UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

MAURICIO XAVIER DA SILVA OLIVEIRA

**Suplementação com fontes de ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 em vacas
lactantes: efeito sobre a produção e composição do leite**

Pirassununga
2019

MAURICIO XAVIER DA SILVA OLIVEIRA

**Suplementação com fontes de ômega-6 e ômega-3 em vacas lactantes: efeito
sobre a produção e composição do leite**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e produtividade animal

Orientador: Prof. Dr. Arlindo Saran Netto

Pirassununga

2019

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

0058s Oliveira, Mauricio
 Suplementação com fontes de ácidos graxos ômega-6
 e ômega-3 em vacas lactantes: efeito sobre a produção
 e composição do leite / Mauricio Oliveira ;
 orientador Arlindo Saran Netto. -- Pirassununga,
 2019.
 49 f.

 Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação
 em Zootecnia) -- Faculdade de Zootecnia e
 Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

 1. Nutrição. 2. Ruminantes. 3. Ômega-3. 4. Alimento
 saudável. 5. Saúde. I. Saran Netto, Arlindo,
 orient. II. Título.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais e avó, Tania Xavier, Josué Oliveira e Marinalva Xavier, que sempre me apoiaram e aos quais devo esta e muitas outras conquistas.

A minha irmã Manoela pela inspiração em almejar um futuro melhor.

Aos meus tios e tias, amigos e demais familiares por todo apoio.

Dedico inteiramente esta conquista a vocês!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a Deus e a Universidade de São Paulo pela oportunidade de expandir meus conhecimentos e contribuir com o corpo de conhecimento nas áreas de Zootecnia.

Ao meu orientador prof. Arlindo Saran Netto por acreditar em mim e me oferecer esta oportunidade.

Aos meus colegas de pós-graduação e agora meus amigos André, Bárbara e Thiago Nishmura. Aos alunos de graduação e agora afilhados Fabiana, Camila, Alessandra, Oswaldo, Erica, Ana Rita e Mariana.

A minha família pelo apoio incondicional.

As minhas amigas Hortência, Mariana e Patrícia por terem se tornado parte importante da minha vida em Pirassununga.

Ao professor Paulo Mazza por ser uma grande inspiração e por ter me ensinado estatística.

Aos senhores Paulo, Tadeu, Wilson, Coelho, João, Valmir e André por todo auxílio durante o período experimental.

A todos outros e outras que contribuíram de alguma maneira para a realização desse sonho.

Muito obrigado por tudo!

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos”.
(Paulo Beleki)”

RESUMO

OLIVEIRA, M. X. S. **Suplementação com fontes de ômega-6 e ômega-3 em vacas lactantes: efeito sobre a produção e composição do leite**. 2019. 52 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2019.

Objetivou-se avaliar o efeito da inclusão de óleo de soja e óleo de linhaça na dieta de vacas em lactação sobre a produção, composição de leite e parâmetros sanguíneos. Foram utilizadas 18 vacas de raça Holandês, com produção média de 25 ± 4 kg/dia em 153 ± 62 dias em lactação. As vacas foram distribuídas em delineamento quadrado latino, com 6 quadrados contemporâneos, 3 períodos e 3 tratamentos e arraçoadas de acordo com os seguintes tratamentos: 1) Controle (CT): sem adição de óleo; 2) Óleo de Soja (OS): 5% de adição de óleo de soja no concentrado como fonte de ômega-6 (% MS); 3) Óleo de Linhaça (OL): 5% de adição de óleo de linhaça no concentrado como fonte de ômega-3 (% MS). A produção de leite não foi alterada mas a suplementação com óleo diminuiu o consumo de matéria em 1.93 kg/dia/vaca. A produção de gordura foi significativamente menor quando as vacas receberam suplementação com óleo vegetal (3,37, 2,75 e 2,89 % para CT, OS e OL, respectivamente). No entanto, ambos os óleos de soja e linhaça diminuíram a concentração de ácidos graxos saturados (65,72, 54,09 e 54,26 para CT, OS e OL respectivamente) e aumentaram a quantidade de ácidos graxos insaturados no leite (34,24, 45,91 e 45,74 para CT, OS e OL respectivamente) e diminuíram a relação entre os ácidos graxos saturados/insaturados (18,28, 10,41 e 4,52 para CT, OS e OL respectivamente). Além disso, o óleo de soja e de linhaça aumentaram significativamente a teor de ácidos graxos mono (24.95, 30.89 e 31.61%, para CT, OS e OL respectivamente) e poli-insaturados (2,4, 3,0 e 2,97 para CT, OS e OL respectivamente) na gordura do leite. As variáveis sanguíneas aspartato aminotransferase, gama glutamil transferase, ureia, albumina, creatinina e proteínas totais não foram alteradas. Por outro lado, o colesterol total, HDL e LDL foi maior no

