JÚLIA AVANSI MARQUES

**Efeito de doses crescentes de microalgas ricas em ácido
docosahexaenoico (DHA) na dieta de vacas leiteiras**

Pirassununga

2019

JULIA AVANSI MARQUES

Efeito de doses crescentes de microalgas ricas em ácido docosahexaenoico (DHA) na dieta de vacas leiteiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

De acordo: _____

Orientador

Pirassununga
2019

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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. 3750 FMVZ	<p>Marques, Júlia Avansi Efeito de doses crescentes de microalgas ricas em ácido docosahexaenoico (DHA) na dieta de vacas leiteiras / Júlia Avansi Marques. – 2019. 76 f. : il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2019.</p> <p>Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal. Área de concentração: Nutrição e Produção Animal. Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.</p> <p>1. Bio-hidrogenação. 2. Desempenho. 3. Lipídios. 4. Ômega-3. 5. Perfil de ácidos graxos. I. Título.</p>
-----------------	---

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito de doses crescentes de microalgas ricas em ácido docosahexaenóico (DHA) na dieta de vacas leiteiras", protocolada sob o CEUA nº 7329240917, sob a responsabilidade de **Francisco Palma Rennó e equipe; Júlia Avansi Marques** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 06/12/2017.

We certify that the proposal "Effects of increasing dietary levels of microalgae rich in docosahexanoic acid on lactating dairy cows", utilizing 24 Bovines (24 females), protocol number CEUA 7329240917, under the responsibility of **Francisco Palma Rennó and team; Júlia Avansi Marques** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/06/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **11/2017** a **02/2018**

Área: **Nutrição E Produção Animal**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 8 anos**

N: **24**

Linhagem: **Holandesa**

Peso: **500 a 900 kg**

Resumo: O presente estudo tem por objetivo avaliar o efeito da inclusão de doses crescentes de microalgas desidratadas ricas em ácido docosahexaenóico (DHA) na dieta de vacas leiteiras sobre o consumo de nutrientes, digestibilidade aparente total dos nutrientes, produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite, fermentação ruminal, balanço de nitrogênio, síntese microbiana ruminal e concentração de metabólitos sanguíneos. Serão utilizadas 24 vacas em lactação da raça Holandesa, sendo 8 delas fistuladas no rúmen, distribuídas em delineamento em quadrado latino (QL), sendo 6 QL 4x4, nos seguintes tratamentos: dieta basal sem suplementos (A0); e suplementação de 2 g/kg de MS (A50), 4 g/kg de MS (A100) ou 6 g/kg de MS (A150) de uma fonte comercial de microalgas desidratadas de células inteiras ricas em DHA. As dietas serão formuladas de acordo com o NRC (2001), na proporção forragem:concentrado de 48:52. Será realizado procedimento cirúrgico para fistulação no rúmen de 8 vacas para uso no experimento. Cada período experimental terá duração de 21 dias, com 14 dias de adaptação e 7 de coletas. Durante o período de coletas, serão amostrados os alimentos fornecidos e sobras diárias. Serão realizadas coletas de fezes e urina nos dias 17, 18 e 19 de cada período. As coletas de leite serão realizadas nos dias 15, 16 e 17, e coletas de sangue no dia 16. No dia 21, será realizada amostragem de líquido ruminal das vacas canuladas, antes da alimentação matinal (T0) e 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 horas após a alimentação matinal.

Local do experimento: Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite □ VNP-FMVZ

São Paulo, 08 de dezembro de 2017

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária Executiva

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MARQUES, Júlia Avansi

Título: Efeito de doses crescentes de microalgas ricas em ácido docosahexaenoico (DHA) na dieta de vacas leiteiras

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____ / ____ / ____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por guiar todos meus caminhos, por oferecer oportunidades na minha caminhada, pela minha família e pelos amigos que me proporcionou durante esse período, que foram anjos em minha vida.

À minha família, Jairo, Maria e Israel, pelo apoio durante este período, pela compreensão de que a distância foi necessária e a saudade um sentimento diário, por estarem ao meu lado e me darem forças para suportar todos os momentos difíceis desta jornada. Espero que comemorem este dia de defesa junto comigo, como uma conquista nossa!

À Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de estudos (processo 2017/12542-3), a qual foi fundamental para que a realização deste estudo fosse possível.

Ao Prof. Francisco Rennó, por depositar a confiança no meu trabalho, pelas oportunidades oferecidas e por proporcionar meu crescimento durante o período do mestrado. Agradeço também especialmente à equipe do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite, aos pós-graduandos, estagiários, alunos de iniciação científica, ex-orientados e funcionários (Tiago Del Valle, Elissandra, Lucas, Alanne, Tássia, Lucas - Pecê/Japonês, Luís Guilherme, Larissa, Mauro Sérgio, Nathália, Guilherme, Johnny, Diogo, Luquinhas, Dênis, Carlos Schmidt, Toco, Bigode, Marcos, Fernandes, Seu Wilson, Alemão, Rosa), que se tornaram grandes amigos, sem os quais não teria valido a pena essa jornada, bem como NADA teria sido feito! Agradeço pelas noites sem dormir, por tantos conhecimentos transmitidos, pela paciência em me ajudar, pela revisão dos trabalhos que escrevi, por trocarem experiências profissionais, e por tudo mais que não consegue ser descrito em palavras. Vocês têm meu coração!

Aos grandes amigos da república Colméia e agregados (Vicente Buarque e Nathália Marques, Rafael Ceará, Ferdinando, Rafael Gomes, Juliana Pantaneira, Gustavo Toddynho, Jesus Colômbia, Igor Garcia, Cesinha Tucunaré, Vitinho, Laís Guimarães e Roberto Cantoia). Obrigada por cada momento inesquecível, pelos furtos de comida, pelos churrascos mesmo quando estávamos cansados, pelas festas na piscina, por tantas histórias, fofocas, por ouvirem meus choros e sempre acabarmos dando risada de tudo, e principalmente pelo apoio, pela força e por se tornarem minha família longe de casa.

Às minhas amigas da FMVZ-USP, Isabela Bicudo, Bruna Cordeiro, Daniela Tamiko, Mônica de Cássia, Natália de Paula, Audrey Mika Hayashi, Miriam Zibordi, Thamires Shizue. Agradeço aos amigos de longa data, Vittoria Lima Camandona, Andrei Ogata, Marina Fiani, Caio Tardelli, Denise Okamoto e Marina Nicolau.

Ao técnico Me. Luiz Felipe, pelas análises de AGCC realizadas na UFSCAR. Muito obrigada por contribuir com este trabalho! Agradeço à Alltech, em especial ao Dr. Luiz Fernando Costa e Silva, pelo fornecimento do produto e pela revisão do artigo, dando suporte geral para o experimento.

“Tudo o que é bom dura o tempo necessário para se tornar inesquecível.”

Fernando Pessoa

RESUMO

MARQUES, J. A. **Efeito de doses crescentes de microalgas ricas em ácido docosahexaenóico (DHA) na dieta de vacas leiteiras.** [Effects of increasing dietary levels of microalgae rich in docosahexaenoic acid (DHA) on dairy cows]. 2019. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Este estudo teve por objetivo avaliar o efeito da inclusão de doses crescentes de microalgas ricas em ácido docosahexaenoico (DHA) na dieta de vacas leiteiras sobre o consumo e digestibilidade aparente total (DAT) de matéria seca (MS) e nutrientes, produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite, fermentação ruminal, balanço de nitrogênio e energia, síntese de proteína microbiana ruminal e perfil metabólico. Foram utilizadas 24 vacas em lactação da raça Holandesa [$130,3 \pm 75,7$ DEL e $30,8 \pm 2,66$ kg/d de produção de leite (média $\pm$ DP)], sendo 8 destas canuladas no rúmen, distribuídas em delineamento em quadrado Latino 4×4 , para avaliar os seguintes tratamentos: dieta basal sem adição de microalgas; e suplementação de doses crescentes de microalgas ricas em DHA (2 g, 4 g e 6 g/kg de MS; All-G-Rich[™], Alltech[®], Nicholasville, KY). As dietas foram formuladas de acordo com o NRC (2001), para serem isoenergéticas, isoproteicas e isolipídicas. Cada período experimental teve duração de 21 dias, com 14 dias de adaptação e 7 de coleta. A inclusão de microalga reduziu a ingestão de MS, matéria orgânica (MO), fibra em detergente neutro (FDN), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE). Houve aumento linear da DAT da MS, MO, PB e EE com o aumento da dose de microalga, enquanto houve tendência para efeito quadrático sobre a DAT da FDN, com máximo valor estimado para a dose 4,13 g/kg MS de microalga. A inclusão de microalga afetou de maneira quadrática a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLCG) e para o teor de energia (PLCE), além de tender a afetar de maneira quadrática a produção de leite, sendo as máximas produções observadas em doses intermediárias. Os teores de gordura, proteína e lactose foram reduzidos linearmente com a inclusão de microalga, enquanto a eficiência produtiva foi aumentada linearmente. A adição de microalga reduziu linearmente a proporção de ácidos graxos saturados e aumentou linearmente a proporção de ácidos graxos poli-insaturados na gordura do leite. Houve baixa detecção de DHA no leite; porém, a inclusão de microalga reduziu a proporção de C18:0, C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9,12, e

C18:3 *cis*-9,12,15, e aumentou a proporção de C18:2 *cis*-9, *trans*-11, C18:1 *trans*-9 e C18:1 *trans*-11. A inclusão de microalga reduziu o consumo de energia bruta, porém não afetou o consumo de energia digestível, metabolizável ou líquida. A adição de microalga afetou quadraticamente a síntese de proteína microbiana, com máxima síntese estimada na dose 3,24 g/kg MS. Houve aumento do pH ruminal e redução da concentração ruminal de acetato e ácidos graxos de cadeia curta com a adição de microalga. Portanto, a inclusão de microalga na dieta de vacas leiteiras reduz o consumo e eleva a digestibilidade dos nutrientes, bem como a eficiência produtiva, modificando o perfil de ácidos graxos do leite. Doses intermediárias estimadas (1,22 a 2,90 g/kg MS) de microalga podem ser benéficas à produção de leite, PLCG e PLCE, sendo recomendadas para vacas em lactação.

Palavras-chave: bio-hidrogenação, desempenho, lipídios, ômega-3, perfil de ácidos graxos.

ABSTRACT

MARQUES, J. A. **Effects of increasing dietary levels of microalgae rich in docosahexaenoic acid on dairy cows.** [Efeito de doses crescentes de microalgas ricas em ácido docosahexaenóico (DHA) na dieta de vacas leiteiras]. 2019. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

The objective of this study was to evaluate the effect of increasing levels of microalgae rich in docosahexaenoic acid (DHA) in the diet of dairy cows on dry matter (DM) and nutrients intake and total-tract apparent digestibility (TTAD), milk yield, composition and fatty acids profile, ruminal fermentation, nitrogen and energy balance, ruminal microbial protein synthesis and metabolic profile. Twenty-four (eight of them with ruminal cannulas) Holstein lactating cows [130.3 ± 75.5 DIM and 30.8 ± 2.66 kg/d of milk yield (mean $\pm$ SD)] were used in a 4×4 Latin square design, to evaluate the following treatments: basal diet with no microalgae; and increasing levels of microalgae (2 g, 4 g, and 6 g/kg DM; All-G Rich[™], Alltech[®], Nicholasville, KY). Diets were formulated according to NRC (2001), to have the same amounts of energy, protein and lipids. Each experimental period lasted for 21 days, with 14 adaptation days and 7 sampling days. Microalgae inclusion reduced DM, organic matter (OM), crude protein (CP), ether extract (EE) and neutral detergent fiber (NDF) intake. DM, OM, CP and EE TTAD was linearly increased with increasing microalgae level. There was a tendency for a quadratic effect on NDF TTAD, with the highest value of quadratic response estimated at 4.13 g/kg DM microalgae level. Moreover, fat-corrected milk (FCM) and energy-corrected milk (ECM) were quadratically affected, and milk yield tended to be quadratically affected when ALG levels increased. Maximal milk yields were observed at intermediate ALG doses. Milk fat, protein, and lactose contents were diminished, while productive efficiency was improved by the increase of microalgae levels. Microalgae decreased saturated fatty acids proportion, and increased milk polyunsaturated fatty acids proportion. There was low DHA transfer into milk; however, microalgae inclusion decreased C18:0, C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9,12, and C18:3 *cis*-9,12,15 contents, and increased C18:2 *cis*-9, *trans*-11, C18:1 *trans*-9, and C18:1 *trans*-11 contents. Gross energy intake was decreased, while there was no effect on digestible, metabolizable, or net energy intake. Microalgae inclusion quadratically

affected the microbial protein synthesis, with maximal enhancement estimated at 3.24 g/kg DM dose. Microalgae increased ruminal pH and decreased acetate and total short chain fatty acids concentrations. Therefore, the inclusion of microalgae in diets for mid-lactating dairy cows decreases feed intake and increases nutrient digestibility, improving productive efficiency and modifying milk fatty acids profile. Estimated intermediate doses (1.22 to 2.90 g/kg DM) of DHA-rich microalgae may be beneficial to milk, FCM, and ECM yields, being recommended for dairy cows.

Key-words: bio-hydrogenation, fatty acids profile, lipids, omega-3, performance.

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AG – Ácidos graxos
AGCC – Ácidos graxos de cadeia curta
AGCR – Ácidos graxos de cadeia ramificada
AST – Aspartato amino-transferase
IEB – Ingestão de energia bruta
IED – Ingestão de energia digestível
IEL – Ingestão de energia líquida
IEM – Ingestão de energia metabolizável
CLA – Ácido linoleico conjugado
CMS – Consumo de matéria seca
CNF – Carboidratos não fibrosos
DAT – Digestibilidade aparente total
DEL – Dias em lactação
DHA – Ácido docosahexaenóico
DP – Derivados de purinas
DP_{abs} – Derivados de purinas absorvidos
ECC – Escore de condição corporal
EB – Energia bruta
ED – Energia digestível
EE – Extrato etéreo
EL – Energia líquida
EL_L – Energia líquida para lactação
EL_M – Energia líquida para manutenção
EM – Energia metabolizável
EPA – Ácido eicosapentaenoico
EPM – Erro padrão da média
FDA – Fibra em detergente ácido
FDN – Fibra em detergente neutro
FDN_i – Fibra em detergente neutro indigestível
GGT – Gama Glutamyltransferase
MN – Matéria natural

MS – Matéria seca

MO – Matéria orgânica

N – Nitrogênio

NDT – Nutrientes digestíveis totais

N_{mic} – Nitrogênio microbiano

N-NH₃ – Nitrogênio amoniacal

PB – Proteína bruta

PC – Peso corporal

PIDA – Proteína insolúvel em detergente ácido

PIDN – Proteína insolúvel em detergente neutro

PL – Produção de leite

PLCG – Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura

PLCE – Produção de leite corrigida para energia

TMR – Dieta completa (Total mixed-ration)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. pH ruminal de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas.....	58
Figura 2. Concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH_3 , mg/dL) no fluido ruminal de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas.....	58
Figura 3. Concentração de acetato (mM) no fluido ruminal de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas.....	59
Figura 4. Concentração de propionato (mM) no fluido ruminal de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas.....	59
Figura 5. Concentração de butirato (mM) no fluido ruminal de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas.....	60
Figura 6. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) totais (mM) no fluido ruminal de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais e de produto à base de microalgas ricas em DHA utilizado no experimento.....	37
Tabela 2. Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais e de produto à base de microalgas ricas em DHA utilizado no experimento.....	38
Tabela 3. Ingestão e digestibilidade aparente da matéria seca e dos nutrientes de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas.....	47
Tabela 4. Produção, composição do leite e eficiência de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas.....	49
Tabela 5. Perfil de ácidos graxos do leite (g/100g) de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas.....	51
Tabela 6. Perfil de ácidos graxos do leite (g/100g) de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas (continuação).....	52
Tabela 7. Balanço de energia e de nitrogênio em vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas.....	54
Tabela 8. Síntese de proteína microbiana ruminal em vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas.....	55
Tabela 9. pH, N-NH ₃ e perfil de ácidos graxos de cadeia curta ruminais de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas.....	57
Tabela 10. Perfil metabólico de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas.....	61
Tabela 11. Coeficientes de regressão e pontos máximos da curva quadrática para variáveis com efeitos quadráticos pela inclusão de microalgas.....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVO E HIPÓTESE	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	ÁCIDOS GRAXOS: CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO	20
3.2	DIGESTÃO, ABSORÇÃO E METABOLISMO DE LIPÍDIOS EM RUMINANTES	20
3.2.1	Metabolismo ruminal de lipídios	21
3.2.2	Digestão e absorção de lipídios	22
3.2.3	Ácidos graxos essenciais e seu metabolismo.....	24
3.2.4	Metabolismo de lipídios na glândula mamária	25
3.2.5	Síndrome da depressão da gordura do leite	26
3.3	SUPLEMENTAÇÃO DE LIPÍDIOS EM VACAS LEITEIRAS: EFEITOS NO CONSUMO, PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	28
3.4	USO DE MICROALGAS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL.....	29
3.4.1	Efeitos no desempenho de vacas leiteiras alimentadas com microalgas ou óleos de origem marinha ricos em ácidos graxos poli-insaturados	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1	LOCAL, ANIMAIS E TRATAMENTOS	34
4.2	INGESTÃO E DIGESTIBILIDADE APARENTE DA MATÉRIA SECA E DOS NUTRIENTES	36
4.3	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE	38
4.4	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE.....	39
4.5	BALANÇO DE NITROGÊNIO E SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA.....	40
4.6	BALANÇO DE ENERGIA, PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL.	41

4.7	FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	42
4.8	PERFIL METABÓLICO	43
4.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
5	RESULTADOS.....	45
5.1	INGESTÃO E DIGESTIBILIDADE APARENTE DA MATÉRIA SECA E DOS NUTRIENTES.....	45
5.2	PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE.....	46
5.3	PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE.....	48
5.4	BALANÇO DE ENERGIA E DE NITROGÊNIO.....	51
5.5	SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA.....	53
5.6	FERMENTAÇÃO RUMINAL.....	54
5.7	PERFIL METABÓLICO	59
5.7	ESTIMATIVAS DAS EQUAÇÕES DE REGRESSÃO.....	60
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÃO	66
8	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

A avaliação de alimentos alternativos na alimentação animal adquire relevância quando se observa o crescimento da população humana mundial e, consequentemente, da demanda por alimentos (ALTOMONTE et al., 2018; LOEB, 2018). Além disso, as preocupações com bem-estar e saúde animal tem despertado o interesse por estratégias nutricionais que otimizem a saúde animal, sem comprometer o desempenho dos mesmos. Ademais, há uma demanda por alimentos de origem animal com menores riscos à saúde humana, sendo que a manipulação do perfil de ácidos graxos destes alimentos pode reduzir a proporção de lipídios saturados e elevar a de poli-insaturados.

