, 1991.

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

JENKINS, T.C.; WALLACE, R.J.; MOATE, P.J.;MOSLEY, E.E.Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v.86, p. 397-412, 2008

JUCHEM SO, 2007: Lipid Digestion and Metabolism in Dairy Cows: Effects on Production, Reproduction and Health. PhD thesis, University of California Davis.

KAZAMA , R.,; CÔRTES, C.; DA SILVA-KAZAMA, D.; GAGNON, N.,;BENCHAAR , C. L. M.; SANTOS , G. T. D.; ZEOULA , L. M.; PETIT, H. V. Abomasal or ruminal administration of flax oil and hulls on milk production, digestibility, and milk fatty acid profile of dairy cows**. Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4781–4790, 2010.

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

KOJIMA, T.; ZENIYA, Y.; AOYAMA, T. et al. Dietary administration of fatty acids-enriched mold dried cell containing ã-linolenic acid to female pigs improves ovulation rate and embryo quality in summer. **Journal of Reproduction and Development**, v.43, n.2, p.121-127, 1997

LACETERA, N.; SCALIA, D.; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; PIRAZZI, D.; NARDONE, A. Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2010–2016, 2005.

LACETERA, N.; SCALIA, D.; FRANCI, O.; BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; NARDONE, A. Short communication: effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v.87, p. 1012–1014, 2004.

LAMMOGLIA, M.A.; WILLARD, S.T.; HALLFORD, D.M.; RANDEL, R.D. Effects of dietary fat on follicular development and circulating of lipids, insulin, progesterone, estradiol-17beta, 13,14-dihydro-15-keto-prostaglandin F2alfa and growth hormone in estrous cyclic Brahman cows. **Journal of Animal Science**. v. 75, p. 1591-1600, 1997.

LANDAU, S.; BRAW-TAL, R.; BOR, A.; BRUCKENTAL, I. Preovulatory follicular status and diet affect the insulin and glucose content of follicles in high-yielding dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v.64, p. 181–97, 2000.

LEROY, J. L.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I.The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, p.612-622, 2008.

LOURENCO, M., E. RAMOS-MORALES, R.J. WALLACE. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. **Animal 4**: 1008-1023, 2010.

LUCY, M. C.; COLLIER, R. J.; KITCHELL, M. L.; DIBNER, J. J.; HAUSER, S. D.; KRIVI, G. G. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 6, p. 1219-27, 1993.

LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; MICHEL, F. M.; THATCHER, W. W. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 2, p. 472-82, 1991.

MANN, G. E.; ROBINSON, R. S.; WATHES, D. C.; LAMMING, G. E. The regulation of interferon-τ production and uterine hormone receptors during early pregnancy. **Journal of reproduction and fertility**, n.54, p. 317-328, 1999.

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

MARTIN, C.; ROUEL, J.; JOUANY, J. P.; DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Methane output and diet digestibility in response to feeding dairy cows crude linseed, extruded linseed, or linseed oil. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 2642-2650, 2008.

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

MATURANA FILHO, M. **Desempenho produtivo e reprodutivo e parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras alimentadas com diferentes fontes de gordura no período de transição e inicio de lactação.** 2009. 102 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga – SP.

McEVOY, T. G.; ROBINSON, J. J.; SINCLARI, K. D. Developmental consequences of embryo and cell manipulation in mice and farm animals. **Reproduction**, v. 122, n.4, p. 507-18, 2001.

MCNAMARA, S.; BUTLER, T.; RYAN, D. P.; MEE, J. F.; DILLON, P.; O'MARA, F. P.; BUTLER, S. T.; ANGLESEY, D.; RATH, M.; MURPHY, J. J. Effect of offering rumen protected fat supplements on fertility performance in spring-calving holstein-friesian cows. **Animal Reproduction Science**, v.79, p. 45- 56, 2003.

NAGAHATA, H. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v. 66, n. 12, p. 1475-82, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient requeriments of dairy cattle.** 6.rev.ed. National Academy Press Washinton, D.C. 1989.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle.** 7th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC. 2001.