grupo suplementado com os óleos vegetais. A suplementação com óleos vegetais ocasionou diminuição do consumo de matéria seca, melhorou relação $\omega 6/\omega 3$ do leite, sem alterar profundamente as variáveis sanguíneas de vacas lactantes.

Palavras-chave: alimento funcional, gordura, perfil lipídico, ruminantes, saudável

ABSTRACT

OLIVEIRA, M. X. S. **Supplementation with sources of omega-6 and omega-3 in lactating cows: effect on milk production and composition.** 2019. 52 f. Dissertation (Master degree) - Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2019.

The use of polyunsaturated oils in the ruminant diet has been shown to be an efficient alternative to improve the lipid composition of cows' milk, aiming to improve human health. The objective of this study was to evaluate the effect of soybean oil and linseed oil in the diet of lactating cows on the production, milk composition and blood parameters. 18 Holstein cows were used, with a mean production of 25 ± 4 kg / day in 153 ± 62 days in lactation. Animals were distributed in a Latin square design, with 6 contemporary squares, 3 periods and 3 treatments, and ratified according to the following treatments: 1) Control (CT): without addition of oil; 2) Soybean oil (SO): 5% addition of soybean oil in the concentrate as a source of omega-6 (% DM); 3) Flaxseed oil (FO): 5% addition of linseed oil in the concentrate as a source of omega-3 (% DM). Milk yield was not altered but the supplementation with oil decreased the DM intake by 1.93 kg/day. Fat production was significantly lower when cows were supplemented with vegetable oil (3.37, 2.75 and 2.89% for CT, SO and LO, respectively). However, both soybean and linseed oils decreased the concentration of saturated fatty acids (65.72, 54.09 and 54.26 for CT, SO and LO respectively) and increased the amount of unsaturated fatty acids in milk (34.24, 45.91 and 45.74) and decreased the relationship between saturated / unsaturated fatty acids (18.28, 10.41 and 4.52). In addition, soybean and flaxseed oil increased significantly in monounsaturated fatty acids (24.95, 30.89 and 31.61% for CT, SO and LO respectively) and polyunsaturated fatty acids (2.4, 3.0 and 2.97) in milk fat. Blood variables aspartate aminotransferase, gamma glutamyl transferase, urea, albumin, creatinine and total proteins were not altered. On the other hand, total cholesterol, HDL and LDL were higher in the group supplemented with vegetable oils.

Supplementation with vegetable oils caused a reduction in dry matter intake, improved n-6/n-3 ratio of milk, without profoundly altering the blood variables of lactating cows.