A suplementação de DHA e de ácido eicosapentaenoico (EPA) na dieta de humanos pode reduzir a incidência de doenças crônicas e inflamatórias, transtornos de déficit de atenção e de hiperatividade (BROOKES et al., 2006). O consumo de ácidos graxos insaturados, principalmente ácido linoleico conjugado (CLA), também tem sido relacionado à redução na incidência de câncer, obesidade, diabetes e problemas cardiovasculares (MANSBRIDGE e BLAKE, 1997). Os óleos de peixe são considerados as principais fontes de ômega-3 (n-3) na dieta de humanos; entretanto, seu consumo é baixo, quando comparado às carnes bovinas e de aves (GONZALEZ et al., 2003). Portanto, alternativas para elevar as concentrações de DHA, ácido *trans* vacênico (C18:1 *trans*-11) e isômeros de CLA, principalmente C18:1 *cis*-9 *trans*-11 e C18:2 *trans*-10, *cis*-12 em diversos produtos de origem animal são desejáveis (ABUGHAZALEH et al., 2004; BOECKAERT et al., 2008).

Para vacas em lactação, a suplementação lipídica é uma estratégia vantajosa, não apenas por aumentar a densidade energética das dietas e reduzir o balanço energético negativo (NRC, 2001), mas também por melhorar o desempenho reprodutivo (SILVESTRE et al., 2011) e a imunidade (GANDRA et al., 2016), além de alterar a composição e o perfil de ácidos graxos do leite (BARLETTA et al., 2016). Especificamente, o fornecimento de dietas ricas em ácidos graxos n-3 a vacas leiteiras apresenta benefícios como aumento da capacidade fagocitária na resposta imune celular (GANDRA et al., 2016), aumento da taxa de concepção (SINEDINO et al., 2017), maior número de folículos e maior taxa de clivagem de oócitos (MOALLEM et al., 2013; GANDRA et al., 2017).

No entanto, a suplementação de lipídios poli-insaturados pode trazer prejuízos ao desempenho animal, afetando o consumo de matéria seca, a fermentação ruminal e o

teor de gordura do leite, sendo que fontes lipídicas protegidas e em menores doses tendem a apresentar poucos efeitos negativos (JENKINS, 1993). Quando se estuda fontes de EPA e DHA, alguns trabalhos trazem resultados da suplementação de óleos livres. Estudos mais recentes, no entanto, têm apresentado as microalgas como fonte alternativa de ácidos graxos n-3 poli-insaturados (GLOVER et al., 2012; SINEDINO et al., 2017).

Microalgas têm sido utilizadas na indústria alimentícia de animais aquáticos, sendo uma opção para a alimentação de aves, suínos, ruminantes e humanos (HE, et al., 2002; BECKER, 2007; SINEDINO et al., 2017). Embora existam alguns estudos de respostas produtivas à adição de microalgas ricas em DHA na dieta de vacas leiteiras, faltam estudos sobre a avaliação de diferentes doses de microalgas para vacas leiteiras em um mesmo experimento, em tratamentos com dietas isolipídicas, de forma a determinar qual a melhor dose de suplementação. Além disso, as condições dos trabalhos disponíveis são diferentes daquelas observadas nas condições de Brasil Centro-Sul, onde a silagem de milho tem sido tradicionalmente utilizada como volumoso único.

2 OBJETIVO E HIPÓTESE

Avaliar os efeitos da inclusão de doses crescentes de microalgas ricas em DHA em dietas isolipídicas de vacas leiteiras sobre o consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes, produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite, fermentação ruminal, síntese de proteína microbiana, utilização de nitrogênio e energia, e perfil metabólico. A hipótese a ser avaliada é que a suplementação de microalgas ricas em DHA melhore o perfil de ácidos graxos do leite, sem afetar o desempenho produtivo, a digestibilidade dos nutrientes e a fermentação ruminal de vacas leiteiras, atuando de maneira dose-dependente.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ÁCIDOS GRAXOS: CARACTERIZAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO

Os lipídios caracterizam-se por ser uma classe de compostos químicos insolúveis em água, apolares, pertencendo a este grupo os ácidos graxos. Os triacilgliceróis são formados por uma molécula de glicerol ligada a 3 cadeias de ácidos graxos por meio de uma ligação do tipo éster, estando presentes nos óleos e gorduras de origem animal e vegetal (FURLAN et al., 2011). Os atributos dos ácidos graxos são altamente dependentes das suas características estruturais, dentre os quais devemos destacar: comprimento da cadeia, grau de insaturação, geometria de insaturação (*cis* ou *trans*), ramificação (iso ou ante-iso), família-n (ômega) e dieno conjugado (presença de duas ligações adjacentes sem ligação metilênica). Estas influenciam sua função biológica, característica química e essencialidade do ácido graxo (PALMQUIST e MATTOS, 2011).

A família-n à qual o ácido graxo insaturado pertence é determinada pela localização da primeira instauração na cadeia de carbonos. Por exemplo, os ácidos graxos ômega-3 apresentam a primeira insaturação no terceiro carbono, em relação ao carbono terminal, enquanto os ácidos graxos ômega-6 apresentam a primeira insaturação após o sexto carbono da cadeia. Os principais ácidos graxos pertencentes à família ômega-6 são o ácido linoleico (C18:2 n-6) e araquidônico (C20:4 n-6). Já o ácido linolênico (C18:3 n-3), ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) e ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3) pertencem à família ômega-3.

As exigências de lipídios para os animais estão relacionadas com ácidos graxos essenciais como componentes de membranas e precursores de moléculas regulatórias (prostaglandinas, dentre outros). Tais necessidades podem ser supridas quando os lipídios participam de pelo menos 1% da MS da ração (PALMQUIST e MATTOS, 2011).

3.2 DIGESTÃO, ABSORÇÃO E METABOLISMO DE LIPÍDIOS EM RUMINANTES

3.2.1 Metabolismo ruminal de lipídios

Os ácidos graxos de cadeia longa (16 a 22 carbonos) ingeridos pelos animais podem ser transferidos diretamente para a gordura do leite, em um processo energeticamente vantajoso e que leva a uma alteração do perfil de ácidos graxos do leite (GANDRA et al., 2016). No entanto, após a ingestão do alimento, já no rumino-retículo, os ácidos graxos de cadeia longa sofrem os processos de lipólise e biohidrogenação (JENKINS, 1993), o que pode alterar o perfil de ácidos graxos da digesta.

Inicialmente, os lipídios são liberados no rúmen, em taxas variáveis de acordo com a matriz do alimento (BARLETTA et al., 2016; BETTERO et al., 2017). No caso de sementes de oleaginosas, os lipídios encontram-se no gérmen, necessitando que haja degradação da parede celular para que sejam liberados, tornando o processo de liberação mais lento. O metabolismo de lipídios no rúmen é, portanto, limitado por sua taxa de liberação. Após este processo, os lipídios são hidrolisados a ácidos graxos e glicerol, por meio da lipólise ruminal. O glicerol, por sua vez, é fermentado a propionato ou absorvido pelo epitélio ruminal, sendo considerado precursor gliconeogênico (PALMQUIST e MATTOS, 2011).

Certos ácidos graxos são considerados “tóxicos” aos microrganismos ruminais, principalmente ácidos graxos de cadeia média (10 a 14 carbonos) e poli-insaturados de cadeia longa, afetando principalmente protozoários, bactérias Gram positivas e metanogênicas. Sua toxicidade se deve à natureza anfílica dos ácidos graxos, ou seja, à solubilidade em solventes orgânicos e na água. Por apresentarem alta solubilidade em água e em membranas celulares, estes ácidos graxos têm maior potencial para romper a estrutura da membrana dos microrganismos, ao serem incorporados pelos mesmos (PALMQUIST e MATTOS, 2011).

Além de efeitos tóxicos aos microrganismos ruminais, ácidos graxos poli-insaturados são relacionados com efeitos negativos particularmente à digestibilidade da fibra. Dentre as possíveis causas, destacam-se: modificação da população microbiana ruminal por efeitos tóxicos; inibição da atividade microbiana por efeitos dos ácidos graxos nas membranas celulares; e menor disponibilidade de cátions no meio ruminal pela formação de complexos insolúveis com ácidos graxos de cadeia longa, afetando a função microbiana (PALMQUIST e JENKINS, 1980). Em meta-análise recente (WELD e ARMENTANO, 2017), foi reportada redução da digestibilidade aparente total da FDN ao se suplementar 3% de ácidos graxos de cadeia média ou poli-insaturados para vacas

leiteiras. Entretanto, a inclusão dietética a 3% de sais de cálcio de cadeia longa ou ácidos graxos saturados elevou a digestibilidade da FDN, demonstrando efeitos variáveis na digestibilidade da fibra de acordo com características da fonte lipídica fornecida.

Como um mecanismo de proteção, a microbiota realiza o processo de biohidrogenação, convertendo ligações insaturadas dos ácidos graxos em saturadas, tornando-os menos tóxicos. Tal processo requer que o ácido graxo tenha sido liberado do triglicerídeo após o processo de lipólise. A biohidrogenação do ácido linoleico envolve uma isomerização e duas reduções (hidrogenações), levando à formação do ácido esteárico (C18:0), completamente saturado. Em certas condições ruminais, como em alta concentração de ácidos graxos insaturados e baixo pH, o último passo pode ser inibido, levando ao aumento da concentração de C18:1 *trans*-11 e demais intermediários das vias de biohidrogenação. O ácido linolênico passa por processo de biohidrogenação semelhante, envolvendo isomerização e reduções. Em condições ruminais normais, os ácidos graxos insaturados ingeridos são biohidrogenados em taxa acima de 80%. As espécies mais relacionadas com o processo de biohidrogenação são as do gênero *Butyrivibrio* e demais produtoras de ácido butírico, sendo que a alta produção deste ácido graxo de cadeia curta é associada com o processo de biohidrogenação (PALMQUIST e MATTOS, 2011).

Os ácidos graxos poli-insaturados mais abundantes nas sementes de oleaginosas utilizadas no Brasil (ácido linoleico e ácido linolênico) são extensamente biohidrogenados no rúmen: Bettero et al. (2017) encontraram taxas de biohidrogenação de 96,2% e 98,3%, respectivamente, em vacas secas; já Barletta et al. (2016) encontraram taxas de biohidrogenação de 96,5% e 99,3%, respectivamente, em vacas em lactação. Quanto ao DHA, ainda não são completamente esclarecidos sua via de biohidrogenação e seus metabólitos intermediários. Porém, há evidências de que DHA seja biohidrogenado de maneira a formar apenas ácidos graxos de 22 carbonos, sem ocorrer sua quebra em ácidos graxos de 18 carbonos (ALDAI et al., 2018), gerando principalmente metabólitos *trans*-10 (TORAL et al., 2018).

3.2.2 Digestão e absorção de lipídios

A maior parte dos lipídios que chegam ao duodeno está na forma de ácidos graxos não-esterificados, após sofrer lipólise e biohidrogenação ruminal. Ressalta-se que o fluxo duodenal de alguns ácidos graxos pode ser influenciado por outros,

principalmente pelas mudanças geradas no processo de biohidrogenação ruminal. Em meta-análise recente (PRADO et al., 2018), foi reportada correlação negativa entre o fluxo duodenal de C18:0 e consumo de DHA, enquanto os fluxos duodenais de C18:1 *trans*-11 e C18:1 *trans*-10 tiveram correlação positiva com o consumo de DHA, revelando os efeitos inibitórios deste ácido graxo no processo de biohidrogenação ruminal.

Após as etapas ruminais, a digestão e absorção dos lipídios pode ser dividida em 4 fases: emulsificação, hidrólise, formação de micelas e absorção. Os triacilgliceróis que escapam da lipólise ruminal e chegam ao abomaso passam pelo processo de emulsificação, pelo aquecimento e mistura de lipídios, o que decompõe os glóbulos lipídicos em gotículas. Em seguida, no intestino delgado, ácidos biliares agem nestas moléculas, reduzindo sua tensão superficial e solubilizando os lipídios em água. A hidrólise destes triglicerídeos ocorre no intestino delgado, pela ação das enzimas pancreáticas lipase e colipase, que rompem os ácidos graxos de cada extremidade da molécula do triacilglicerol pela adição de H₂O, sem separar o ácido graxo central, gerando dois ácidos graxos livres e um monoglicerídeo. Então, são formadas as micelas, aglomerados hidrossolúveis de ácidos biliares e lipídios, permitindo que os lipídios difundam-se através do lúmen intestinal, solubilizem-se na camada de água inerte e fiquem em contato com a superfície de absorção da membrana apical dos enterócitos (FURLAN et al., 2011). Ácidos graxos saturados são menos hidrossolúveis, apresentando menor contato com a superfície de absorção e consequente menor digestibilidade em relação aos insaturados (PALMQUIST e MATTOS, 2011).

A absorção dos ácidos graxos ocorre por difusão, pela membrana apical dos enterócitos, por meio de proteínas de transporte para ácidos graxos ou por difusão passiva (monoglicerídeos, colesterol e vitaminas lipossolúveis). Dentro dos enterócitos, os lipídios são captados por moléculas transportadoras e conduzidos ao retículo endoplasmático liso, onde os lipídios são reesterificados a triacilgliceróis e fosfolipídios. Estes compostos são estocados com colesterol e demais proteínas do retículo endoplasmático rugoso em estruturas chamadas quilomícrons. Em seguida, os quilomícrons são expelidos da membrana basolateral para os espaços laterais, seguindo através dos vasos linfáticos intestinais, que desembocam na veia porta (FURLAN et al., 2011).

3.2.3 Ácidos graxos essenciais e seu metabolismo

Os ruminantes possuem exigências quanto a ácidos graxos para sua sobrevivência e desempenho, especialmente ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12, n-6) e ácido linolênico (C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15, n-3). Os animais possuem complexo enzimático dessaturase que introduz ligações dupla *cis* em posições Δ -5, Δ -6 e Δ -9 da cadeia de radicais acila. Porém, não há complexo enzimático para dessaturar ligações na cadeia acila distais da posição Δ -9-10, sendo essencial o consumo de ácidos graxos com ligações duplas após esta posição (PALMQUIST e MATTOS, 2011).

O ácido graxo araquidônico tem sua via de síntese iniciada por meio do ácido linoleico, enquanto EPA e DHA têm sua via de síntese iniciada a partir do ácido linolênico, através de dessaturações e alongamento da cadeia. Estes ácidos são precursores de compostos eicosanoides, como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, com funções regulatórias importantes ligadas ao sistema imune. Ademais, os eicosanoides da série n-6 e os da série n-3 possuem funções opostas em muitos processos fisiológicos, como, por exemplo, na coagulação do sangue (PALMQUIST e MATTOS, 2011). O ácido araquidônico tem papel fundamental pró-inflamatório, pois é convertido em prostaglandinas e leucotrienos eicosanoides ômega-6 durante a cascata inflamatória. Já DHA e EPA são precursores de eicosanoides com propriedades anti-inflamatórias (SIMOPOULOUS, 2006).

O DHA é o principal ácido graxo poli-insaturado utilizado pelo cérebro (até 40% dos ácidos graxos poli-insaturados totais). Apresenta importantes funções neurofisiológicas, mediando a regulação de processos de sobrevivência celular, neuroinflamação e neurogênese, além de participar da transdução de sinais. Ademais, o DHA atua facilitando diversos processos importantes ligados à retina, como no reparo celular (BAZAN et al., 2010).

Por apresentarem baixa capacidade de realizar síntese *de novo* de DHA, torna-se importante que mamíferos consumam este ácido graxo através da dieta, pela ingestão principalmente de peixes, e de alimentos funcionais ou nutracêuticos (DOMENICHIELLO et al., 2015). Células cerebrais, tais como astrócitos e neuroblastomas, podem sintetizar DHA a partir de ácido linolênico, porém com baixa taxa de conversão (0,2%). Essa capacidade limitada se deve à baixa expressão de enzimas Δ -5 e Δ -6 dessaturases no tecido cerebral em comparação com o tecido hepático, que é o principal local de síntese de DHA (DEMAR et al., 2005). Desta

forma, o sistema nervoso depende constantemente de suprimento de DHA proveniente da circulação, para repor o que é metabolizado na produção de moléculas de sinalização, mantendo níveis homeostáticos para demais processos neurofisiológicos como fluidez de membrana e produção de mediadores lipídicos (LACOMBE et al., 2018).

O DHA é principalmente sintetizado pelo fígado a partir de várias dessaturações, elongações e β -oxidação. As dessaturações e elongações ocorrem no retículo endoplasmático, enquanto a β -oxidação ocorre no peroxissomo, para onde os ácidos graxos poli-insaturados de 24 carbonos são transferidos. Ao final, o DHA produzido é transferido de volta ao retículo endoplasmático, onde pode ser esterificado a lipoproteínas e secretado na circulação sanguínea (DOMENICHIELLO et al., 2015). Entretanto, a eficiência de conversão hepática de ácido linolênico em DHA é muito baixa, com taxa abaixo de 0,1% em homens adultos, elevando-se a 9% em grávidas e a 7% em crianças (SAUERWALD et al., 1996; PAWLOSKY et al., 2001; BURDGE et al., 2002), reforçando a necessidade de seu consumo via dieta.

3.2.4 Metabolismo de lipídios na glândula mamária

A gordura é o principal componente energético no leite, sendo composta predominantemente de triglicerídeos (acima de 95%). Para muitas espécies, a composição de ácidos graxos da gordura do leite reflete o perfil de ácidos graxos da dieta. Ruminantes são exceção, pois ácidos graxos da dieta são extensivamente alterados pelo processo de biohidrogenação ruminal. No entanto, a dieta afeta marcadamente a população e processos microbianos ruminais e, como consequência, a dieta e a nutrição influenciarão indiretamente o teor de gordura e perfil de ácidos graxos do leite (BAUMAN e GRIINARI, 2003).

Os ácidos graxos do leite se originam de 2 fontes: a circulação sanguínea ou a síntese *de novo* nas células epiteliais mamárias. Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (4 a 8 carbonos) e ácidos graxos de cadeia média (10 a 14 carbonos) são formados quase exclusivamente da síntese *de novo*; ácidos graxos de cadeia longa (acima de 16 carbonos) são derivados de lipídios circulantes; já ácidos graxos de 16 carbonos são originários de ambas as fontes (BAUMAN e GRIINARI, 2003).