NAVES, A. B.; FREITAS JUNIOR, J. E.; BARLETTA, R. V.; GANDRA, J. R. ; CALOMENI, G. D.; GARDINAL, R.; TAKIYA, C. S.; VENDRAMINI, T. H. A.; MINGOTI, R. D.; RENNO, F. P. Effect of raw soya bean particle size on productive performance and digestion of dairy cows. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 111, p. 14-20, 2015.

NONNECKE, B. J.; FRANKLIN, S. T.; YOUNG, J. W. Effects of ketones, acetate, and glucose on in vitro immunoglobulin secretion by bovine lymphocytes. **Journal of Dairy Science**, v.75, p. 982–990, 1992.

ONETTI, S. G.; GRUMMER R. R. Response of lactating cows to three supplemental fat sources as affected by forage in the diet and stage of lactation: a meta-analysis of literature. **Animal Feed Science and Technology**, v.115, n.01-02, p.65-82, 2004.

OSPINA, P.A.; NYDAM, D.V.; STOKOL, T.; OVERTON, T.R. Evaluation of nonesterified fatty acids and β-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 546–554, 2010.

OVERTON, T. R.; DRACKLEY, J. K.; OTTEMANN-ABBAMONTE, C. J. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.77, p.1940-1951, 1999.

OVERTON, T. R.; WALDRON, M. R. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 105-119, 2004, Supplement, E.

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

PALMQUIST, D. L. Influence of source and amount of dietary fat on digestibility in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n.4, p. 1354-60, 1991.

PARODI, P. Positional distribution of fatty acids in the triglyceride classes of milk fat. **Journal of Dairy Res**, 49:73–80, 1982.

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.

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

PETIT, H. V.; GERMIQUET, C.; LEBEL, D. Effect of feeding whole, unprocessed sunflower seeds and flaxseed on milk production, milk composition, and prostaglandin secretion in dairy cows. **Journal of. Dairy Science**, v. 87, p. 3889–3898, 2004.

PETIT, H. V.; PALIN, M. F.; DOEPEL, L. Hepatic lipid metabolism in transition dairy cows fed flaxseed. **Journal of Dairy Science**, v.90, p. 4780–4792. 2007.

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

RABIEE, A. R.; BREINHILD, K.; SCOTT, W.; GOLDER, H. M.; BLOCK, E.; LEAN, I. J. Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 3225–3247, 2012.

RAES, K.; DE SMET, S.; DEMEYER, D. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.113, p.199- 221, 2004.

REIS, M. M.; COOKE, R. F; RANCHES, J.; VASCONCELOS, J. L. M. Effects of calcium salts of polyunsaturated fatty acids on productive and reproductive parameters of lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science,** 95:7039-7050, 2012.

RENNÓ, F. P.; PEREIRA, J. C.; SANTOS, A. D. F.; ALVES, N. G.; TORRES, C. A. A.; RENNÓ, L. N.; BALBINOT, P. Z. Efeito da condição corporal ao parto sobre a produção e composição do leite, a curva de lactação e a mobilização de reservas corporais em vacas da raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.220-233, 2006.

REYNOLDS, C. K.; AIKMAN, P. C; LUPOLI, B.; HUMPHRIES, D. J.; BEEVER, D. E. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. **Journal of Dairy Science**, 86:1201–1217, 2003.

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

RUTIGLIANO, H. M.; LIMA, F. S.; CERRI, R. L. A.; GRECO, L. F.; VILELA, J. M.; MAGALHÃES, V.; SILVESTRE, T.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Effects of method of presynchronization and source of selenium on uterine health and reproduction in dairy cows. **Journal of. Dairy Science**, v. 91, p 3323–3336, 2008.

SANTOS, J. E. P.; BILBY, T. R.; THATCHER, W. W.; STAPLES, C. R.; SILVESTRE, F. T. Long Chain Fatty Acids of Diet as Factors Influencing. Reproduction in Cattle, **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 23-30, 2008. Supplement, 2.

SARTORI, R.; MOLLO, M. R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.197-204. 2007.

SARTORI, R., GUARDIEIRO, M.M. Fatores nutricionais associados à reprodução da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.422-432, 2010.

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.

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.; KAIM, M.; MOALLEM, U. Effect of dietary calcium soaps on milk yield, body weight, reproductive hormones, and fertility in first parity and older cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p.1652-1660, 1994.

STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W.; CLARK, J.H. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.938-947, 1990.

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

STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; THATCHER, W. W. Optimizing energy nutrition for reproducing dairy cows: Influence of supplement fats on reproductive tissues and performance of lactating cow. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 856–71, 1998.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. SAS OnlineDoc. Version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2004. (CD-ROM).

STONE, W.C.; CHASE, L.E.; OVERTON, T.R.; NESTOR, K.E. Brown midrib corn silage fed during the peripartal period increased intake and resulted in a persistent increase in milk solids yield of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 6665–6676, 2012.

TAMMINGA, S.; LUTEIJN, P. A.; MEIJER, R. G. M. Changes in composition and energy content of liveweight loss in dairy cows with time after parturition. **Livestock Production Science**, v.52, p.31-38, 1997.

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J.K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1435–1450, 2001.

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MEILKE, A.; KAMIMURA, S.; BILBY, T.; KOWASKI, A. A.; BADINGA, L.; PERSHING, R.; BATOLOME, J.; SANTOS, J. E. Regulation of embryo survival in cattle. **Reproduction**, v. 61, p. 253–266, 2003.

TSUBOYAMA-KASAOKA, N.; TAKAHASHI, M.; TANEMURA, K.; KIM, H. J.; TANGE, T.; OKUYAMA, H.; KASAI, M.; IKEMOTO, S.; EZAKI, O. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. **Diabetes**, 49:1534–1542, 2000.

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

VAN KNEGSEL, A. T. M.; VAN DEN BRAND H.; DIJKSTRA, J.; VAN STRAALEN, W. M.; HEETKAMP, M. J.; TAMMINGA, S.; KEMP, B. Dietary energy source in dairy cows in early lactation: energy partitioning and milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p.1467–1476, 2007.

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

VANDEHAAR, M. J.; SHARMA, B. K.; FOGWELL, R. L. Effect of dietary energy restriction on the expression of insulin-like growth factor-i in liver and corpus luteum of heifers. **Journal of Dairy Science**, v.78, p.832-841, 1995.

VENTURELLI, B. C.; DE FREITAS JÚNIOR, J. E.; TAKIYA, C. S.; DE ARAÚJO, A. P. C.; SANTOS, M. C. B.; CALOMENI, G. D.; GARDINAL, R.; VENDRAMINI, T. H. A.; RENNÓ, F. P. Total tract nutrient digestion and milk fatty acid profile of dairy cows fed diets containing different levels of whole raw soya beans. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 99, p. 114-127, 2015.

WANG, J. P.; BU D. P.; WANG, J. Q.; HUO, X. K.; GUO, T. J.; WEI, H. Y.; ZHOU, L. Y.; RASTANI, R. R.; BAUMGARD, L. H.; LI, F. D. Effect of saturated fatty acid supplementation on production and metabolism indices in heat-stressed mid-lactation dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 93 :4121–4127, 2010.

WARNTJES, J. L.; ROBINSON, P. H.; GAL, E.; DEPETERS, E. J.; HOWESC, D. Effects of feeding supplemental palmitic acid (C16:0) on performance and milk fatty acid profile of lactating dairy cows under summer heat. **Animal Feed Science and Technology 140**, 241–257, 2008.

WEISS, W.P.; PINOS-RODRÍGUEZ, J.M.; WYATT, D. J. The value of different fat supplements as sources of digestible energy for lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 931–939, 2011.

WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v.65, p.17-29, 2006.

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

WU, Z.; HUBER, J.T. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. **Livestock**, 1993.

ZACHUT, M.; ARIELI, A.; LEHRER, H.; LIVSHITZ, L.; YAKOBY, S.; MOALLEM, U. Effects of increased supplementation of n-3 fatty acids to transition dairy cows on performance and fatty acid profile in plasma, adipose tissue, and milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 5877–5889, 2010a.

ZACHUT, M.; DEKEL, I.; LEHRER, H.; ARIELI, A.; ARAV, A.; LIVSHITZ, L.; YAKOBY, S.; MOALLEM, U. Effects of dietary fats differing in n-6:n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 529–545, 2010b.

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