Keywords: functional food, fat, lipid profile, ruminants, healthy

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ingredientes e composição das dietas experimentais.....	30
Tabela 2 - Esquema de análise de variância para delineamento em quadrado latino replicado.....	35
Tabela 3 - Efeito da inclusão de óleo de soja linhaça na dieta de vacas em lactação sobre a produção e composição do leite de vacas.	38
Tabela 4 - Efeito da inclusão de óleo de soja e linhaça na dieta de vacas em sobre o perfil de ácidos graxos do leite (%).	40
Tabela 5 - Efeito da inclusão de óleo de soja e linhaça na dieta de vacas em lactação sobre a qualidade nutricional da fração lipídica do leite (%).	41
Table 6 - Efeito da inclusão de óleo de linhaça e soja na dieta de vacas em lactação sobre alguns componentes sanguíneos.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácido graxo
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
AGCL	Ácido graxo de cadeia longa
AGCM	Ácido graxo de cadeia média
AGI	Ácido graxo insaturado
AGMI	Ácido graxo monoinsaturados
AGNE	Ácidos graxos não esterificados
AGPI	Ácido graxo poliinsaturados
AGS	Ácido graxo saturado
AST	Aspartato aminotransferase
CCS	Contagem de células somáticas
CNF	Carboidrato não fibroso
CT	Carboidrato total
GB	Gordura bruta
EE	Extrato etéreo
ESD	Extrato seco desengordurado
FDA	Fibra em detergente ácido
FDN	Fibra em detergente neutro
LACT	Lactose
MM	Matéria mineral
MO	Matéria orgânica
MS	Matéria seca
NDT	Nutrientes digestíveis totais
N-Ureico	Nitrogênio ureico
NUL	Nitrogênio ureico do leite
PB	Proteína bruta
PL	Produção de leite
PLC	Produção de leite corrigida para 4,0%
ST	Sólidos totais

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Revisão de Literatura.....	16
2.1 - Consumo de ômega 3 e ômega 6: funcionalidade e efeitos medicinais	16
2.2 - Utilização de óleos na dieta de ruminantes sob o metabolismo de lipídeos no rúmen	19
2.3 - Absorção Intestinal de lipídeos em ruminantes.....	21
2.4 - Síntese de gordura no leite	22
2.5 - Biohidrogenação ruminal e depressão da gordura no leite.....	23
2.6 - Fontes de óleo na dieta de ruminantes.....	25
2.6.1. Óleo de soja	25
2.6.2. Óleo de linhaça	26
3. HIPÓTESE	27
4. OBJETIVOS.....	28
5. Material e Métodos.....	29
5.1 - Local Experimental.....	29
5.2 - Animais e manejo diário	29
5.3 - Tratamentos experimentais.....	29
5.4 - Delineamento experimental.....	31
5.5 – Coleta de dados	31
5.5.1 -Dieta.....	31
5.5.2 -Leite	32
5.5.3 - Sangue	34
5.6 – Análise estatística.....	34
6. RESULTADOS e DISCUSSÃO	36
6.1 - Produção e composição do leite.....	36
6.2 – Perfil da gordura do leite	38
6.2 – Perfil metabólico	43
7. CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1. INTRODUÇÃO

Historicamente, o principal objetivo de pesquisas na área agrícola tem sido o aumento do rendimento e a eficiência produtiva de produtos de origem animal, com menor atenção dada à melhoria do perfil nutricional dos alimentos produzidos. De acordo com Lock e Bauman (2004), o aumento da conscientização dos consumidores sobre os potenciais benefícios para a saúde de vários microcomponentes nos alimentos deu origem ao conceito de alimentos funcionais e ajudou a criar uma demanda por alimentos com perfil nutricional mais saudável. Assim, cientistas estão interessados em pesquisas e práticas agrícolas que possam aprimorar o perfil nutricional de produtos alimentares. Um desses exemplos é a indústria de laticínios e seus recentes esforços para tornar a composição da gordura do leite mais saudável para o consumo humano (BAUMAN et al., 2011).