De todos os ácidos graxos presentes na gordura do leite em ruminantes, em torno de 50% são derivados da síntese *de novo*, sendo o acetato a principal fonte de carbono utilizada, em conjunto com β -hidroxibutirato. Os ácidos graxos pré-formados retirados

pela glândula mamária e utilizados diretamente para a síntese da gordura do leite são derivados de lipoproteínas circulantes e ácidos graxos não-esterificados, originários da absorção de lipídios do trato digestivo e da mobilização de reservas corporais, respectivamente. Em ruminantes, ácidos graxos retirados da circulação para produção da gordura do leite são predominantemente oriundos da absorção intestinal de ácidos graxos da dieta e da síntese microbiana. A mobilização de gordura corporal atende a mais de 10% dos ácidos graxos presentes no leite. No entanto, quando vacas se encontram em balanço energético negativo, sua contribuição aumenta em proporção direta com a extensão do déficit energético (BAUMAN e GRIINARI, 2003).

3.2.5 Síndrome da depressão da gordura do leite

A depressão da gordura do leite foi caracterizada por Davis e Browns (1970), sendo definida como redução do teor de gordura do leite e alteração da composição de seus ácidos graxos com o fornecimento de certas dietas. Esta síndrome envolve interrelações entre processos digestivos e metabolismo tecidual, como principais causas relacionadas com alterações na fermentação ruminal de carboidratos e biohidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados.

Dois grupos de dietas são responsáveis por causar a síndrome em ruminantes: 1 – dietas com grandes quantidades de carboidratos prontamente digestíveis e quantidades reduzidas de fibra efetiva; 2 – dietas contendo ácidos graxos poli-insaturados (vegetais e óleos marinhos). No caso do 2º grupo de dietas, relata-se que óleos vegetais não devem deprimir a gordura do leite se o consumo de forragens for alto ou se a efetividade da forragem for suficiente para manter a função ruminal normal. Porém, óleos de peixe e de origem marinha, contendo principalmente EPA e DHA, podem induzir a queda da gordura do leite mesmo em dietas com nível adequado de efetividade de fibra (BAUMAN e GRIINARI, 2003).

Alterações ruminais relacionadas com a queda da gordura do leite incluem mudanças na proporção molar ruminal de AGCC, com redução da proporção acetato:propionato, além de acúmulo de intermediários da biohidrogenação ruminal, especialmente de ácidos graxos C18:1 *trans*. A formação de isômeros de CLA e C18:1 *trans* no rúmen está associada com diversos fatores de risco dietéticos que podem alterar as vias de biohidrogenação ruminal, incluindo excesso de ácidos graxos insaturados, dietas de alto grão e baixo pH ruminal. Em dietas com suplementação de óleos marinhos, pH e AGCC ruminais são minimamente afetados, sendo que seus

componentes aparentemente afetam de maneira direta passos críticos dos processos de biohidrogenação ruminal. Tais intermediários do processo de biohidrogenação inibem a síntese *de novo* na glândula mamária, levando a uma redução do teor de gordura do leite, com aumento da proporção de ácidos graxos de cadeia longa (BAUMAN e GRIINARI, 2003).

A redução de síntese de ácidos graxos com cadeias de todos os comprimentos sugere que os mecanismos podem envolver múltiplos passos na síntese da gordura do leite, com atuação em enzimas lipogênicas chave. O controle destas proteínas ocorre por expressão gênica, abundância de enzimas ou atividade enzimática, que são reduzidas quando ocorre queda na gordura do leite induzida por CLA (PIPEROVA et al., 2000; HARVATINE et al., 2009; JENKINS e HARVATINE, 2014).

A queda no teor de gordura do leite também é relacionada com aumento específico de C18:1 *trans*-10, sendo formado a partir da redução de CLA *trans*-10, *cis*-12, da via de biohidrogenação ruminal do ácido linoleico (GRIINARI et al., 1998; BAUMGARD et al., 2000), especialmente em vacas submetidas a dietas de baixa fibra (BAUMAN e GRIINARI, 2001). Entretanto, apesar do isômero CLA *trans*-10, *cis*-12 estar em maiores concentrações na gordura do leite quando dietas de baixa fibra são fornecidas, pouco ou nenhum CLA *trans*-10, *cis*-12 foi detectado no leite de vacas alimentadas com dietas ricas em óleos marinhos, apesar da queda na gordura do leite ser acompanhada por aumento na concentração de C18:1 *trans*-10 (GRIINARI et al., 1998; ÄRÖLÄ et al., 2002). Portanto, os resultados indicam que outros intermediários da biohidrogenação, além de CLA *trans*-10, *cis*-12, devam inibir a síntese da gordura do leite, atuando na síntese *de novo* na glândula mamária (BAUMAN e GRIINARI, 2001).

Segundo Conte et al. (2018), 5 isômeros de CLA (C18:2 *trans*-10, *trans*-12, C18:2 *trans*-8, *trans*-10, C18:2 *trans*-11, *cis*-13, C18:2 *cis*-9, *cis*-11, C18:2 *cis*-10, *cis*-12) e ácido pentadecanóico (C15:0) apresentam relação com a síntese normal da gordura do leite, enquanto 8 ácidos graxos (C18:2 *trans*-10, *cis*-12, C16:1 *trans*-6–7, C16:1 *trans*-9, C18:1 *trans*-6–8, C18:1 *trans*-9, C18:1 *trans*-10, C18:1 *cis*-11, e C18:3n-3) são positivamente relacionados com a depressão da gordura do leite. Portanto, isômeros de C18:1 *trans* apresentam forte associação com a queda da gordura do leite, além de outros ácidos graxos que, coletivamente, afetam a síntese de gordura na glândula mamária.

3.3 SUPLEMENTAÇÃO DE LIPÍDIOS EM VACAS LEITEIRAS: EFEITOS NO CONSUMO, PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Lipídios podem ser suplementados a dietas de ruminantes em situações de maiores exigências energéticas, como no caso de animais produtores de leite e que praticam exercício físico. Ademais, por possuírem baixo incremento calórico, os lipídios podem ser utilizados em situações nas quais o consumo é limitado por elevadas temperaturas ambientais (PALMQUIST e MATTOS, 2011).

A suplementação lipídica em ruminantes tem sido associada a reduções no consumo de matéria seca (CASPER et al., 1990; SCHAUFF et al., 1992; BARLETTA et al., 2016), por meio de mecanismos como reduzida aceitabilidade das dietas contendo lipídios suplementares; liberação de hormônios intestinais associados à mobilidade do trato gastrintestinal e/ou à oxidação hepática dos lipídios (ALLEN, 2000; BRADFORD et al., 2008); e redução na digestibilidade da fibra, por efeito direto sobre as bactérias fibrolíticas (ABUGHAZALEH et al., 2004).

Segundo a meta-análise realizada por Rabiee et al. (2012), os resultados da suplementação lipídica em vacas leiteiras mostram-se muito variáveis. Há um aumento de 1,05 kg/vaca/dia na produção de leite pela suplementação lipídica, independente da fonte. Além disso, há redução no consumo de matéria seca com a adição de sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac), sementes oleaginosas e sebo. Fontes como sebo e sementes oleaginosas reduzem o teor de gordura do leite, enquanto sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac) aumentam este teor. Quanto à produção de gordura do leite, Megalac e sementes oleaginosas têm efeitos positivos. Os resultados quanto ao teor de proteína do leite são variáveis, apresentando uma redução em geral pela suplementação lipídica, porém sem efeitos para a produção de proteína. Assim, o menor consumo associado à maior produção de leite demonstra que a suplementação lipídica na dieta de vacas leiteiras pode aumentar a eficiência produtiva.

Weld e Armentano (2017) reportam resultados relativos à digestibilidade da FDN após a suplementação lipídica em vacas leiteiras. A suplementação de 3% de ácidos graxos na dieta, na forma de ácidos graxos saturados de cadeia média (12 a 14 carbonos) ou poli-insaturados, reduz a digestibilidade aparente total (DAT) da FDN de 8,0% a 1,2%. Porém, a adição de 3% de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa eleva a DAT da FDN em 3,2%, enquanto lipídios saturados elevam em 1,3%. A

suplementação lipídica, com exceção de lipídios saturados, reduz o consumo de matéria seca, apresentando relação positiva, porém fraca ($r^2=0,20$), com a DAT de FDN.

Boerman et al. (2015) realizaram meta-análise quanto à digestibilidade intestinal de ácidos graxos em vacas leiteiras e encontraram aumento da digestibilidade quanto maior a cadeia de carbonos do ácido graxo e o número de insaturações. Além disso, o tipo de fonte lipídica tem efeito na digestibilidade do ácido graxo, por alterar sua disponibilidade intestinal: enquanto sementes inteiras afetam negativamente a digestibilidade, sais de cálcio de ácidos graxos e óleos vegetais apresentam efeitos positivos.

3.4 USO DE MICROALGAS NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL

Microalgas são microrganismos uni ou pluricelulares, fotoautotróficos, menores do que 400 μm . Podem ser utilizadas como alimento não-convencional para animais, sendo muito eficientes em utilizar energia solar, água salgada ou de baixa qualidade para seu crescimento, com elevada produção por unidade de área (PATIL et al., 2008; PRIYADARSHANI e RATH, 2012), contribuindo para a redução da exploração de recursos naturais (HOLMAN e MALAU-ADULI, 2013). Ademais, algumas espécies de microalgas são utilizadas para produção de biodiesel (KOVÁČ et al., 2013), na indústria farmacêutica e de cosméticos (RIBEIRO et al., 2017), e seu produto residual, parcialmente ou totalmente desengordurado, pode ser aplicado na alimentação animal (LUM et al., 2013).

A produção em larga escala de microalgas é realizada por meio de 4 etapas principais: 1) produção de inóculo; 2) preparação do meio de cultura; 3) produção de biomassa em biorreatores; 4) coleta e processamento de biomassa (ACIÉN et al., 2017). O crescimento da biomassa de microalgas ocorre em fotobiorreatores com controle de pH, temperatura e oxigênio do meio, que permitem trocas de gases e de calor, além de maximizar a interceptação da radiação solar (ACIÉN et al., 2012).

Microalgas apresentam composição química muito variável de acordo com seu gênero, espécie e condições de crescimento (SPOLAORE et al., 2006; VENCKUS, et al., 2017). De maneira geral, são compostas por: 39-71% de proteína bruta, 10-57% de carboidratos, principalmente polissacarídeos, celulose e amido (CHEN et al., 2013) e 6-

86% de lipídios, principalmente esteróis e ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (SPOLAORE et al., 2006).

Os gêneros *Chlorella* e *Spirulina* representam as principais microalgas utilizadas para suplementação proteica (BECKER et al., 2007; KULPYS et al., 2009). O gênero *Prototheca*, particularmente a espécie *Prototheca moriformis*, pode ser utilizado na alimentação de ruminantes após extração do óleo, em associação com casca de soja, substituindo parcialmente o milho moído como fonte de carboidratos não-fibrosos (VAN EMON et al., 2015; DA SILVA et al., 2016).

As microalgas do gênero *Aurantiochytrium* pertencem à família Thraustochytriaceae, sendo microrganismos de origem marinha, eucariontes, apresentando de 50-60% de lipídios em sua composição química. Além disso, contêm alto teor de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, da família ômega-3, principalmente EPA e DHA, presentes em óleos marinhos (MARCHAN et al., 2018).

De acordo com Altomonte et al. (2018), para a alimentação de ruminantes, os produtos à base de microalgas têm sido divididos em:

- 1) Farelo de alga integral e farelo de alga desengordurado, sendo que o desengordurado apresenta apenas 5% de lipídios;
- 2) Óleos à base de microalgas, apresentando 55-56% de lipídios;
- 3) Biomassa de alga desidratada ou desidratada a frio, com 5-60% de lipídios, podendo ser artificialmente encapsulada e protegida do rúmen.

Quanto a seu valor nutricional, os produtos podem ser classificados em:

- 1) Energéticos, utilizados em substituição parcial ao milho ou concentrado (BOECKAERT et al., 2008; DA SILVA et al., 2016), ou como suplementos lipídicos (STAMEY et al., 2012);
- 2) Proteicos, em substituição parcial à soja e demais alimentos proteicos (REYNOLDS et al., 2006; LAMMINEN et al., 2017; ALTOMONTE et al., 2018).

As pesquisas sobre o uso de microalgas na alimentação de ruminantes tiveram seu início há 20 anos (FRANKLIN et al., 1999; PAPADOPOULOS et al., 2002), com crescente interesse na última década (GLOVER et al., 2012; SINEDINO et al., 2017). Como vantagem em relação a monogástricos, os ruminantes podem se beneficiar do nitrogênio não-proteico e digerir a parede celular presente nas microalgas (LUM et al., 2013). No entanto, apesar de seu potencial, há poucas pesquisas sobre o efeito do uso de microalgas como um suplemento dietético de ácidos graxos para vacas leiteiras (ABUGHAZALEH et al., 2009). Dessa forma, seus efeitos no desempenho produtivo de

ruminantes necessitam ser investigados, considerando ainda diferentes níveis de inclusão de microalgas.

3.4.1 Efeitos no desempenho de vacas leiteiras alimentadas com microalgas ou óleos de origem marinha ricos em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa

O efeito de microalgas sobre o consumo de matéria seca revela que quando sua suplementação é excedida, há redução de 7 a 45%. O máximo registrado de consumo de microalga por vacas de leite sem efeitos negativos no consumo varia de 4 a 79 g/kg MS na dieta, variando conforme o tipo de microalga ou farelo de microalga (ALTOMONTE et al., 2018). A redução no consumo é similar à relatada pelo fornecimento de óleo de peixe (DOREAU e CHILLIARD, 1997; LOOR et al., 2005; SHINGFIELD et al., 2012; KAIRENIUS et al., 2018). A principal hipótese levantada para esta redução no consumo sugere redução na palatabilidade do alimento, gerando baixa aceitabilidade (LAMMINEN et al., 2017). Outra explicação seria a diminuição na digestibilidade da fibra, relacionada aos carboidratos fermentáveis em certas microalgas, o que teria influência negativa no pH ruminal (STOKES et al., 2015). Ademais, a suplementação de ácidos graxos poli-insaturados poderia causar distúrbios na fermentação ruminal pela toxicidade à microbiota (BOECKAERT et al., 2008).

Quanto à produção de leite, a maioria dos estudos não encontra diferenças significativas pela suplementação de microalgas, apesar da redução do consumo de matéria seca, aumentando desta forma a eficiência alimentar (ALTOMONTE et al., 2018). Sugere-se que isto ocorra pela incorporação direta de ácidos graxos de microalgas para a gordura do leite, no caso de comparações com dieta controle sem adição de lipídios. Porém, no estudo de Boeckaert et al. (2008) há redução de 45% na produção de leite, provavelmente devido à alta inclusão de microalga na dieta (43 g/kg MS).

Os efeitos na síntese de proteína do leite pela suplementação de microalgas são controversos, demonstrando nenhum efeito ou redução (ALTOMONTE et al., 2018). A redução é apontada como resultado da baixa concentração de histidina em microalgas, o que limitaria a síntese de proteína no leite (LAMMINEN et al., 2017). A variação na lactose do leite é reportada em alguns estudos, com redução ou aumento nos teores, sendo que alguns autores não encontraram diferenças (ALTOMONTE et al., 2018).

A adição de microalga à dieta de vacas leiteiras também reduz o teor de gordura do leite, de 22% a 59%, sendo os resultados similares à suplementação de óleo ou

farinha de peixe (SHINGFIELD et al., 2003; LOOR et al., 2005; BOECKAERT et al., 2008; MOATE et al., 2013; KAIRENIUS et al., 2015; ALTOMONTE et al., 2018). O acúmulo de isômeros C18:2 no conteúdo ruminal, como consequência de efeitos tóxicos de ácidos graxos poli-insaturados à microbiota ruminal, é reportado como associado a esta redução, inibindo a síntese de ácidos graxos na glândula mamária. Na maioria dos estudos, são reportados aumentos principalmente de CLA *cis*-9, *trans*-11 e ácido vacênico (ALTOMONTE et al., 2018). No caso da suplementação de óleos vegetais, os principais isômeros envolvidos são conhecidos (CLA *trans*-10, *cis*-12 e CLA *trans*-9, *cis*-11). No entanto, quando se suplementa microalgas, os isômeros responsáveis pela redução no teor de gordura do leite não estão completamente estabelecidos. A ausência de alteração nos teores de CLA *trans*-10 *cis*-12 na gordura do leite e no fluido ruminal é relatada em diversos estudos ao fornecer óleos poli-insaturados de origem marinha (SHINGFIELD et al., 2003; LOOR et al., 2005; BOECKAERT et al., 2008; VLAEMINCK et al., 2008; ABUGHAZALEH et al., 2009; SHINGFIELD et al., 2012; STAMEY et al., 2012; KAIRENIUS et al., 2015; KAIRENIUS et al., 2018). Toral et al. (2010) hipotetiza que a ação conjunta de CLA *trans*-9, *cis*-11 e C18:1 *trans*-10 possa inibir a síntese da gordura do leite na glândula mamária, no caso da suplementação de microalgas.

A suplementação de microalgas altera o perfil de ácidos graxos no leite, aumentando a concentração de ácidos graxos poli-insaturados (de 54 a mais de 100%). Alguns estudos reportam o aumento de DHA no leite após a suplementação com microalgas, apresentando resultados positivos (BOECKAERT et al., 2008; MOATE et al., 2013). Porém, a tentativa de elevar o teor de ômega-3 no leite via alimentação também tem levado a resultados limitados, apresentando baixa transferência, devido à grande biohidrogenação ruminal de ácidos graxos poli-insaturados (LOOR et al., 2005). Segundo experimento conduzido por Franklin et al. (1999), foi evidenciado aumento da proporção de DHA no leite após 14 dias do início da suplementação de microalga a vacas leiteiras. Entretanto, a concentração de DHA no leite se reduziu 28 dias após o início da suplementação. Os autores sugerem que, após certo tempo de suplementação, os microrganismos ruminais se adaptem à presença de microalga na dieta, resultando em maior biohidrogenação ruminal de DHA e menor incorporação deste na gordura do leite, o que representa outro empecilho à transferência de ácidos graxos da dieta para o leite.

Não estão disponíveis na literatura dados de digestibilidade da matéria seca e de nutrientes após o fornecimento de microalgas. Porém, é reportado aumento da digestibilidade total da matéria seca e dos nutrientes após o fornecimento de óleo de peixe para vacas leiteiras (DOREAU e CHILLIARD, 1997), acompanhado de redução no consumo. O fornecimento de óleos de origem marinha também afeta os parâmetros ruminais, elevando o pH e reduzindo a produção de AGCC, acetato e a relação acetato:propionato, como resultados principais, reportados em estudos com microalgas (BOECKAERT et al., 2008; VLAEMINCK et al., 2008; MOATE et al., 2013) e em estudos com óleo de peixe (DOREAU e CHILLIARD, 1997; SHINGFIELD et al., 2003; SHINGFIELD et al., 2012).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos realizados com animais experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ-USP), sob número de protocolo 7329240917.

4.1 LOCAL, ANIMAIS E TRATAMENTOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) da FMVZ-USP, do dia 17 de Maio a 8 de Agosto de 2017. Foram utilizadas 24 vacas leiteiras da raça Holandesa, com $130 \pm 75,7$ (média $\pm$ DP) dias em lactação (DEL), $2,09 \pm 0,737$ partos, $613 \pm 65,8$ kg de peso corpóreo (PC), $3,12 \pm 0,150$ de escore de condição corporal (ECC) e $30,8 \pm 2,66$ kg/dia de produção de leite. Oito vacas utilizadas no experimento possuíam cânulas ruminais para avaliação de parâmetros de fermentação ruminal. As vacas foram alojadas em baias individuais ($17,5 \text{ m}^2$), contendo cama de areia, ventilação forçada e livre acesso à água.

Foi utilizado o delineamento em quadrados Latinos replicados, balanceados e contemporâneos. De acordo com a produção de leite, dias em lactação, paridade e presença de cânula ruminal, as vacas foram distribuídas em 6 grupos (quadrados). Dentro de cada grupo, as vacas foram atribuídas aleatoriamente a uma das quatro sequências de tratamentos. Cada período experimental teve a duração de 21 dias, sendo 14 dias de adaptação aos tratamentos e 7 dias para coletas de dados e amostras. O período de adaptação de 14 dias é considerado adequado ao se testar dietas com diferentes fontes lipídicas (MACHADO et al., 2016).

Os tratamentos avaliados foram: controle (A0), dieta basal sem a adição de microalgas; e a suplementação de 2 (A2), 4 (A4) ou 6 (A6) g/kg MS de uma fonte comercial de células inteiras desidratadas de microalgas ricas em DHA (All-G RichTM, Alltech[®], Nicholasville, KY, USA; Tabelas 1 e 2), representando 350, 699 e 1049 mg de DHA/kg MS, respectivamente (aproximadamente 8,00, 16,1 e 24,1 g/d de DHA, respectivamente). A microalga foi incluída diretamente no concentrado, durante sua preparação. A biomassa de alga foi produzida na fábrica de alga da Alltech[®], em Winchester, KY, EUA, por fermentação heterotrófica de *Aurantiochytrium* sp..

Tabela 1. Ingredientes e composição química das dietas experimentais e de produto à base de microalgas ricas em DHA utilizado no experimento

Item	Dietas experimentais				ALG
	A0	A2	A4	A6	
Ingrediente (% da MS)					
Silagem de milho ¹	48,0	48,0	48,0	48,0	-
Milho moído	28,0	28,1	28,2	28,3	-
Farelo de soja 48% PB	12,2	12,5	12,8	13,0	-
Grão de soja inteiro	8,70	8,10	7,50	6,90	-
Bicarbonato de sódio	0,85	0,85	0,85	0,85	-
Minerais ²	1,60	1,60	1,60	1,60	-
Calcário	0,15	0,15	0,15	0,15	-
NaCl	0,15	0,15	0,15	0,15	-
Ureia	0,35	0,37	0,39	0,41	-
All-G Rich [®]	0,00	0,20	0,40	0,60	-
Composição bromatológica (% da MS)					
Matéria seca (% da MN)	39,4	39,3	39,3	39,3	97,2
Matéria orgânica	93,5	93,7	93,9	94,1	97,2
Carboidrato não-fibroso ³	39,2	39,3	39,5	39,6	17,1
Fibra em detergente neutro	33,6	33,6	33,5	33,5	4,16
Amido	26,1	26,2	26,4	26,5	3,89
Fibra em detergente ácido	19,1	19,0	19,0	18,9	0,410
Proteína bruta	17,0	17,1	17,1	17,2	15,1
Matéria mineral	6,54	6,32	6,10	5,87	2,84
Extrato etéreo	4,23	4,26	4,30	4,33	60,8
Lignina	3,72	3,71	3,69	3,68	-
Proteína insolúvel em detergente neutro	2,10	2,08	2,08	2,05	-
Proteína insolúvel em detergente ácido	1,20	1,20	1,20	1,20	-
Nutrientes digestíveis totais ⁴	70,0	70,0	70,0	70,0	-
Energia Líquida de Lactação (Mcal/kg MS) ⁵	1,57	1,57	1,57	1,57	-

¹Composição bromatológica média durante período experimental: 24,58% MS, 7,81% PB, 1,84% EE, 56,24% FDN, 33,96% FDA, 28,86% CNF e 58,72% de NDT. ²Conteúdo por kg do produto: 190 g Ca, 60 g P, 20 g Mg, 35 g K, 70 g Na, 20 g S, 15 mg Co, 700 mg Cu, 40 mg I, 700 mg Fe, 1600 mg Mn, 2500 mg Zn, 200 UI Vitamina A, 50 UI Vitamina D, e 1500 UI Vitamina E. ³De acordo com Hall (2000).

⁴Estimado pelo modelo NRC (2001). ⁵De acordo com Weiss et al. (1992).

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais e de produto à base de microalgas ricas em DHA utilizado no experimento

Item	Dietas experimentais				ALG
	A0	A2	A4	A6	
Total de ácidos graxos (g/kg MS)	33,5	33,8	34,0	34,3	547
Ácidos graxos (g/100g)					
C14:0	0,049	0,109	0,168	0,226	3,23
C16:0	16,9	17,5	18,1	18,8	52,2
C18:0	3,16	3,08	2,99	2,91	1,37
C18:1 <i>cis</i> -9	13,4	13,3	13,2	13,1	0,090
C18:2 <i>cis</i> -9,12	49,9	48,1	46,1	44,6	0,110
C18:2 <i>cis</i> -9,12,15	4,43	4,26	4,09	3,92	0,040
Ácido docosahexaenoico	0,00	1,04	2,05	3,06	31,9
Outros	12,3	12,6	13,0	13,4	11,0
Ácidos graxos ômega-6	49,9	48,1	46,4	44,6	0,110
Ácidos graxos ômega-3	12,3	13,7	15,1	16,4	32,0
n-6:n-3 ¹	4,07	3,52	3,08	2,71	0,003

¹Relação ômega-6:ômega-3.

As dietas experimentais foram formuladas de acordo com as recomendações do NRC (2001), de forma a serem isoenergéticas, isoproteicas e isolipídicas, utilizando silagem de milho como único volumoso e relação volumoso:concentrado de 48:52. Grão de soja cru integral foi utilizado na dieta controle, sendo parcialmente substituído pela microalga nos demais tratamentos experimentais.

4.2 INGESTÃO E DIGESTIBILIDADE APARENTE DA MATÉRIA SECA E DOS NUTRIENTES

A dieta foi preparada individualmente e ofertada na forma de dieta completa (TMR), duas vezes ao dia (07h00 e 13h00). O consumo foi registrado diariamente, pela diferença entre oferta e sobras. O ajuste da oferta foi realizado diariamente, de forma a manter a porcentagem de sobras entre 5 e 10% da quantidade de matéria natural ofertada. O consumo médio do período de coletas foi considerado nas análises estatísticas.

Nos últimos 7 dias de cada período experimental, foram coletadas amostras diárias da silagem de milho e sobras, formando amostras compostas dos ingredientes da dieta e das sobras, para cada animal, em cada período. Amostras de milho moído, farelo de soja, grão de soja cru integral e mistura mineral foram coletadas também neste período, durante a preparação do concentrado. Estas amostras foram congeladas para posteriores análises.

Amostras de fezes de cada vaca foram coletadas diretamente do reto, a cada 9 horas, a partir das 06h00 do dia 17 até 21h00 do dia 19 de cada período experimental, representando uma coleta a cada 3 horas em um período de 24 horas (TAKIYA et al., 2017). Após cada coleta, as amostras foram congeladas e, no final de cada período, as amostras foram homogeneizadas a fim de se obter uma amostra composta por vaca e período.

As amostras compostas de alimentos, sobras e fezes foram pré-secas em estufa de ventilação forçada, à 55° C, por 72 horas, e processadas em moinhos de facas (Arthur H. Thomas, Filadélfia, EUA), utilizando peneiras com poros de 1 mm e de 2 mm. Amostras moídas a 1 mm foram utilizadas para avaliação do teor de matéria seca definitiva (MS, método 930.15), cinzas (método 942.05), matéria orgânica (MS – cinzas), proteína bruta (PB; método 984.13), extrato etéreo (EE; método 920.39), fibra em detergente ácido (FDA) e lignina (método 973.18), de acordo com os métodos descritos pela AOAC (2000). A fibra em detergente neutro (FDN) foi analisada utilizando α -amilase (UNDERSANDER et al., 1992) sem adição de sulfito de sódio (Analisador de fibra TE-149, Tecnal Equipamentos para Laboratório, Piracicaba, SP, Brasil), sendo os resultados obtidos expressos com cinzas. O amido foi determinado por degradação enzimática (Termamyl Amyloglucosidase AMG 300L, Novozymes, Basal, Sweden) e a leitura das absorbâncias foi realizada em analisador bioquímico semi-automático (SBA-200, CELM[®], São Caetano do Sul, SP, Brasil), de acordo com Hendrix (1993).

As amostras de alimentos, sobras e fezes moídas a 2 mm foram alocadas em sacos de tecido-não-tecido (CASALI et al., 2008), seguindo a recomendação de 20 mg MS/cm² (NOCEK, 1988) e incubadas no rúmen de duas vacas adaptadas à dieta controle do experimento, por 288 h (HUHTANEN et al., 1994). Depois da remoção das amostras do rúmen, os sacos foram lavados em água corrente e então analisados para o teor de FDN, como previamente descrito, para obtenção dos valores de FDN

indigestível (FDNi). O FDNi foi utilizado para estimar a excreção fecal diária, baseada na ingestão de FDNi e concentração do mesmo nas fezes, segundo a equação:

$$\text{Excreção fecal (kg/d)} = \frac{\text{consumo de FDNi (kg/d)} \times 100}{\% \text{FDNi nas fezes}}$$

A digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes foi calculada a partir da ingestão do nutriente, da estimativa de excreção fecal e da concentração do mesmo nas fezes, segundo a fórmula:

Digestibilidade da MS ou do nutriente (%)

$$= \frac{\text{consumo de MS ou do nutriente (kg/d)} - \text{excreção fecal de MS ou do nutriente (kg/d)}}{\text{consumo de MS ou do nutriente (kg/d)}}$$

Os nutrientes digestíveis totais (NDT) da dieta foram calculados de acordo com as equações do NRC (2001), pela fórmula:

$$\text{NDT}_{1X}(\text{g/kg}) = \text{dvCNF} + \text{dvPB} + (\text{dvAG} \times 2,25) + \text{dvFDN} ,$$

sendo dv = digestibilidade verdadeira dos nutrientes; CNF = carboidratos não-fibrosos; PB = proteína bruta; AG = ácidos graxos; FDN = fibra em detergente neutro.

A energia líquida de lactação (EL, Mcal/kg MS) foi calculada de acordo com Weiss et al. (1992), sem correção para o fator de processamento para a estimativa da digestibilidade dos CNF, por meio da fórmula:

$$\text{EL (Mcal/kg)} = (0,245 \times \text{NDT}_{1X}) - 0,12$$

Os CNF foram calculados de acordo com Hall (2000):

$$\text{CNF}(\%) = 100 - [(\text{PB} - \text{PB da ureia}) + \text{ureia} + \text{FDN} + \text{EE} + \text{cinzas}]$$

4.3 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

As vacas foram ordenhadas mecanicamente, utilizando sistema de ordenha duplo-oito linha baixa acoplada ao sistema DeLaval Alpro® (DeLaval, Tumba, Suíça), duas vezes ao dia, às 06h00 e às 16h00, sendo a produção de leite registrada eletronicamente. As amostras de leite foram coletadas das ordenhas realizadas nos dias 15, 16 e 17 de cada período experimental. Após as coletas do período da manhã, as amostras foram refrigeradas e homogeneizadas de maneira proporcional (60:40) com as amostras obtidas no período da tarde. As amostras de leite foram avaliadas quanto aos teores de gordura, proteína e lactose, utilizando metodologia em infravermelho (Lactoscan®, Entelbra, Londrina, PR, Brasil).

A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura (PLCG), de acordo com a equação proposta por Sklan et al. (1992):

$3,5\% \text{ PLCG (kg/d)} = (0,432 + 0,165 \times \%G) \times \text{PL}$, onde $\%G$ = teor de gordura do leite; e PL = produção de leite (kg/d).

A produção de leite também foi corrigida para energia (PLCE) de acordo com Tyrrell e Reid (1965), onde:

$\text{PLCE (kg/d)} = 0,327 \times \text{PL} + 12,86 \times \text{PG} + 7,65 \times \text{PP}$, onde PL foi previamente definido; PG = produção de gordura (kg/d); e PP = produção de proteína (kg/d).

Amostras de leite (10 mL) foram desproteinizadas no dia 16, de acordo com Broderick e Clayton (1997), filtradas em papel filtro (poro de 14 μm) e congeladas para posteriores análises. As amostras foram analisadas quanto ao teor de ureia, por meio de kits colorimétricos comerciais (Bioclin[®], Belo Horizonte, MG, Brasil), com leitura sendo realizada em um analisador bioquímico semi-automático (SBA-200, CELM[®]), e quanto ao teor de alantoína (FUJIHARA e YAMAGUCHI, 1978), sendo a leitura realizada em leitor de microplaca (Biochrom Asys Microplate Reader, Biochrom[®], Cambridge, RU).

4.4 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE

As amostras de leite utilizadas para avaliação do perfil de ácidos graxos foram obtidas no 17º dia de cada período experimental, sendo cada amostra proveniente das 2 ordenhas diárias, e congeladas para posterior análise. A extração de lipídios do leite foi realizada de acordo com Feng et al. (2004), enquanto a extração de lipídios dos ingredientes da dieta foi realizada de acordo com Folch et al. (1957). As amostras foram metiladas de acordo com Kramer et al. (1997). Os ésteres-metílicos de ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa (GC Shimatzu 2010, com injeção automática, Shimadzu[®] Corporation, Kyoto, Japan), equipado com coluna capilar SP-2560 (100 m $\times$ 0,25 mm d.i., com espessura de 0,02 μm ; Supelco[®], Bellefonte, PA). A temperatura do forno foi mantida em 70°C por 4 min, elevada em 13°C/min até alcançar 175°C, e então mantida nesta temperatura por 27 min. Em seguida, a temperatura foi elevada em 4°C /min até alcançar 215°C, e mantida nesta temperatura por 31 min. Hidrogênio foi utilizado como gás carreador, num fluxo de 40 cm³/s. Foram utilizados

quatro padrões para a identificação: padrões de ácidos graxos C4-C24 (TM 37; Supelco Sigma-Aldrich Group), ácido vacênico C18:1 *trans*-11 (V038-1G; Supelco Sigma-Aldrich Group), C18:2 *trans*-10, *cis*-12 (UC-61M 100mg; Nu-Chek-Prep[®], Inc. Elysian, Waterville, MN, EUA) e C18:2 *cis*-9, *trans*-11 (UC-60M 100mg; Nu-Chek-Prep[®], Inc. Elysian).

4.5 BALANÇO DE NITROGÊNIO E SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

Amostras de urina foram obtidas de todas as vacas, a cada 9 horas, após estímulo abaixo da vulva, a partir das 06h00 do dia 17 até 21h00 do dia 19 de cada período experimental. Amostras de 10 mL foram filtradas e diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N, para evitar a destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico (CHEN e GOMES, 1992), e então, congeladas para posteriores análises, formando uma amostra composta por animal por período.

O volume urinário foi estimado pela concentração de creatinina na urina. A concentração de creatinina foi analisada utilizando kits colorimétricos (Bioclin[®]), com leitura em analisador bioquímico semi-automático (SBA-200, CELM[®]). A constante de excreção diária de 0,212 mmol de creatinina por kg de peso corpóreo (PC) foi utilizada na estimativa do volume urinário (CHIZOTTI et al., 2008).

O consumo de nitrogênio foi determinado por meio do consumo de PB, retirando-se o valor de conversão de nitrogênio 6,25, obtendo-se a quantidade em gramas de nitrogênio consumida. O mesmo cálculo foi realizado com os valores de PB das fezes, obtendo-se a excreção total de nitrogênio (g/kg MS). O nitrogênio total das amostras de urina foi determinado de acordo com as metodologias descritas pelo AOAC (2000, método 984.13), segundo o método micro Kjeldahl. A secreção de N no leite foi obtida dividindo-se a secreção de proteína no leite pelo coeficiente 6,38. O balanço de nitrogênio foi determinado pela diferença entre o consumo de nitrogênio e a soma da excreção fecal, urinária e no leite.

A estimativa de síntese de proteína microbiana ruminal foi realizada partir da quantificação dos derivados de purinas na urina (ácido úrico e alantoína) e no leite (alantoína) proposta por Chen e Gomes (1992). As amostras acidificadas de urina foram analisadas para a determinação de alantoína (FUJIHARA e YAMAGUCHI, 1978). A

concentração de ácido úrico na urina foi determinada utilizando kit colorimétrico (Bioclin[®]) e a leitura foi realizada em analisador bioquímico semiautomático (SBA-200, CELM[®]).

A excreção total de derivados de purina (DP, mmol/d) foi calculada como a soma da excreção de alantoína e ácido úrico na urina, e alantoína no leite (ORELLANA BOERO et al., 2001). Os derivados de purina absorvidos (DP_{abs}, mmol/d) foram calculados como:

$$DP_{abs} \text{ (mmol/d)} = \frac{DP - 0,512 \times PC^{0,75}}{0,84},$$

em que 0,84 representa a recuperação urinária de DP e $0,512 \times PC^{0,75}$, a contribuição endógena da excreção de purinas (GONZALEZ-RONQUILLO et al., 2003). A síntese ruminal de N microbiano (N_{mic}, g/d) foi calculada como:

$$N_{mic} = \frac{(70 \times DP_{abs})}{(0,83 \times 0,134 \times 1000)},$$

considerando 70 = concentração de nitrogênio nos DP (mg/mol); 0,134 = razão de derivados de purina por nitrogênio microbiano; e 0,83 = digestibilidade intestinal de purinas (CHEN e GOMES, 1992; VALADARES et al., 1999).