A alimentação saudável é um desafio para o homem moderno e uma preocupação de grande parte da população. Doenças cardiovasculares são consideradas os principais problemas de saúde pública em função da redução da qualidade de vida e grande dispêndio financeiro, além de serem responsáveis por cerca de 30% do total de mortes no Brasil (MANSUR e FAVORATO, 2012). Neste contexto, existe uma grande distribuição de óleos e gorduras no reino animal e vegetal direcionadas para consumo humano, que tem sido causa e ao mesmo tempo solução para doenças cardíacas. Desta forma, uma das principais preocupações atual refere-se à proporção do consumo entre ácidos graxos (AG) de família ômega-6 e ômega-3, devido ao seu desequilíbrio na alimentação do homem moderno (MANSUR e FAVORATO, 2012; PERINI, 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS), juntamente à Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), recomendam ingestão de AG ômega-6 e ômega-3 na razão de 5:1 até 10:1. Contudo, em dietas ocidentais (que tipicamente apresentam grande quantidade de produtos industrializados e óleos refinados, além do baixo consumo de alimentos de origem vegetal, pescados e frutos do mar), esta proporção ocorre na ordem de 20:1, chegando até 50:1. Estudos recentes

demonstram que este desequilíbrio é extremamente prejudicial à saúde do homem, pois relaciona-se com maior incidência de doenças cardíacas e câncer (Petit, 2001).

Ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 precisam estar presentes na dieta, uma vez que o ser humano não é capaz de sintetizar tais nutrientes em quantidade suficiente para o bom funcionamento do organismo (PATTERSON et al., 2011). Atualmente recomenda-se aumento da ingestão de alimentos fontes de ômega-3, como linhaça, canola, algas marinhas e peixes de água fria. No entanto, estes são mais onerosos e não são encontrados no comércio com a mesma facilidade que os alimentos fontes de ômega-6 (óleos vegetais como milho e soja). Portanto, pesquisas que desenvolvam produtos com menor relação ômega-6/ômega-3, ou que modifiquem a relação dos produtos normalmente consumidos pelo homem moderno, possuem o potencial de melhorar a nutrição humana e diminuir a incidência de doenças cardíacas, desde que estes produtos sejam acessíveis aos consumidores (PATTERSON et al., 2011).

Ácidos graxos de família ômega-3 são tipicamente encontrados em pequenas quantidades no leite bovino, devido à biohidrogenação ruminal de ácidos graxos poliinsaturados dietéticos. No entanto, com utilização de dietas com alta quantidade de óleos vegetais, pode ser possível alterar a composição de ácidos graxos da gordura do leite, tornando a proporção de ácidos graxos ômega-6/ômega-3 mais desejável, diminuindo o teor de ácidos graxos ômega-6 que normalmente já são consumidos em excesso e aumentando a proporção de ácidos graxos ômega-3 que tradicionalmente são consumidos em menores quantidades (SHINGFIELD et al., 2008).

A principal fonte de ácidos graxos insaturados são os óleos vegetais, tais como a soja, milho, girassol e linhaça. Estes óleos são adicionados na alimentação de ruminantes com o intuito principal de aumentar a densidade de energia da ração, apesar de indiretamente também promover uma melhora na proporção de ácidos graxos insaturados no leite e na carne (TSIPLAKOU E ZERVAS, 2013).

Objetivou-se com este estudo avaliar o efeito da inclusão de óleo de soja, como fonte de AG ômega-6, e óleo de linhaça como fonte de AG ômega-3, na dieta de vacas em lactação sobre a produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite, e parâmetro sanguíneos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Consumo de ômega 3 e ômega 6: funcionalidade e efeitos medicinais

O ser humano tem modificado seus hábitos alimentares ao longo de sua escala evolutiva, desde caçador nômade até sua formação a agricultor e produtor de alimentos. De acordo com Eaton et al. (1998), a natureza disponibilizava de forma natural para o consumo humano alimentos com relações equilibradas em ômega-6 e ômega-3 na ordem de 2:1 a 3:1, graças ao alto consumo de vegetais (sementes, folhas, frutas e raízes), assim como produtos marinhos, que apresentam adequadas concentrações de ômega-3.