4.6 BALANÇO DE ENERGIA, PESO E ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL

A ingestão de energia bruta (IEB) foi calculada como o produto do consumo de cada nutriente pelo seu teor de EB. A ingestão de energia digestível (IED) foi obtido por meio do consumo e coeficiente de digestibilidade de cada nutriente, de acordo com NRC (2001).

A ingestão de energia metabolizável (IEM) foi estimado de acordo com a equação (NRC, 2001):

$$EM \text{ (Mcal/kg)} = [(1,01 \times (ED) - 0,45] + 0,0046 \times (EE - 3)$$

A ingestão de energia líquida (IEL) foi calculado a partir da equação (NRC, 2001):

$$EL \text{ (Mcal/kg)} = 0,703 \times EM - 0,19 + \left(\frac{0,097 \times EM + 0,19}{97} \right) \times [EE - 3]$$

A energia líquida para lactação foi estimada de acordo com a equação:

$$EL_L \text{ (Mcal/dia)} = PL \times (0,0929 \times \%G + 0,0547 \times \%P + 0,0395 \times \%L),$$

onde %G é o teor de gordura do leite; %P é o teor de proteína do leite; %L é o teor de lactose. A energia líquida para manutenção (EL_M) foi estimada de acordo com o NRC (2001), por meio da equação: $EL_M \text{ (Mcal)} = 0,08 \times PC^{0,75}$, e o balanço de energia foi estimado pela diferença entre IEL e $EL_L + EL_M$.

O peso corpóreo (PC) foi mensurado nos dias 7 e 8 do período de adaptação e nos dias 20 e 21 do período de coletas, por meio de balança digital (AWS100, DeLaval, Tumba, Suíça), para avaliação da variação de peso. O peso dos animais foi correspondente à média das duas pesagens sucessivas, feitas antes do fornecimento da alimentação e após as ordenhas. O escore de condição corporal (ECC) foi avaliado nos dias 7 e 21, de acordo com Edmonson et al. (1989), por 3 avaliadores treinados, sendo o valor médio considerado para análise estatística.

4.7 FERMENTAÇÃO RUMINAL

No 21º dia de cada período experimental, foram coletadas amostras de líquido ruminal das vacas canuladas, nas regiões crânio dorsal, crânio ventral, ventral, caudo-ventral e caudo-dorsal do rúmen. As coletas foram realizadas antes da alimentação (0h) e 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 horas após a alimentação matinal. Imediatamente após cada coleta, as amostras foram homogeneizadas e filtradas em pano dessorador para obtenção do líquido ruminal (250 mL). O pH do líquido ruminal foi mensurado utilizando um pHmetro (MB-10, Marte Científica®, Santa Rita do Sapucaí, MG, Brasil). Amostras de líquido ruminal (50 mL) foram coletadas e congeladas para posteriores análises.

As amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e centrifugadas a $500 \times g$, por 15 min. Para análise de nitrogênio amoniacal, o sobrenadante (2 mL) foi coletado, homogeneizado com 1 mL H_2SO_4 (1 N), e analisado pelo método colorimético fenol-hipoclorito (BRODERICK e KANG, 1980), com leituras realizadas em leitor de microplaca (Biochrom Asys Microplate Reader).

Para a análise de AGCC, outra alíquota foi coletada (1,8 mL) e transferida para um frasco contendo ácido fosfórico (H_3PO_4 P.A., 0,2 mL). As concentrações de AGCC foram avaliadas por cromatografia gasosa em cromatógrafo (GC-2010 plus chromatograph, Shimadzu®, Barueri, Brasil) equipado com um AOC-20i auto-sampler, coluna capilar Stabilwax-DA™ (30 m, 0,25 mm DI, 0,25 μm df, Restek®), e um detector de ionização de chama. Alíquotas (1 μL) de cada amostra foram injetadas na proporção

de 40:1, utilizando hélio como gás carreador, em velocidade linear de 42 cm/s, em corrida cromatográfica de 11,5 min. As temperaturas de injeção e detecção foram 250 e 300°C, respectivamente, e a temperatura inicial da coluna foi 40°C. A rampa de temperatura da coluna iniciou-se com um gradiente de 40 a 120°C, numa taxa de 40°C/min, seguido de mudanças de 120 a 180°C, na taxa de 10°C/min, e de 180 a 240°C., na taxa de 120°C/min, mantendo-se a temperatura de 240°C por 3 min ao final. A detecção de picos foi realizada utilizando o software GCsolution v. 2.42.00. Ácido 2-etilbutírico (Sigma-Aldrich[®], St Louis, MO, EUA) foi utilizado como padrão interno, e padrões externos foram preparados com ácido acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e vático (Sigma-Aldrich[®]).

4.8 PERFIL METABÓLICO

Coletas de sangue (10 mL) foram realizadas no 16º dia de cada período experimental, por punção dos vasos coccígeos, em tubos vacuolizados, 4 horas após a alimentação matinal. Após centrifugação, o sobrenadante foi armazenado para análise das concentrações de glicose, ureia, enzimas hepáticas [aspartato amino-transferase (AST) e gama-glutamil transferase (GGT)], colesterol e triacilglicerídeos no soro. As análises foram realizadas por meio de kits comerciais, por método colorimétrico (Bioclin[®]). As leituras foram realizadas em aparelho para bioquímica sanguínea (SBA-200, CELM[®]).

4.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos às análises de variância pelo PROC MIXED do SAS 9.4 (Statistical Analysis for Windows 9.4 - Institute Inc., Cary, NC, USA), considerando o seguinte modelo linear aditivo:

$$Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + B_k + \alpha_{kl} + \varepsilon_{ijkl}$$

com $\alpha_{kl} \approx N(0; \sigma_c^2)$ e $\varepsilon_{ijkl} \approx N(0; \sigma_e^2)$, onde, Y_{ijkl} é o valor observado para o animal l , pertencente ao k -ésimo quadrado, no j -ésimo período, quando recebeu o tratamento i ; μ é a média geral; A_i o efeito fixo de tratamento; P_j , o efeito fixo de período experimental; B_k , o efeito fixo de bloco (quadrado); α_{kl} , o efeito aleatório do animal l , pertencente ao

quadrado k ; e_{ijkl} , o erro experimental; N , distribuição Gaussiana; σ_c^2 , variância associada ao animal; e σ_e^2 , variância associada ao erro.

Os dados de fermentação foram analisados como medidas repetidas no tempo, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + A_i + P_j + B_k + \alpha_{kl} + \omega_{ijkl} + T_m + T \times A_{mi} + \varepsilon_{ijklm}$$

considerando os efeitos já descritos acima, com $\omega_{ijkl} \approx N(0; \sigma_\omega^2)$, e $e_{ijklm} \approx MVN(0; R)$, sendo MVN , distribuição normal multivariada; R , matriz de variância-covariância dos resíduos devido a medidas repetidas; T_m , o efeito fixo de tempo de coleta; $T \times A_{mi}$, a interação entre tempo e tratamento; ω_{ijkl} , o erro residual associado com vacas dentro do período experimental. Foram testadas nove matrizes de covariância (CS, CSH, AR, ARH, TOEP, TOEPH, UN, ANTE e FA), sendo a melhor matriz escolhida com base no critério Baisiano.

Os dados foram ainda submetidos à regressão polinomial, utilizando contrastes ortogonais, nos quais foram avaliados os comportamentos linear e quadrático. Estimativas das equações de regressão foram obtidas para as variáveis com efeitos quadráticos, utilizando a função SOLUTION e considerando os efeitos fixos de período e quadrado como aleatórios. Onde efeitos quadráticos foram significativos, a dose de suplementação de microalga no valor máximo da resposta quadrática foi estimada. Nível de significância foi considerado $P \leq 0,05$ e tendência foi considerada $0,05 < P \leq 0,10$.

5 RESULTADOS

5.1 INGESTÃO E DIGESTIBILIDADE APARENTE DA MATÉRIA SECA E DOS NUTRIENTES

A inclusão de microalga reduziu linearmente ($P \leq 0,009$) a ingestão de PB e EE (Tabela 3) e tendeu a afetar de maneira quadrática ($P \leq 0,100$) a ingestão de MS, MO e FDN. A DAT da MS, MO, PB e EE foi aumentada linearmente ($P \leq 0,003$) com o aumento da dose de microalga, enquanto houve tendência para um efeito quadrático sobre a DAT da FDN ($P = 0,062$), sendo o valor máximo estimado para a dose 4,13 g/kg MS de microalga (Tabela 9).

Tabela 3. Ingestão e digestibilidade aparente da matéria seca e dos nutrientes de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas

Caretas alimentadas com doses crescentes de microalgas								
Item	Tratamento ¹				EPM	P ²		
	A0	A2	A4	A6		A	L	Q
Ingestão (kg/dia)								
Matéria seca	23,6	23,2	23,0	21,9	0,30	<0,001	<0,001	0,100
Matéria orgânica	22,2	22,0	21,8	20,8	0,28	<0,001	<0,001	0,083
Fibra detergente neutro	7,57	7,45	7,36	6,94	0,092	<0,001	<0,001	0,054
Proteína bruta	4,17	4,13	4,10	3,95	0,054	0,002	<0,001	0,141
Extrato etéreo	1,05	1,04	1,04	1,01	0,014	0,026	0,009	0,153
Coefic. de digestibilidade (%)								
Matéria seca	67,6	68,3	69,0	70,0	0,32	0,011	0,001	0,789
Matéria orgânica	69,5	70,2	70,9	72,1	0,34	0,002	<0,001	0,609
Fibra detergente neutro	42,2	44,5	45,6	44,7	0,47	0,031	0,024	0,062
Proteína bruta	69,8	70,9	71,4	72,7	0,36	0,009	0,001	0,866
Extrato etéreo	79,0	80,9	81,2	83,7	0,57	0,020	0,003	0,795

¹A0: controle, dieta basal; A2, suplementação de 2 g/kg MS de microalga na dieta; A4, suplementação de 4 g/kg MS de microalga na dieta; A6, suplementação de 6 g/kg MS de microalga na dieta.

²Probabilidades para tratamento (A), contrastes linear (L) ou quadrático (Q).

5.2 PRODUÇÃO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

A inclusão de microalga afetou de maneira quadrática ($P \leq 0,027$; Tabela 4) a PLCG e a PLCE, com tendência quadrática ($P = 0,053$) para a produção de leite, sendo as maiores médias estimadas para as doses 1,22, 1,45 e 2,90 g/kg MS de microalga, respectivamente. Os teores de gordura, proteína e lactose do leite foram reduzidos linearmente ($P < 0,001$), conforme se aumentou a dose de microalga. A adição de microalga afetou a produção de gordura de maneira quadrática ($P = 0,041$), com máxima produção estimada para a dose 0,51 g/kg MS de microalga. As produções de proteína e lactose apresentaram tendência a um efeito quadrático ($P \leq 0,089$), conforme se aumentou a dose de microalga, com máximos valores estimados para as doses 2,47 e 2,39 g/kg MS de microalga, respectivamente. A inclusão de microalga aumentou ($P = 0,001$) a eficiência de produção (PL/CMS), reduziu ($P = 0,029$) a eficiência de produção de leite corrigida para gordura (PLCG/CMS) e não afetou ($P = 0,140$) a eficiência de produção de leite corrigida para energia (PLCE/CMS). A inclusão de microalga na dieta também reduziu linearmente ($P = 0,048$) a excreção de N-ureico no leite.

Tabela 4. Produção, composição do leite e eficiência de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas

Item	Tratamento ¹				EPM	P ²		
	A0	A2	A4	A6		A	L	Q
Produção (kg/d)								
Leite	28,9	29,8	29,6	28,9	0,39	0,210	0,838	0,053
PLCG ³	30,7	31,0	29,7	27,8	0,44	<0,001	<0,001	0,027
PLCE ⁴	31,2	31,5	30,5	28,6	0,42	<0,001	<0,001	0,012
Gordura	1,11	1,11	1,04	0,94	0,020	0,184	<0,001	0,041
Proteína	0,96	0,98	0,97	0,95	0,012	<0,001	0,309	0,089
Lactose	1,45	1,48	1,46	1,42	0,019	0,257	0,222	0,074
Composição (%)								
Gordura	3,88	3,77	3,53	3,28	0,066	<0,001	<0,001	0,288
Proteína	3,34	3,31	3,29	3,28	0,012	<0,001	<0,001	0,355
Lactose	5,01	4,96	4,94	4,93	0,018	<0,001	<0,001	0,239
N-ureico (mg/dL)	9,26	8,79	8,87	8,72	0,127	0,127	0,048	0,351
Eficiência ⁵								
PL/CMS	1,24	1,29	1,30	1,32	0,012	0,002	0,001	0,300
PLCG/CMS	1,31	1,34	1,30	1,26	0,014	0,045	0,029	0,118
PLCE/CMS	1,32	1,35	1,32	1,30	0,012	0,200	0,192	0,140

¹A0: controle, dieta basal; A2, suplementação de 2 g/kg MS de microalga na dieta; A4, suplementação de 4 g/kg MS de microalga na dieta; A6, suplementação de 6 g/kg MS de microalga na dieta.

²Probabilidades para tratamento (A), contrastes linear (L) ou quadrático (Q).

³Produção de leite corrigida para gordura: 3,5% PLCG = (0,432 + 0,165 × % de gordura do leite) × produção de leite (kg/d).

⁴Produção de leite corrigida para energia: 0,327 × produção de leite (kg/d) + 12,86 × produção de gordura (kg/d) + 7,65 × produção de proteína (kg/d).

⁵PL/CMS = produção de leite (kg/d) / consumo de matéria seca (kg/d); PLCG/CMS = produção de leite corrigida para gordura (kg/d) / consumo de matéria seca (kg/d); PLCE/CMS = produção de leite corrigida para energia (kg/d) / consumo de matéria seca (kg/d).

5.3 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE

O DHA foi detectado apenas em 4 amostras de leite, sendo procedentes de 1 observação no tratamento A4 (0,14%) e de 3 observações no tratamento A6 (0,11, 0,17 e 0,12%). A inclusão de microalga reduziu linearmente ($P \leq 0,001$) as proporções de ácidos graxos saturados, de C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9,12, C18:3 *cis*-9,12,15 e ômega-6 na gordura do leite, reduzindo de maneira quadrática ($P = 0,010$) a proporção de C18:0 (Tabelas 5 e 6). A microalga aumentou ($P \leq 0,001$) as proporções de ácidos graxos poli-insaturados e de C18:2 *cis*-9, *trans*-11, enquanto aumentou de maneira quadrática ($P \leq 0,044$) as proporções de C18:1 *trans*-9, C18:1 *trans*-11 e C22:0.

Tabela 5. Perfil de ácidos graxos do leite (g/100g) de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas

Ácidos Graxos (g/100g)	Tratamento ¹				EPM	P ²		
	A0	A2	A4	A6		A	L	Q
C4:0	1,29	1,26	1,30	1,22	0,018	0,236	0,196	0,324
C6:0	1,57	1,50	1,50	1,43	0,022	0,033	0,005	0,884
C8:0	1,12	1,04	1,02	0,985	0,033	0,004	<0,001	0,410
C10:0	2,83	2,62	2,52	2,44	0,043	0,001	<0,001	0,366
C11:0	0,078	0,067	0,062	0,054	0,002	<0,001	<0,001	0,808
C12:0	3,42	3,18	3,07	3,00	0,047	0,001	<0,001	0,251
C13:0	0,200	0,176	0,165	0,160	0,003	<0,001	<0,001	0,158
C14:0	11,1	11,0	11,1	10,9	0,10	0,763	0,427	0,865
C14:1	0,892	0,896	0,964	0,994	0,029	0,046	0,007	0,662
C15:0	0,970	0,941	0,958	0,944	0,011	0,689	0,476	0,674
C16:0	32,7	33,1	32,7	33,5	0,32	0,473	0,265	0,621
C17:0	0,591	0,584	0,579	0,577	0,004	0,416	0,102	0,731
C18:0	12,6	12,7	11,8	10,3	0,25	<0,001	<0,001	0,010
C18:1 <i>trans</i> -9	0,152	0,237	0,395	0,573	0,012	<0,001	<0,001	0,044
C18:1 <i>trans</i> -11	0,426	0,656	1,23	2,12	0,015	<0,001	<0,001	0,008
C18:1 <i>cis</i> -9	22,3	21,8	21,2	19,6	0,01	<0,001	<0,001	0,213
C18:2 <i>cis</i> -9,12	2,34	2,27	2,23	2,14	0,001	0,006	<0,001	0,836
C18:3 <i>cis</i> -9,12,15	0,181	0,178	0,161	0,158	0,002	<0,001	<0,001	0,949
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,210	0,325	0,589	0,902	0,032	<0,001	<0,001	0,075
C20:0	0,118	0,130	0,115	0,110	0,127	0,046	0,087	0,107
C20:1 <i>cis</i> -11	0,085	0,095	0,100	0,099	0,002	<0,001	<0,001	0,031
C20:3 <i>cis</i> -8,11,14	0,059	0,053	0,026	0,015	0,003	<0,001	<0,001	0,600
C20:4 <i>cis</i> -5,8,11,14	0,125	0,108	0,078	0,082	0,003	<0,001	<0,001	0,072
C22:0	0,006	0,056	0,043	0,046	0,003	<0,001	<0,001	<0,001
Outros	4,51	5,21	6,16	7,38	0,147	<0,001	<0,001	0,350

¹A0: controle, dieta basal; A2, suplementação de 2 g/kg MS de microalga na dieta; A4, suplementação de 4 g/kg MS de microalga na dieta; A6, suplementação de 6 g/kg MS de microalga na dieta.

²Probabilidades para tratamento (A), contrastes linear (L) ou quadrático (Q).

Tabela 6. Perfil de ácidos graxos do leite (g/100g) de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas (continuação)

Ácidos Graxos (g/100g)	Tratamento ¹				EPM	P ²		
	A0	A2	A4	A6		A	L	Q
Monoinsaturados	25,2	25,1	25,3	25,1	0,28	0,966	0,905	0,928
Poli-insaturados	2,92	2,93	3,09	3,30	0,052	0,001	<0,001	0,166
<C16	23,5	22,6	22,6	22,0	0,21	0,021	0,003	0,721
C16	34,0	34,3	34,0	34,3	0,31	0,859	0,716	0,862
>C16	39,3	39,2	38,7	37,8	0,36	0,153	0,028	0,427
Saturados	68,6	68,4	66,9	65,8	0,35	<0,001	<0,001	0,389
Insaturados	28,2	27,9	28,4	28,3	0,30	0,855	0,641	0,865
Sat/Insat ³	2,47	2,48	2,39	2,38	0,039	0,474	0,166	0,795
n-6	2,53	2,43	2,33	2,23	0,031	<0,001	<0,001	0,938
n-3	0,181	0,177	0,167	0,175	0,004	0,496	0,349	0,405
n-6/n-3 ⁴	14,0	13,8	14,5	14,0	0,40	0,610	0,744	0,752

¹A0: controle, dieta basal; A2, suplementação de 2 g/kg MS de microalga na dieta; A4, suplementação de 4 g/kg MS de microalga na dieta; A6, suplementação de 6 g/kg MS de microalga na dieta.

²Probabilidades para tratamento (A), contrastes linear (L) ou quadrático (Q).

³Ácidos graxos saturados/ácidos graxos insaturados. ⁴Relação ômega-6/ômega-3.

5.4 BALANÇO DE ENERGIA E DE NITROGÊNIO

A adição de microalgas na dieta reduziu linearmente ($P < 0,001$) a ingestão de EB e a eficiência de conversão de ED em EL_L (EL_L/IED), enquanto aumentou de maneira linear ($P < 0,001$) o balanço de energia dos animais (Tabela 7). Os tratamentos avaliados não afetaram a ingestão de ED, EM e EL ($P \geq 0,139$). A inclusão de microalga afetou quadraticamente ($P \leq 0,032$) a energia líquida utilizada para manutenção e para lactação dos animais. Houve tendência a um efeito quadrático ($P = 0,061$) do nível de microalga sobre o peso corporal, com máximo valor na dose 2 g/kg MS. Os tratamentos não afetaram ($P \geq 0,327$) o ECC, ganho de peso e ganho de ECC. A adição de microalgas reduziu linearmente ($P < 0,001$) a ingestão e excreção fecal de N, além de tender a afetar de maneira quadrática ($P = 0,083$) a excreção de N no leite, apresentando máximo valor na dose 2 g/kg MS de microalga. Além disso, a inclusão de microalga tendeu a aumentar linearmente ($P = 0,095$) a eficiência de utilização de N (relação N no leite/N ingerido) e não afetou ($P \geq 0,295$) a excreção de N na urina e a quantidade de N absorvido e retido.

Tabela 7. Balanço de energia e de nitrogênio em vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas

Item	Tratamento ¹				EPM	P ²		
	A0	A2	A4	A6		A	L	Q
Ingestão de energia (Mcal/d)								
Bruta	103	102	101	97,0	1,30	<0,001	<0,001	0,088
Digestível	68,0	68,2	68,2	66,3	0,82	0,201	0,139	0,142
Metabolizável	58,1	58,4	58,6	57,2	0,71	0,401	0,392	0,170
Líquida	44,3	44,9	45,3	44,7	0,56	0,618	0,586	0,249
Repartição de energia (Mcal/d)								
Mantença	10,0	10,1	10,1	9,95	0,094	0,072	0,119	0,032
Lactação	21,3	21,5	20,7	19,3	0,30	<0,001	<0,001	0,016
Balanço de energia	13,0	13,3	14,5	15,3	0,51	0,008	<0,001	0,641
EL _L /IED ³	0,318	0,317	0,306	0,293	0,004	0,001	<0,001	0,183
PC ⁴ (kg)	629	634	632	624	7,9	0,166	0,229	0,061
ECC ⁵	3,07	3,08	3,09	3,07	0,024	0,908	0,906	0,491
Ganho de PC (kg)	0,164	3,24	2,24	-1,48	1,810	0,743	0,690	0,307
Ganho de ECC	-0,128	-0,073	-0,074	-0,072	0,019	0,664	0,327	0,476
Nitrogênio (g/d)								
Ingestão	667	661	656	625	8,9	<0,001	<0,001	0,079
Fecal	199	193	188	169	4,0	<0,001	<0,001	0,181
Leite	151	154	153	148	2,0	0,225	0,264	0,083
Urinário	134	145	145	144	6,2	0,903	0,594	0,608
N retido ⁶	161	169	172	173	8,2	0,951	0,588	0,822
N absorvido ⁷	465	468	468	456	5,9	0,403	0,295	0,194
NL/NI ⁸	0,229	0,234	0,234	0,235	0,002	0,237	0,095	0,376

¹A0: controle, dieta basal; A2, suplementação de 2 g/kg MS de microalga na dieta; A4, suplementação de 4 g/kg MS de microalga na dieta; A6, suplementação de 6 g/kg MS de microalga na dieta.

²Probabilidades para tratamento (A), contrastes linear (L) ou quadrático (Q).

³Eficiência: Energia líquida para lactação/Ingestão de energia digestível. ⁴Peso corpóreo. ⁵Escore de condição corporal (1-5). ⁶N retido = N ingerido – (N fecal + N urinário + N no leite). ⁷N absorvido = N ingerido – N fecal. ⁸Relação N no leite/N ingerido.

5.5 SÍNTESE DE PROTEÍNA MICROBIANA

A excreção de ácido úrico na urina (mmol/d) foi reduzida linearmente ($P = 0,008$; Tabela 8) com a inclusão de microalga na dieta. Ademais, a microalga afetou de maneira quadrática ($P \leq 0,042$) a excreção de alantoína na urina e de purinas totais, as purinas absorvidas, a síntese de proteína microbiana ruminal e a razão molar alantoína/purinas totais, enquanto tendeu a afetar de maneira quadrática ($P = 0,079$) a razão molar alantoína na urina/creatinina na urina. O ponto máximo de síntese de proteína microbiana ruminal foi estimado para a dose 3,24 g/kg MS de microalgas. A inclusão de microalga não alterou ($P \geq 0,178$) a eficiência de síntese de proteína microbiana (produção de proteína microbiana/consumo de matéria orgânica digestível) e a excreção de alantoína no leite.

Tabela 8. Síntese de proteína microbiana ruminal em vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas

Item	Tratamento ¹				EPM	P ²		
	A0	A2	A4	A6		A	L	Q
Excreção (mmol/d)								
Ácido úrico na urina	96,5	85,5	81,0	67,7	3,98	0,058	0,008	0,871
Alantoína na urina	234	284	305	262	8,64	0,035	0,180	0,008
Alantoína no leite	3,00	3,57	2,56	3,10	0,194	0,337	0,688	0,973
Purinas totais	326	373	389	339	11,6	0,206	0,611	0,039
Purinas absorvidas	382	439	458	397	13,7	0,200	0,608	0,038
Alantoína/PT ³	0,732	0,776	0,794	0,783	0,007	0,003	0,002	0,024
AIU/Cr ⁴	1,93	2,10	2,33	2,00	0,073	0,211	0,473	0,079
Proteína microbiana (kg/d)	1,50	1,73	1,80	1,56	0,054	0,198	0,607	0,037
Eficiência ⁵	0,107	0,112	0,119	0,103	0,004	0,494	0,855	0,178

¹A0: controle, dieta basal; A2, suplementação de 2 g/kg MS de microalga na dieta; A4, suplementação de 4 g/kg MS de microalga na dieta; A6, suplementação de 6 g/kg MS de microalga na dieta.

²Probabilidades para tratamento (A), contrastes linear (L) ou quadrático (Q).

³Razão molar alantoína/purinas totais. ⁴Razão molar alantoína na urina/creatinina na urina. ⁵Produção de proteína microbiana (g/d)/consumo de matéria orgânica digestível (g/d).

5.6 FERMENTAÇÃO RUMINAL

A inclusão de microalga na dieta elevou linearmente ($P = 0,004$; Tabela 9; Figura 1) o pH ruminal, enquanto reduziu linearmente ($P \leq 0,012$; Figuras 3 e 6) a concentração de acetato e de AGCC totais. Ademais, houve tendência a aumento linear ($P = 0,056$; Figura 2) da concentração de N-NH₃ e tendência a redução linear ($P = 0,072$) da concentração de iso-valerato no líquido ruminal, conforme se aumentou a inclusão de microalga. A microalga não afetou ($P \geq 0,119$; Figuras 4 e 5) as concentrações de propionato, butirato, valerato, iso-butirato e AGCR, bem como as proporções molares (%) de butirato e AGCR. A adição de microalgas reduziu de maneira quadrática ($P = 0,001$) a proporção molar de acetato, elevou linearmente ($P = 0,037$) a proporção molar de propionato e tendeu a afetar de maneira quadrática ($P = 0,062$) a proporção acetato:propionato.

Tabela 9. pH, N-NH₃ e perfil de ácidos graxos de cadeia curta ruminais de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas

Item	Tratamento ¹				EPM	P ²				
	A0	A2	A4	A6		A	T×A	T	L	Q
pH	6,09	6,12	6,16	6,21	0,018	0,028	0,630	<0,001	0,004	0,822
N-NH ₃ (mg/dL)	16,5	17,1	17,2	18,4	0,54	0,233	0,915	<0,001	0,056	0,667
AGCC ³ (mM)										
Acetato	61,6	60,2	59,7	56,2	0,66	<0,001	0,901	<0,001	<0,001	0,209
Propionato	29,9	30,2	29,6	29,9	0,48	0,923	0,569	<0,001	0,860	0,958
Acet:Prop ⁴	2,10	2,03	2,05	1,91	0,023	<0,001	0,908	<0,001	<0,001	0,062
Butirato	15,6	15,4	15,3	15,1	0,28	0,824	0,990	<0,001	0,351	0,913
Iso-valerato	3,10	2,99	2,87	2,76	0,089	0,331	0,780	<0,001	0,072	0,988
Valerato	1,71	1,67	1,67	1,74	0,032	0,821	0,836	<0,001	0,798	0,383
Iso-butirato	1,31	1,27	1,28	1,30	0,014	0,433	0,908	<0,001	0,987	0,103
AGCR ⁵	6,13	5,93	5,82	5,80	0,113	0,426	0,521	<0,001	0,119	0,554
Total AGCC	113	112	110	107	1,3	0,073	0,891	<0,001	0,012	0,570
AGCC (%)										
Acetato	54,6	54,0	54,2	52,6	0,17	<0,001	0,999	<0,001	<0,001	0,001
Propionato	26,2	26,9	26,7	27,8	0,28	0,116	0,076	<0,001	0,037	0,583
Butirato	13,6	13,7	13,8	14,1	0,25	0,588	0,740	<0,001	0,229	0,625
AGCR	5,43	5,38	5,31	5,48	0,057	0,621	0,226	<0,001	0,872	0,248

¹A0: controle, dieta basal; A2, suplementação de 2 g/kg MS de microalga na dieta; A4, suplementação de 4 g/kg MS de microalga na dieta; A6, suplementação de 6 g/kg MS de microalga na dieta.

²Probabilidades para tratamento (A), tempo (T), interação tempo*tratamento (TxA), contrastes linear (L) ou quadrático (Q). ³Ácidos graxos de cadeia curta. ⁴Proporção acetato:propionato. ⁵Ácidos graxos de cadeia ramificada.

Figura 1. pH ruminal de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas

Figura 2. Concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃, mg/dL) no líquido ruminal de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas

Figura 3. Concentração de acetato (mM) no líquido ruminal de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas

Figura 4. Concentração de propionato (mM) no líquido ruminal de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas

Figura 5. Concentração de butirato (mM) no líquido ruminal de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas

Figura 6. Concentração de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) totais (mM) no líquido ruminal de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas

5.7 PERFIL METABÓLICO

A adição de microalga na dieta tendeu a reduzir linearmente ($P = 0,098$) o teor de glicose e aumentou linearmente ($P < 0,001$) o teor de colesterol (Tabela 10). Os tratamentos tenderam a afetar de maneira quadrática ($P = 0,061$) o teor de N-ureico do sangue, sem afetar ($P \geq 0,400$) as concentrações de triacilglicerol, AST e GGT.

Tabela 10. Perfil metabólico de vacas leiteiras alimentadas com doses crescentes de microalgas

Item	Tratamento ¹				EPM	P^2		
	A0	A2	A4	A6		A	L	Q
Glicose (mg/dl)	73,1	72,5	71,4	68,8	0,95	0,389	0,098	0,612
N-ureico (mg/dl)	22,3	20,6	21,4	21,6	0,31	0,108	0,537	0,061
Colesterol (mg/dl)	135	146	156	156	3,2	0,001	<0,001	0,174
Triacilglicerol (mg/dl)	16,7	16,8	17,5	16,9	0,70	0,973	0,848	0,789
AST (U/L)	72,3	74,0	72,9	75,7	1,46	0,768	0,400	0,826
GGT (U/L)	27,6	28,6	27,7	27,4	0,70	0,614	0,621	0,365

¹A0: controle, dieta basal; A2, suplementação de 2 g/kg MS de microalga na dieta; A4, suplementação de 4 g/kg MS de microalga na dieta; A6, suplementação de 6 g/kg MS de microalga na dieta.

²Probabilidades para tratamento (A), contrastes linear (L) ou quadrático (Q).

5.8 ESTIMATIVAS DAS EQUAÇÕES DE REGRESSÃO

Tabela 11. Coeficientes de regressão e pontos máximos da curva quadrática para variáveis com efeitos quadráticos pela inclusão de microalgas

Item	Intercepto	EP	Coeficiente linear	EP linear	Coeficiente quadrático	EP quadrático	Máxima quadrática ¹
dFDN ² (%)	42,2**	1,59	1,61**	0,644	-0,195*	0,104	4,13
Produção de leite (kg/d)	29,0**	1,02	0,559*	0,306	-0,096*	0,048	2,90
LCG (kg/d)	30,7**	1,15	0,336	0,380	-0,137**	0,060	1,22
LCE (kg/d)	31,2**	1,09	0,413	0,347	-0,143**	0,055	1,45
Gordura (kg/d)	1,12**	0,054	0,006	0,018	-0,006**	0,003	0,51
Proteína (kg/d)	0,965**	0,031	0,014	0,010	-0,003*	0,002	2,47
Lactose (kg/d)	1,45**	0,046	0,021	0,015	-0,004*	0,002	2,39
Síntese de proteína microbiana (kg/d)	1,48**	0,189	0,192**	0,085	-0,029**	0,013	3,24

¹g/kg MS de inclusão de microalga.

* $P \leq 0,10$; ** $P \leq 0,05$.

²Digestibilidade aparente total de FDN.

6 DISCUSSÃO

A redução do CMS pela inclusão de microalga pode se justificar por alguns aspectos relacionados à suplementação lipídica de ácidos graxos poli-insaturados, tais como alta liberação de hormônios intestinais ligados à saciedade, como colecistoquinina e peptídeo semelhante a glucagon 1 (REILLING e REYNOLDS, 2007), ou baixa aceitabilidade de fontes lipídicas devido a sua baixa palatabilidade (FRANKLIN et al., 1999). Este resultado é consistente com o de outros autores, ao testar microalgas e óleo de peixe na dieta de vacas de leite (SHINGFIELD et al., 2006; BOECKAERT et al., 2008; MOATE et al., 2013). Boeckart et al. (2008) reportam redução de 45% no CMS ao suplementar 43 g/kg MS à dieta de vacas de leite; no entanto, uma inclusão de 9,35 g/kg MS de microalgas provocou redução de 10% no CMS, revelando uma resposta dose-dependente nesta variável. Ademais, uma redução de 4,5 kg no CMS é relatada pelo fornecimento de 45 g/kg MS de mistura contendo óleo de peixe e óleo de girassol em vacas de leite, principalmente devido ao aumento no fluxo de ácidos graxos poli-insaturados no duodeno, sem afetar a produção de leite (SHINGFIELD et al., 2006).

Aumentos na DAT da MS, MO, PB e EE podem ser relacionados a menor taxa de passagem e maior tempo de retenção da digesta, devido à redução do consumo (VAN SOEST, 1994; HARVATINE e ALLEN, 2006). O aumento na DAT de EE também está relacionada à substituição de C18:2 por C22:6, um ácido graxo de cadeia maior, com mais insaturações e livre de semente oleaginosa, o que elevou a disponibilidade dos ácidos graxos ao chegarem ao intestino (BOERMAN et al., 2015). Além disso, houve tendência a efeito quadrático da inclusão de microalga sobre a DAT de FDN. Outros autores reportam aumentos na DAT ou na digestibilidade ruminal de FDN ao se adicionar óleo de peixe à dieta de vacas de leite (SHINGFIELD et al., 2012; PIRONDINI et al., 2015). Efeitos negativos de fontes de lipídios poli-insaturados são controversos (WELD e ARMENTANO, 2017). Apesar da digestibilidade ruminal da FDN não ter sido avaliada nesse estudo, é possível que doses intermediárias de microalgas não interfiram de maneira negativa na digestibilidade ruminal da fibra. Em doses elevadas, efeitos mais intensos da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados podem diminuir a digestibilidade da fibra (FIEVEZ et al., 2007; BARLETTA et al., 2016), resultando em um efeito quadrático pela adição de microalga. Além disso, a tendência de redução quadrática no consumo de MS, MO e FDN, devido

à drástica redução na dose 6 g/kg MS, pode estar relacionada a efeitos negativos na digestibilidade da fibra, aumentando a saciedade por enchimento ruminal (HARVATINE e ALLEN, 2006).

A elevação no pH ruminal pode ser explicada pela menor produção de AGCC totais, em consequência da redução do consumo. Mudanças na proporção molar de AGCC, especialmente na proporção acetato:propionato, são efeitos documentados da suplementação de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (SHINGFIELD et al., 2012), que podem ser explicados por alterações nas populações bacterianas ruminais. Há evidências de que microrganismos degradadores de fibra afetados negativamente pela suplementação de ácidos graxos poli-insaturados podem ser substituídos por cepas menos sensíveis aos efeitos tóxicos, refletindo a capacidade da microbiota ruminal em se adaptar a mudanças do ambiente, aparentemente sem perdas da digestibilidade ruminal de FDN (TORAL et al., 2017), ao menos em baixos níveis de inclusão de ácidos graxos poli-insaturados.

A microalga tendeu a elevar a concentração de $N-NH_3$, concordando com demais estudos que avaliaram a suplementação de óleos de origem marinha (TORAL et al., 2016), podendo estar associada com aumentos na digestibilidade da MO e da FDN (HUHTANEN et al., 2015). Concentrações de $N-NH_3$ acima de 11,8 mg/dL são referidos como ideais para maximizar a síntese de proteína microbiana (REYNAL e BRODERICK, 2005). No entanto, apesar da maior concentração ruminal de $N-NH_3$, provavelmente houve redução do pool ruminal de $N-NH_3$, devido à redução no CMS. Portanto, houve redução linear no valor de N-ureico do leite, enquanto a resposta quadrática no N-ureico sanguíneo pode ser devido ao aumento de produção de leite em níveis intermediários de microalga, elevando a retirada de ureia da circulação sanguínea (DEPETERS e FERGUSON, 1992). Além disso, a redução nos valores de N-ureico sanguíneo e do leite é relacionada com melhor eficiência de utilização do nitrogênio para a produção de leite, concordando com a tendência encontrada para aumento na proporção N-leite/consumo de N (HUHTANEN et al., 2015).