Segundo Mezomo (2002), após a revolução industrial, ocorrida século XX, o desequilíbrio dietético de ômega-6 e ômega-3 tornou-se crítico, devido ao surgimento de alimentos processados e a hidrogenação de óleos vegetais, que reduziram ainda mais o consumo de ácidos ômega-3, ao mesmo tempo que aumentou o conteúdo de ácidos ômega-6 em nossas dietas. O mesmo autor afirma que diante das facilidades que a indústria alimentícia provê, associada à falta de tempo do homem moderno e a praticidade em os alimentos industrializados são fornecidos, é possível delinear novos hábitos alimentares na sociedade moderna. Especialmente em comunidades ocidentais, a FAO estima que as proporções médias de ômega-6 e ômega-3 situa-se em torno de 20:1 a 25:1, havendo relatos de 50:1. Esse valores diferem do consumo de nossos antepassados e das recomendações atuais, que são de 5:1 a 10:1, respectivamente.

De acordo com Perini et al. (2010), existe uma grande distribuição de óleos e gorduras no reino animal e vegetal direcionados para o consumo humano. No entanto, a preocupação atual refere-se à proporção de ingestão entre as gorduras da família ômega-6 e ômega-3, devido ao seu desequilíbrio na alimentação do homem moderno.

Os ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 são considerados essenciais, pois os humanos, assim como outras espécies de mamíferos, não podem sintetizá-los, deste modo, precisam obtê-los via dieta (BRENNER, 1987). De acordo com Fagundes

(2002), humanos podem converter o ácido linoléico (LA, ômega-6) em ácido araquidônico (AA, C20:4, ômega-6), e o ácido alfa-linoléico (ALA, ômega-3) em ácido eicosapentaenóico (EPA, C20 : 5, ômega-3) e ácido docosaenóico (DHA, C 22 : 6, ômega-3).

No metabolismo humano, os ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 competem pelas mesmas enzimas durante as reações de dessaturação e alongamento da cadeia carbônica, influenciando o produto final desses ácidos graxos. Apesar dessas enzimas terem maior afinidade pelos ácidos ômega-3, a conversão do ALA (pertencente à família ômega-3) em EPA e DHA é fortemente influenciada pelos níveis de LA (pertencente à família ômega-6) na dieta. Portanto, uma maior ingestão de ácidos graxos ômega-6 prejudica os processos metabólicos do ômega-3, reduzindo a possibilidade desta classe ácido ser metabolizado e portando de desenvolver seu papel biológico (MARTIN et al., 2006).

Os ácidos graxos da família ômega-6 são precursores de eicosanoides inflamatórios. Quando ingeridos em excesso, aumentam a ocorrência de doenças cardíacas e inflamatórias, causando aumento da pressão arterial, elevação das taxas de triglicerídeos (TG), estando ainda relacionados à ocorrência de artrite e câncer (PATTERSON et al. 2011). Por outro lado, os ácidos graxos da família ômega-3 possuem função anti-inflamatória, além de serem antitrombóticos, antiarrítmicos e capazes de reduzir os lipídeos sanguíneos, possuindo ainda propriedades vasodilatadoras. Esses efeitos estão associados à menor ocorrência de doenças cardíacas, hipertensão, diabetes *mellitus* tipo 2 e artrite reumatóide (FAGUNDES, 2002).

Os ácidos graxos ômega-3, EPA e DHA, desempenham um papel fundamental na composição das membranas celulares, regulam processos de sinalização celular e expressão de genes, incluindo genes anti-inflamatórios. Estudos sugerem que o EPA e DHA estão relacionados com a prevenção de diversas doenças crônicas, como doenças coronárias, diabetes, artrite, câncer, osteoporose, Alzheimer, entre outras (PERINI et al., 2010).

Nos últimos anos, as investigações científicas têm comprovado que as dietas com quantidades adequadas de AGPI n-3 e AGPI n-6 desempenham papel importante

na prevenção de doenças cardiovasculares e aterosclerose, doenças inflamatórias crônicas, inibição da vasoconstrição e agregação plaquetária, no crescimento fetal e desenvolvimento neural, ação anti-inflamatória e antitrombótica, ação sobre a prevenção do câncer e participação nas funções imunomoduladoras. Baixas concentrações ou ausência desses componentes aceleram o processo de envelhecimento e aumentam a probabilidade de desenvolvimento de várias doenças degenerativas e cardiovasculares (FAGUNDES, 2002; MARTIN et al., 2006; PERINI, 2010).

Constata-se, a partir da revisão de literatura realizada, que a necessidade de aumento da concentração de ácidos ômega-3 na alimentação humana é ponto consensual no meio científico.

2.2 - Utilização de óleos na dieta de ruminantes sob o metabolismo de lipídeos no rúmen

O termo "lipídeo" refere-se a uma ampla variedade de substâncias que possuem diferentes características, mas que apresentam como ponto em comum a insolubilidade em água ou outros solventes aquosos, e solubilidade em solventes orgânicos, tais como éter, clorofórmio, hexano, acetona e certos álcoois. A maioria das forragens, grãos e subprodutos contém certa quantidade de lipídeos. As principais classes de lipídeos presentes na nutrição das vacas leiteiras são triglicerídeos, glicolipídeos e fosfolipídeos (DRACKLEY, 2004).

O metabolismo ruminal de lipídeos tem grande impacto no perfil de AG disponíveis para absorção e deposição nos tecidos e no leite. As duas principais modificações ocorridas em lipídeos no rúmen são a hidrólise das ligações ésteres entre glicerol e ácidos graxos e a biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados (AGI) (BAUMAN E GRIINARI., 2002).

A hidrólise das ligações ésteres dos triglicerídeos, fosfolipídeos e glicolipídeos no rúmen é realizado principalmente por enzimas lipases produzidas por bactérias ruminais. A extensão da hidrólise é geralmente alta (>85%), e existe uma série de fatores que afetam a taxa e a extensão da hidrólise, como digestibilidade do alimento utilizado e dos efeitos da adição da gordura sobre o consumo, fermentação ruminal e da digestibilidade dos outros componentes da dieta (LOCK e BAUMAN, 2004). As ligações entre o glicerol e os ácidos graxos são desfeitas para dar origem a um glicerol e a três ácidos graxos. O glicerol é fermentado rapidamente em ácidos graxos de cadeia curta, enquanto cerca de 15% dos ácidos graxos são usados por bactérias para a síntese de fosfolipídeos (componentes de suas membranas celulares) e 85% segue para o abomaso (PALMQUIST AND JENKINS, 2016).

A outra ação dos microrganismos ruminais, é a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados. Durante a biohidrogenação, os ácidos graxos insaturados tornam-se saturados, ou menos insaturados, porque uma ligação dupla entre carbonos é substituída por dois átomos de hidrogênio. Por exemplo, a biohidrogenação converte o ácido oleico (18:1) em ácido esteárico (18:0). Os AG livres no rúmen tendem a se

unir às partículas de alimentação de forma a impedir a fermentação microbiana, especialmente dos carboidratos fibrosos. Esta inibição pode ser em razão do efeito da gordura sobre as fibras, impedindo a aderência bacteriana e o acesso das enzimas fibrolíticas ao seu substrato, ou ainda, a um efeito tóxico dos AG insaturados sobre as células bacterianas (KOZLOSKI, 2002). A biohidrogenação é uma forma de defesa natural dos microrganismos ruminais contra a toxicidade dos AG insaturados, os quais convertem a gordura insaturada em saturada, que é menos tóxica à microflora ruminal.

Os fosfolipídeos microbianos compõem 10 a 15% dos lipídeos que deixam o rúmen, os restantes 85 a 90% são AG, em sua maioria saturados, encontrados principalmente na forma de ácidos palmíticos e esteáricos ligados a alimentos e partículas microbianas.