Doses intermediárias de microalga aumentaram a produção de leite, a PLCG e a PLCE. O aumento na produção de leite pode ter sido ocasionado pela redução na gordura do leite, devido à redução na energia para produção do leite (MOALLEM et al., 2013). Ademais, a maior produção de leite pode ser relacionada a aumentos na DAT da MS, que elevaram o consumo de EL (KEADY et al., 2008; KHAN et al., 2015), apesar de não ser detectada diferença estatística nos consumos de ED, EM e EL. A maior

síntese de proteína microbiana, em doses intermediárias de microalga, por aumento no consumo de nutrientes digestíveis, também pode contribuir para a maior produção de leite. Na dose mais elevada de microalga testada neste estudo, a produção de leite provavelmente foi negativamente afetada como resultado de uma drástica redução no consumo de matéria seca. Esse resultado é similar ao encontrado por Sinedino et al. (2017), no qual houve aumento de 0,5 kg/d de leite ao se suplementar aproximadamente 4 g/kg MS de microalga na dieta.

A redução no teor de gordura do leite pela inclusão de microalga e ácidos graxos poli-insaturados de origem marinha tem sido relatada em diversos estudos (BOECKAERT et al., 2008; SINEDINO et al., 2017). Ácidos graxos poli-insaturados podem interferir no processo de biohidrogenação ruminal, elevando a concentração de ácidos graxos intermediários C18 de configuração *trans*, principalmente os derivados do metabolismo do ácido linoleico (BARLETTA et al., 2016). Como consequência, a síntese *de novo* de ácidos graxos de cadeia curta é inibida, por efeitos antilipogênicos de ácidos graxos *trans*, que reduzem a expressão de enzimas-chave do processo (ÂNGULO et al., 2012), levando à redução no teor de gordura do leite e aumento na proporção de ácidos graxos de cadeia longa (BAUMAN e GRIINARI, 2003). No entanto, ainda não é claro se o DHA ou algum de seus intermediários são responsáveis pelos efeitos negativos na biohidrogenação (ALDAI et al., 2018). A redução no acetato ruminal também merece destaque, já que a síntese *de novo* é estimulada pela concentração sanguínea de acetato, e sua redução também tem relação com a depressão da gordura do leite por óleos de origem marinha em ruminantes (URRUTIA e HARVATINE, 2017; FRUTOS et al., 2018).

Apesar do ácido graxo C18:2 *trans*-10, *cis*-12 ser o único inequivocadamente reconhecido como potente depressor da gordura do leite (BAUMGARD et al., 2000), este não foi detectado neste experimento. Outros estudos com óleos de origem marinha também relatam pouca relevância deste ácido graxo, indicando que outros ácidos, principalmente C18 *trans*, estão envolvidos neste tipo de depressão da gordura do leite (BOECKAERT et al., 2008; KAIRENIUS et al., 2015; ALTOMONTE et al., 2018). De acordo com Toral et al. (2010), os principais ácidos graxos envolvidos na depressão da gordura do leite induzida por microalgas em ruminantes são C18:2 *cis*-11, *trans*-9 e C18:1 *trans*-10. No entanto, metabólitos *trans*-10 não foram detectados nas circunstâncias deste experimento, provavelmente devido a seu baixo teor, enquanto não havia padrão para detecção de C18:2 *cis*-11, *trans*-9. Frutos et al. (2018) também não

reportam correlação entre a concentração ruminal de C18:1 *trans*-10 e redução do teor da gordura do leite induzida por microalga em ruminantes, o que indica que sua relevância para este quadro seja questionável.

A baixa transferência de DHA para a gordura do leite está relacionada com sua alta biohidrogenação ruminal e incorporação preferencial a ésteres de colesterol e fosfolípidios, limitando sua presença nos produtos de origem animal (BOECKAERT et al., 2007; CHILLIARD et al., 2007). A biohidrogenação do DHA pode ser elevada quando sua suplementação é realizada em conjunto com ácidos graxos poli-insaturados C18 (KAIRENIUS et al., 2018), que estavam presentes nas dietas experimentais por meio do grão de soja. Há poucos dados sobre a via de biohidrogenação do DHA, mas há evidências de que o DHA é saturado apenas a ácidos graxos de 22 carbonos, elevando seu teor na gordura do leite, sem quebras a ácidos graxos de 18 carbonos (ALDAI et al., 2018). Como resultado, houve aumento da proporção de C22:0 na gordura do leite pela suplementação de microalga na dieta. Além disso, a troca de grão de soja inteiro pela microalga alterou o perfil de ácidos graxos da dieta, reduzindo C18:1 *cis*-9, C18:2 *cis*-9,12, C18:3 *cis*-9,12,15 e ácidos graxos ômega-6 na gordura do leite.

Apesar da baixa detecção de DHA no leite, houve modificação do perfil de ácidos graxos da gordura do leite, com redução dos teores de ácidos graxos saturados e aumento de ácidos graxos poli-insaturados. Também houve aumento de CLA *cis*-9, *trans*-11 e C18:1 *trans*-11, ácidos graxos com efeitos benéficos potenciais à saúde humana. Considerando as recomendações atuais para substituição do consumo de ácidos graxos saturados por mono ou poli-insaturados (FAO, 2010), pode-se afirmar que a inclusão de microalga foi benéfica para a produção de leite com perfil mais desejável para consumo humano. A preocupação com doenças cardiovasculares e obesidade tem feito com que o consumo de leite integral seja reduzido em países em desenvolvimento, principalmente a partir da década de 70 até hoje (FAO, 2010; KLIEM e GIVENS, 2011), elevando-se o consumo de leite desnatado. Portanto, a melhora na qualidade do perfil de ácidos graxos no leite alcançada pelo fornecimento de microalgas se mostra vantajosa. No entanto, a pequena diferença alcançada no perfil do leite levaria a pouco aumento no consumo destes ácidos graxos, sendo incertas as implicações sobre a saúde humana (STERGIADIS et al., 2019).

Houve redução dos teores de proteína e lactose no leite com a inclusão de microalga, com tendência quadrática na produção destes sólidos. Outros autores, estudando a inclusão de microalgas ou óleo de peixe na dieta de vacas leiteiras, também

relatam alterações nos teores ou produção de proteína e lactose do leite (BOECKAERT et al., 2008; KAIRENIUS et al., 2015; SINEDINO et al., 2017; ALTOMONTE et al., 2018), sendo os resultados variáveis de acordo com diferentes níveis de inclusão e efeitos obtidos na produção de leite. Uma possível razão para a redução no teor de proteína é a deficiência em histidina relatada em certas microalgas, o que pode limitar a síntese de proteína na glândula mamária (LAMMINEN et al., 2017). A tendência à redução de concentração de glicose sérica pode se justificar pela redução no CMS, o que pode afetar o teor de lactose do leite. Estudos *in vitro* relatam interferência da concentração de glicose na síntese de lactose pela glândula mamária (LIN et al., 2016). No entanto, faltam estudos *in vivo* que comprovem a influência dos níveis sanguíneos de glicose sobre o teor de lactose do leite.

O aumento nos níveis séricos de colesterol está relacionado com maior DAT do EE com o aumento da inclusão de microalga, elevando sua absorção intestinal e a produção de lipoproteínas para seu transporte na circulação sanguínea (NOBLE, 1987). Aparentemente, o peso corporal também foi afetado pela inclusão de microalga, sendo que sua queda na dose 6 g/kg MS pode ser devido à redução no conteúdo do trato gastrointestinal, pelo menor CMS. A redução linear no consumo e excreção fecal de N se deve à redução do CMS, bem como as mudanças em relação à utilização de energia de manutenção e de lactação refletem os efeitos da adição de microalga sobre o peso corpóreo e a produção de leite.

Os resultados obtidos pelas curvas de regressão sugerem que as melhores doses de microalga para maximizar a produção de leite, também considerando a produção de sólidos, estão ao redor de 1,22 e 2,90 g/kg MS, representando os valores de máxima para as produções de LCG e leite, respectivamente. Surpreendentemente, a DAT de FDN e a síntese de proteína microbiana também tiveram o mesmo padrão de resposta da produção de leite. A dose máxima para a síntese de proteína microbiana foi próxima ao valor encontrado para produção de leite (3,24 vs. 2,90 g/kg MS); no entanto, o valor máximo para a DAT de FDN foi aproximadamente 1 g/kg MS maior do que o valor para produção de leite (4,13 vs. 2,90). Neste experimento, como esperávamos, a microalga afetou essas variáveis de maneira dose-dependente, e doses intermediárias foram eficientes para aumentar a produção de leite e de sólidos.

7 CONCLUSÃO

Doses intermediárias de microalga (entre 1,22 e 2,90 g/kg MS) podem ser utilizadas na dieta de vacas leiteiras para aumentar a produção de leite, a eficiência produtiva e o teor de ácidos graxos insaturados na gordura do leite. Entretanto, a redução nas variáveis de teor de gordura e eficiência de produção de LCG deve ser considerada.

8 REFERÊNCIAS

- ABUGHAZALEH, A. A.; JENKINS, T. C. Short communication: Docosahexaenoic acid promotes vaccenic acid accumulation in mixed ruminal cultures when incubated with linoleic acid. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 1047-1050, 2004.
- ABUGHAZALEH, A. A.; POTU, R.B.; IBRAHIM, S. Short communication: the effect of substituting fish oil in dairy cow diets with docosahexaenoic acid-micro algae on milk composition and fatty acids profile. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 6156-6159, 2009.
- ACIÉN, F. G.; FERNÁNDEZ, J. M.; MAGÁN, J. J.; MOLINA, E. Research review paper: Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 1344-1353, 2012
- ACIÉN, F. G.; MOLINA, E.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; BARBOSA, M.; GOUVEIA, L.; SEPÚLVEDA, C.; BAZAES, J.; ARBIB, Z. Economics of microalgae production. **Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts**, p. 485–503, 2017.
- ALDAI, N.; DELMONTE, P.; ALVES, S.; BESSA, R. J. B.; KRAMER, J. Evidence for the initial steps of DHA biohydrogenation by mixed ruminal microorganisms from sheep involves formation of conjugated fatty acids. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 66 n. 4, p. 842-855, 2018.
- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1598-1624, 2000.
- ALTOMONTE, I.; SALARI, F.; LICITRA, R.; MARTINI, M. Use of microalgae in ruminant nutrition and implications on milk quality – A Review. **Livestock Science**, v. 214, p. 25-35, 2018.
- ANGULO, J.; MAHECHA, L.; NUERNBERG, K.; NUERNBERG, G.; DANNENBERGER, D.; OLIVEIRA, M.; BOUTINAUD, M.; LEROUX, C.; ALBRECHT, E.; BERNARD, L. Effects of polyunsaturated fatty acids from plant oils and algae on milk fat yield and composition are associated with mammary lipogenic and SREBF1 gene expression. **Animal**, v. 6, p. 1961-1972, 2012.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 17th ed. Arlington, VA, EUA, 2000.
- ÄRÖLÄ, A.; SHINGFIELD, K. J.; VANHATALO, A.; TOIVONEN, V.; HUHTANEN, P.; GRIINARI, J. M. Biohydrogenation shift and milk fat depression in lactating dairy cows fed increasing levels of fish oil. **Journal of Dairy Science**, v. 85, Suppl .1, p. 143, 2002.
- BARLETTA, R.V.; GANDRA, J.R.; BETTERO, V.P.; ARAUJO, C.E.; DEL VALLE, T.A.; ALMEIDA, G.F.; FERREIRA DE JESUS, E.; MINGOTI, R.D.; BENEVENTO, B.C.; FREITAS JUNIOR, J.E.; RENNO, F.P. Ruminal biohydrogenation and abomasal flow of fatty acids in lactating cows: oilseed provides ruminal protection for fatty acids. **Animal Feed Science and Technology**, v. 219, p. 111-121, 2016.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v. 70, p. 15–29, 2001.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v. 23, p. 203-227, 2003.

BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; DWYER, D.; SÆBØ, A.; BAUMAN, D. E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **American Journal of Physiology**, v. 278, n. 1, R179–8, 2000.

BAZAN, N. G.; CALANDRIA, J. M.; SERHAN, C. N. Rescue and repair during photoreceptor cell renewal mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1. **The Journal of Lipid Research**, v. 51, p. 2018-2031, 2010.

BECKER, W. E. Micro-Algae as a Source of Protein. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 207-210, 2007.

BETTERO, V.P.; DEL VALLE, T.A.; BARLETTA, R.V.; ARAÚJO, C.E.; FERREIRA DE JESUS, E.; ALMEIDA, G.F.; TAKIYA, C.S.; ZANFERARI, F.; PAIVA, P.G.; FREITAS JÚNIOR, J.E.; RENNÓ, F.P. Protected fat sources reduce fatty acid biohydrogenation and improve abomasal flow in dry dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 224, p. 30-38, 2017.

BOECKAERT, C.; VLAEMINCK, B.; MESTDAGH, J.; FIEVEZ, V. In vitro examination of DHA-edible micro-algae: 1.Effect on rumen lipolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. **Animal Feed Science and Technology**, v. 136, n. 1, p. 63–79, 2007.

BOECKAERT, C.; VLAEMINCK, B.; DIJKSTRA, J.; ISSA-ZACHARIA, A.; VAN NESPEN, T.; VAN STRAALLEN, W.; FIEVEZ, V. Effect of dietary starch or micro algae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 4714–4727, 2008.

BOERMAN, J. P.; FIRKINS, J. L.; ST-PIERRE, N. R.; LOCK, A. L. Intestinal digestibility of long-chain fatty acids in lactating dairy cows: A meta-analysis and meta-regression. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 8889-8903, 2015.

BRADFORD, B. J.; HARVATINE, K. J.; ALLEN, M. S. Dietary unsaturated fatty acids increase plasma glucagon-like peptide-1 and cholecystokinin and may decrease premeal ghrelin in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1443–1450, 2008.

BRODERICK, G.A.; KANG, J.H. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid in vitro media. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 64-75, 1980.

BRODERICK, G.A.; CLAYTON, M.K. A statistical evaluation of animal and nutritional factors influencing concentrations of milk urea nitrogen. **Journal of Dairy Science**, v. 80, n. 11, p. 2964-2971, 1997.

BROOKES, K. J.; CHEN W.; XU, X.; TAYLOR, E.; ASHERSON, P. Association of fatty acid desaturase genes with attention-deficit/hyperactive disorder. **Biology Psychiatry**, v. 60, p. 1053–1061, 2006.

BURDGE, G. C.; WOOTTON, S. A. Conversion of α -linolenic acid to eicosapentaenoic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids in young women. **British Journal of Nutrition**, v. 88, p. 411–420, 2002.

CASALI, A.O.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. Influência do tempo de incubação e do tamanho de partículas sobre os teores de compostos indigestíveis em alimentos e fezes bovinas obtidos por procedimentos in situ. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 335-342, 2008.

CASPER, D.P.; SCHINGOETHE, D.J.; EISENBEISZ, W.A. Response of early lactation cows to diets that vary in ruminal degradability of carbohydrates and amount of fat. **Journal of Dairy**

Science, v. 73, p. 425-444, 1990.

CHEN, C. Y.; ZHAO, X.-Q.; YEN, H.-W.; HO, S.-H.; CHENG, C.-L.; LEE, D.-J.; BAI, F.-W.; CHANG, J.-S. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 78, p. 1– 10, 2013.

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

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 Technology**, v. 109, p. 828–855, 2007.

CHIZOTTI, M.L.; VALADARES, S.C.; VALADARES, R.F.D.; CHIZOTTI, F.H.M.; TEDESCHI, L.O. Determination of creatinine excretion and evaluation of spot urine sampling in Holstein cattle. **Livestock Production Science**, v. 113, p. 218-225, 2008.

CONTE, G.; DIMAURO, C.; SERRA, A.; MACCIOTTA, N. P. P.; MEL, J. A canonical discriminant analysis to study the association between milk fatty acids of ruminal origin and milk fat depression in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 7, p. 6497-6510, 2018.

DA SILVA, G. G.; FERREIRA DE JESUS, E.; TAKIYA, C. S.; DEL VALLE, T. A.; DA SILVA, T. H.; VENDRAMINI, T. H. A.; YU, E. J.; RENNÓ, F. P. Short communication: Partial replacement of ground corn with algae meal in a dairy cow diet: Milk yield and composition, nutrient digestibility, and metabolic profile. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 8880–8884, 2016.

DAVIS, C. L.; BROWNS, R. E. Low-fat milk syndrome. In **Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant**, ed. AT Phillipson, p. 545–65. Newcastle upon Tyne, UK: Oriel, 1970.

DEPETERS, E. J.; FERGUSON, J. D. Nonprotein nitrogen and protein distribution in the milk of cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3192-3209, 1992.

DEMAR, J. C. JR.; MA, K.; CHANG, L.; BELL, J. M.; RAPOPORT, S.I. α -Linolenic acid does not contribute appreciably to docosahexaenoic acid within brain phospholipids of adult rats fed a diet enriched in docosahexaenoic acid. **Journal of Neurochemistry**, v. 94, n. 4, p. 1063-1076, 2005.

DOMENICHIELLO, A. F.; KITSON, A. P.; BAZINET, R. P. Review: Is docosahexaenoic acid synthesis from α -linolenic acid sufficient to supply the adult brain? **Progress in Lipid Research**, v. 59, p. 54-66, 2015.

DOREAU, M.; CHILLIARD, Y. Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. **Reproduction Nutrition Development**, v. 37, n. 1, p. 113-124, 1997.

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

FAO. Fats and fatty acids in human nutrition – Report of an expert consultation. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, Roma, Itália, 2010.

FENG, S.; LOCK, A. L.; GARNSWORTHY, P. C. Technical note: A rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 11, p. 3785-3788, 2004.

FIEVEZ, V.; BOECKAERT, C.; VLAEMINCK, B.; MESTDAGH, J.; DEMEYER, D. In vitro examination of DHA-edible micro-algae: 2. Effect on rumen methane production and apparent digestibility of hay. **Animal Feed Science and Technology**, v. 136, n. 1, p. 80–95, 2007.

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

FRANKLIN, S. T.; MARTIN, K. R.; BAER, R. J.; SCHINGOETHE, D. J.; HIPPEN, A. R. Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 11, p. 2048-54, 1999.

FRUTOS, P.; TORAL, P. G.; BELENGUER, A.; HERVÁS, G. Milk fat depression in dairy ewes fed fish oil: Might differences in rumen biohydrogenation, fermentation, or bacterial community explain the individual variation? **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 7, p. 6122–6132, 2018.

FUJIHARA, S.; YAMAGUCHI, M. Effects of allopurinol 4-hydroxypyrazolo(3,4-d) pyrimidine on metabolism of allantoin in soybean plants. **Plant Physiology**, v. 62, n. 1, p. 134-138, 1978.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; FARIA FILHO, D. E. DE. Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal. In: BERCHIELI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, cap. 10, p. 299-322, 2011.

GANDRA, J. R.; BARLETTA, R. V.; MINGOTI, R. D.; VERDURICO, L. C.; FREITAS JUNIOR, J. E.; OLIVEIRA, L. J.; TAKIYA, C. S.; KFOURY JUNIOR, J. R.; WILTBANK, M. C.; RENNÓ, F. P. Effects of whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids on measures of cellular immune function of transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 4590-4606, 2016.

GANDRA, J. R.; VERDURICO, L. C.; MINGOTI, R. D.; TAKIYA, C. S.; GARDINAL, R.; VENDRAMINI, T. H. A.; BARLETTA, R. V.; VISINTIN, J. A.; RENNÓ, F. P. Whole flaxseed, raw soybeans, and calcium salts of fatty acids supplementation for transition cows: follicle development and embryo quality. **Italian Journal of Animal Science**, v. 16, p. 538-545, 2017.

GLOVER, K. E.; BUDGE, S.; ROSE, M.; RUPASINGHE, H. P. V.; MACLAREN, L.; GRENN-JOHNSON, J.; FREDEEN, A. H. Effect of feeding fresh forage and marine algae on the fatty acid composition and oxidation of milk and butter. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 6, p. 2797–2809, 2012.

GONZALEZ, S.; DUNCAN, S. E.; O'KEEFE, S. F.; SUMNER, S. S.; HERBEIN, J. H. Oxidation and textural characteristics of butter and ice cream with modified fatty acid profiles. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 70–77, 2003.

GONZALEZ-RONQUILLO, M.; BALCELLS, J.; GUADA, J. A.; VICENTE, F. V. Purine Derivative Excretion in Dairy Cows: Endogenous Excretion and the Effect of Exogenous Nucleic Acid Supply. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, 2003, p. 1282-1291, 2003.

GRIINARI, J. M.; DWYER, D. A.; MCGUIRE, M. A.; BAUMAN, D. E.; PALMQUIST, D. L.; NURMELA, K. V. V. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1251–1261, 1998.

HALL, M.B. Neutral detergent-soluble carbohydrates. **Nutritional relevance and analysis**. Gainesville: University of Florida, 76 p., 2000.

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

HARVATINE, K. J.; BOISCLAIR, Y. R.; BAUMAN, D. E. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. **Animal**, v. 3, n. 1, p. 40–54, 2009.

HE, M. L.; HOLLWICH, W.; RAMBECK, W.A. Supplementation of algae to the diet of pigs: a new possibility to improve the iodine content in the meat. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 86, n. 3-4, p. 97-104, 2002.

HENDRIX, D. L. Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant tissues. **Crop Science**, v. 33, p. 1306–1311, 1993.

HOLMAN, B. W. B.; MALAU-ADULI, A. E. O. Spirulina as a livestock supplement and animal feed. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 97, p. 615-623, 2013.

HUHTANEN, P.; KAUSTELL, K.; JAAKKOLA, S. The use of internal markers to predict total digestibility and duodenal flow of nutrients in cattle given six different diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, p. 211-227, 1994.

HUHTANEN, P.; CABEZAS-GARCIA, E. H.; KRIZSAN, S. J.; SHINGFIELD, K. J. Evaluation of between-cow variation in milk urea and rumen ammonia nitrogen concentrations and the association with nitrogen utilization and diet digestibility in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1-15, 2015.

JENKINS, T. J. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 3851-1863, 1993.

JENKINS, T. C.; HARVATINE, K. J. Lipid Feeding and Milk Fat Depression. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 30, n. 3, p. 623-642, 2014.

KAIRENIUS, P.; ÄRÖLÄ, A.; LESKINEN, H.; TOIVONEN, V.; AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P.; HURME, T.; GRIINARI, J. M.; SHINGFIELD, K. J. Dietary fish oil supplements depress milk fat yield and alter milk fatty acid composition in lactating cows fed grass silage-based diets. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 1–19, 2015.

KAIRENIUS, P.; LESKINEN, H.; TOIVONEN, V.; MUETZEL, S.; AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P.; WALLACE, R. J.; SHINGFIELD, K. J. Effect of dietary fish oil supplements alone or in combination with sunflower and linseed oil on ruminal lipid metabolism and bacterial populations in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 4, p. 1-15, 2018.

KEADY, T. W. J.; KILPATRICK, D. J.; MAYNE, C. S.; GORDON, F. J. Effects of replacing grass silage with maize silages, differing in maturity, on performance and potential concentrate sparing effect of dairy cows offered two feed value grass silages. **Livestock Science**, v. 119, n. 1-3, p. 1-11, 2008.

- KHAN, N. A.; YU, P.; ALI, M.; CONE, J. W.; HENDRIKS, W. H. Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 2, p. 238-252, 2015.
- KLIEM, K. E.; GIVENS, D. I. Dairy products in the food production chain: Their impact on health. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 2, p. 21-36, 2011.
- KOVAČ, D. J.; SIMEUNOVIĆ, J. B.; BABIĆ, O. B.; MIŠAN, A. Č., MILOVANOVIĆ, I. L. Algae in food and feed. **Food and Feed Research**, v. 40, p. 21-31, 2013.
- KRAMER, J. K. C.; FELLNER, V.; DUGAN, M. E.; SAUER, F. D.; MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, v. 32, n. 11, p. 1219-1228, 1997.
- KULPYS, J.; PAULAUSKAS, E.; PILIPAVIPIUS, V.; STANKEVIPIUS, R. Influence of cyanobacteria *Arthrospira* (*Spirulina*) *platensis* biomass additives towards the body condition of lactation cows and biochemical milk indexes. **Agronomy Research**, v. 7, p. 823-835, 2009.
- LAMMINEN, M.; HALMEMIES-BEAUCHET-FILLEAU, A.; KOKKONEN, T.; SIMPURA, I.; JAAKKOLA, S.; VANHATALO, A. Comparison of microalgae and rapeseed meal as supplementary protein in the grass silage based nutrition of dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 234, p. 295-311, 2017.
- LACOMBE, R. J. S.; CHOUINARD-WATKINS, R.; BAZINET, R. P. Brain docosahexaenoic acid uptake and metabolism. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 64, p. 109-134, 2018.
- LIN, Y.; Sun, X.; Hou, X.; Qu, B.; Gao, X.; Li, Q. Effects of glucose on lactose synthesis in mammary epithelial cells from dairy cow. **BioMed Central Veterinary Research**, 12:81, 2016.
- LOEB, J. Looking for alternative animal feeds. **Veterinary Record**, v. 183, p. 284-285, 2018.
- LOOR, J. J.; DOREAU, M.; CHARDIGNY, J. M.; OLLIER, A.; SEBEDIO, J. L.; CHILLIARD, Y. Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of trans-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage. **Animal Feed Science and Technology**, v. 119, p. 227-246, 2005.
- LUM, K. K.; KIM, J.; LEI, X. G. Dual potential of microalgae as a sustainable biofuel feedstock and animal feed. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 4, p. 53, 2013.
- MACHADO, M. G.; DETMANN, E.; MANTOVANI, H. C.; VALADARES FILHO, S. C.; BENTO, C. P. B.; MARCONDES, M. I.; ASSUNÇÃO, A. S. Evaluation of the length of adaptation period for changeover and crossover nutritional experiments with cattle fed tropical forage-based diets. **Animal Feed Science and Technology**, v. 222, n. 12, p. 132-148, 2016.
- MANSBRIDGE, R. J.; BLAKE, J. S. Nutritional factors affecting the fatty acid composition of bovine milk. **British Journal of Nutrition**, v. 78, p. 37-47, 1997.
- MARCHAN, L. F.; CHANG, K. L.; NICHOLS, P. D.; MITCHELL, W. J.; POLGLASE, J. L.; GUTIERREZ, T. Taxonomy, ecology and biotechnological applications of Thraustochytrids: a review. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 1, p. 26-46, 2018.
- MOALLEM, U.; SHAFRAN, A.; ZACHUT, M.; DEKEL, I.; PORTNICK, Y.; ARIELI, A. Dietary α -linolenic acid from flaxseed oil improved folliculogenesis and IVF performance in dairy cows, similar to eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids from fish oil. **Reproduction**, v. 146, p. 603-614, 2013.

MOATE, P. J.; WILLIAMS, S. R. O.; HANNAH, M. C.; ECKARD, R. J.; AULDIST, M. J.; RIBAU, B. E.; JACOBS, J. L.; WALES, W. J. Effects of feeding algal meal high in docosahexaenoic acid on feed intake, milk production, and methane emissions in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 3177-3188, 2013.

NOBLE, R. C. Digestion, transport and absorption of lipids. In: **Lipid Metabolism in Ruminant Animals**, p. 68-89 (W. W. Christie). Pergamon Press Ltd., Oxford, UK, 1987.

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

NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. National Academy Press, Washington, D.C. 2001.

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

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

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídios. In: BERCHIELI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP, cap. 10, p. 299-322, 2011.

PAPADOPOULOS, G.; GOULAS, C.; APOSTOLAKI, E.; ABRIL, E. Effects of dietary supplements of algae, containing polyunsaturated fatty acids, on milk yield and the composition of milk products in dairy ewes. **Journal of Dairy Research**, v. 69, n. 3, p. 357-365, 2002.

PATIL, V.; TRAN, K. Q.; GISELRØD, H. R. Towards sustainable production of biofuels from microalgae. **International Journal of Molecular Science**, v. 9, p. 1188-1195, 2008.

PAWLOSKY, R. J.; HIBBELN, J. R.; NOVOTNY, J. A.; SALEM, N. Jr. Physiological compartmental analysis of α -linolenic acid metabolism in adult humans. **Journal of Lipid Research**, v. 42, p. 1257-1265, 2001.

PIPEROVA, L. S.; TETER, B. B.; BRUCKENTAL, I. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat depressing diet. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2568-2574, 2000.

PIRONDINI, M.; COLOMBINI, S.; MELE, M.; MALAGUTTI, L.; RAPETTI, L.; GALASSI, G.; CROVETTO, G. M. Effect of dietary starch concentration and fish oil supplementation on milk yield and composition, diet digestibility, and methane emissions in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 357-372, 2015.

PRADO, L. A.; FERLAY, A.; NOZIÈRE, P.; SCHMIDELY, P. Predicting duodenal flows and absorption of fatty acids from dietary characteristics in ovine and bovine species: a meta-analysis approach. **Animal**, p. 1-13, 2018.

PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae – A review **Journal of Algal Biomass Utilization**, v. 3, n. 4, p. 89-100, 2012.

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

REILLING, A. E.; REYNOLDS, C. K. Feeding rumen-inert fats differing in their degree of saturation decreases intake and increases plasma concentrations of gut peptides in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 1506–1515, 2007.

REYNAL, S. M.; BRODERICK, G. A. Effect of dietary level of rumen-degraded protein on production and nitrogen metabolism in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 4045–4064, 2005.

REYNOLDS, C. K.; CANNON, V. L.; LOERCH, S. C. Effects of forage source and supplementation with soybean and marine algal oil on milk fatty acid composition of ewes. **Animal Feed Science and Technology**, v. 131, p. 333–357, 2006.

RIBEIRO, J. E. S.; MARTINI, M.; ALTOMONTE, I.; SALARI, F.; NARDONI, S.; SORCE, C.; DA SILVA, F. L. H.; ANDREUCCI, A. Production of *Chlorella protothecoides* biomass, chlorophyll and carotenoids using the dairy industry by-product scotta as a substrate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 207–213, 2017.

SAUERWALD, T. U.; HACHEY, D. L.; JENSEN, C. L.; CHEN, H.; ANDERSON, R. E.; HEIRD, W. C. Effect of dietary α -linolenic acid intake on incorporation of docosahexaenoic and arachidonic acids into plasma phospholipids of term infants. **Lipids**, v. 31, p. S131–S135, 1996.

SCHAUFF, D. J.; CLARK, J. H.; DRACKLEY, J. K. Effects of feeding lactating dairy-cows diets containing extruded soybeans and calcium salts of long-chain fatty-acids. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 3003–3019, 1992.

SHINGFIELD, K. J.; AHVENJÄRVI, S.; TOIVONEN, V.; ÄRÖLÄ, A.; NURMELA, K. V. V.; HUHTANEN, P.; GRIINARI, J. M. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. **Animal Science**, v. 77, p. 165–179, 2003.

SHINGFIELD, K. J.; REYNOLDS, C. K.; HERVÁS, G.; GRIINARI, J. M.; GRANDISON, A. S.; BEEVER, D. E. Examination of the Persistency of Milk Fatty Acid Composition Responses to Fish Oil and Sunflower Oil in the Diet of Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 714–732, 2006.

SHINGFIELD, K. J.; KAIRENIUS, P.; ÄRÖLÄ, A.; PAILLARD, D.; MUETZEL, S.; AHVENJÄRVI, S.; VANHATALO, A.; HUHTANEN, P.; TOIVONEN, V.; GRIINARI, J. M.; WALLACE, J. W. Dietary Fish Oil Supplements Modify Ruminant Biohydrogenation, Alter the Flow of Fatty Acids at the Omasum, and Induce Changes in the Ruminant Butyrate-producing Population in Lactating Cows. **The Journal of Nutrition**, v. 142, n. 8, p. 1437–48, 2012.

SILVESTRE, F. T.; CARVALHO, T. S. M.; FRANCISCO, N.; SANTOS, J. E. P.; STAPLES, C. R.; JENKINS, T. C.; THATCHER, W. W. Effects of differential supplementation of fatty acids during the peripartum and breeding periods of Holstein cows: I. Uterine and metabolic responses, reproduction, and lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 189–204, 2011.

SIMOPOULOUS, A. P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: Nutrient implications for chronic diseases. **Biomedical Pharmacother**, v. 60, p. 502–507, 2006.

SINEDINO, L. D. P.; HONDA, P. M.; SOUZA, L. R. L.; LOCK, A. L.; BOLAND, M. P.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Effects of supplementation with docosahexaenoic acid on reproduction of dairy cows. **Reproduction**, v. 153, p. 707–723, 2017.

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

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 101, p. 87-96, 2006.

STAMEY, J.A.; SHEPHERD, D. M.; DE VETH, M. J.; CORL, B. A. Use of algae or algal oil rich in n-3 fatty acids as a feed supplement for dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 5269-5275, 2012.

STERGIADIS, S.; BERLITZ, C. B.; HUNT, B.; GARG, S.; IAN GIVENS, D.; KLIEM, K. E. An update to the fatty acid profiles of bovine retail milk in the United Kingdom: Implications for nutrition in different age and gender groups. **Food Chemistry**, v. 276, p. 218-230, 2019.

STOKES, R. S.; VAN EMON, M. L.; LOY, D. D.; HANSEN, S. L. Assessment of algae meal as a ruminant feedstuff: Nutrient digestibility in sheep as a model species. **Journal of Animal Science**, v. 9, p. 5386–5394, 2015.

TAKIYA, C. S.; CALOMENI, G. D.; SILVA, T. H.; VENDRAMINI, T. H. A.; SILVA, G. G.; CONSENTINI, C. E. C.; BERTONI, J. C.; ZILIO, E. M. C.; RENNO, F. P. Increasing dietary doses of an *Aspergillus oryzae* extract with alpha-amylase activity in nutrient digestibility and ruminal fermentation of lactating dairy cows. **Animal Feed Science and Technology**, v. 228, p. 159-167, 2017.

TORAL, P. G.; HERVÁS, G.; GÓMEZ-CORTÉS, P.; FRUTOS, P.; JUÁREZ, M.; DE LA FUENTE, M. A. Milk fatty acid profile and dairy sheep performance in response to diet supplementation with sunflower oil plus incremental levels of marine algae. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 1655–1667, 2010.

TORAL, P. G.; BERNARD, L.; BELENGUER, A.; ROUEL, J.; HERVÁS, G.; CHILLIARD, Y.; FRUTOS, P. Comparison of ruminal lipid metabolism in dairy cows and goats fed diets supplemented with starch, plant oil, or fish oil. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 1, p. 1-16, 2016.

TORAL, P. G.; HERVÁS, G.; CARREÑO, D.; LESKINEN, H.; BELENGUER, A.; SHINGFIELD, K. J.; FRUTOS, P. In vitro response to EPA, DPA, and DHA: Comparison of effects on ruminal fermentation and biohydrogenation of 18-carbon fatty acids in cows and ewes. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 6187–6198, 2017.

TORAL, P. G.; HERVÁS, G.; LESKINEN, H.; SHINGFIELD, K. J.; FRUTOS, P. In vitro ruminal biohydrogenation of eicosapentaenoic (EPA), docosapentaenoic (DPA), and docosahexaenoic acid (DHA) in cows and ewes: Intermediate metabolites and pathways. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 7, p. 6109–6121, 2018.

TYRRELL, H. F.; REID, J. T. Prediction of the energy value of cow's milk. **Journal of Dairy Science**, v. 48, p. 1215–1223, 1965.

UNDERSANDER, D.; MERTENS, D. R.; THEIX, N. **Forage Analysis**. Omaha: National Forage Testing Association, 139 p, 1992.

URRUTIA, N. L.; HARVATINE, K. J. Acetate Dose-Dependently Stimulates Milk Fat Synthesis in Lactating Dairy Cows. **The Journal of Nutrition**, v. 147, n. 5, p. 763-769, 2017.

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

VAN EMON, M. L.; LOY, D. D.; HANSEN, S. L. Determining the preference, in vitro digestibility, in situ disappearance, and grower period performance of steers fed a novel algae meal derived from heterotrophic microalgae. **Journal of Animal Science**, v. 93, p. 3121-3129, 2015.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2nd ed. Cornell University Press, Ithaca, NY, 1994.

VENCKUS, P.; KOSTKEVIČIENĖ, J.; BENDIKIENĖ, V. Green algae *Chlorella vulgaris* cultivation in municipal wastewater and biomass composition. **Journal of Environmental Engineering and Landscape Management**, v. 25, p. 56-63, 2017.

VLAEMINCK, B.; MENGISTU, G.; FIEVEZ, V.; DE JONGE, L.; DIJKSTRA, J. Effect of in vitro docosahexaenoic acid supplementation to marine algae-adapted and unadapted rumen inoculum on the biohydrogenation of unsaturated fatty acids in freeze-dried grass. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1122-1132, 2008.

WELD, K. A.; ARMENTANO, L. E. The effects of adding fat to diets of lactating dairy cows on total-tract neutral detergent fiber digestibility: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 1-14, 2017.

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