O excesso de lipídeos na dieta de ruminantes (igual ou 6% na MS, (PALMQUIST AND JENKINS, 2017)) pode apresentar efeito negativo sobre o consumo de matéria seca, na produção de leite e na porcentagem de gordura do leite. Em concentrações adequadas, os lipídeos são utilizados em dietas de ruminantes principalmente como fonte de energia. Este nutriente apresenta alta eficiência metabólica por conter grande quantidade de energia bruta (9,4 Kcal/g).

De acordo com Chilliard et al. (1997), a suplementação lipídica é uma interessante alternativa para aumentar a densidade energética das dietas e, consequentemente, reduzir a utilização e os efeitos prejudiciais de altas quantidades de concentrados ricos em amido sobre o ambiente ruminal, principalmente em vacas em lactação. Ademais, os lipídeos tem a capacidade de aumentar a absorção de vitaminas lipossolúveis e fornecer ácidos graxos essenciais importantes na composição de membranas de tecidos e principalmente, atuar como precursores para a regulação do metabolismo (PALMQUIST, 2006).

2.3 - Absorção Intestinal de lipídeos em ruminantes

Os fosfolipídeos microbianos são digeridos no intestino delgado e contribuem para a associação de ácidos graxos livres que são absorvidos através da parede intestinal. A bile secretada pelo fígado e o suco pancreático (rico em enzimas e bicarbonato) são misturados com o conteúdo do intestino delgado. Essas secreções são essenciais para preparar os lipídeos para absorção formando partículas miscíveis com água, chamadas micelas, que podem ser absorvidas pelas células intestinais. Nas células intestinais, uma grande porção de ácidos graxos está ligada ao glicerol para formar triglicerídeos. Os triglicerídeos, alguns ácidos graxos livres, colesterol e outras substâncias semelhantes a lipídeos são revestidos com proteínas para formar lipoproteínas ricas em triglicerídeos, também chamado de quilomícrons, ou lipoproteínas de baixíssima densidade. As lipoproteínas entram nos vasos linfáticos e circulam para o ducto torácico (a junção do sistema linfático com o sistema sanguíneo) onde entram na corrente sanguínea. Em contraste com a maioria dos nutrientes absorvidos pelo trato gastrointestinal, os lipídeos absorvidos entram na circulação geral diretamente e são usados por todos os tecidos do corpo sem um processamento preliminar pelo fígado. (KOZLOSKI, 2002; DRACKLEY, 2004; PALMQUIST, 2006).

2.4 - Síntese de gordura no leite

A gordura do leite consiste em gotículas de TG que estão revestidas com membrana celular das células secretoras de gordura. Assim, 96-98% da gordura do leite é composta por triglicerídeos com o restante representando principalmente por pequenas quantidades de fosfolípidos e colesterol encontrados na membrana dos glóbulos de gordura do leite. Os TG compreendem mais de 400 tipos de AG, uma grande porção destes são intermediários de biohidrogenação produzidos durante o metabolismo lipídico no rúmen (LOCK E BAUMAN, 2004).

Os AG que compõem os TG do leite são derivados de duas fontes: 1) da síntese *de novo* 2) AG absorvidos da dieta. Os substratos para a síntese *de novo* são o acetato e o beta-hidroxibutirato derivados da digestão de fibras do rúmen. Eles são utilizados pelas células epiteliais da glândula mamária para sintetizar AG de cadeia curta e média (4:0 a 14:0) e uma porção dos AG de 16 carbonos. A absorção mamária de AG da circulação de cadeia longa fornece a outra porção dos AG de 16 carbonos e todos os AG de cadeia longa, tendo como origem a absorção intestinal de AG dietéticos e mobilização das reservas de gordura corporal. AG dietéticos são transportados como TG em VLDL, e a absorção mamária depende da ação da lipoproteína lipase que reside na parede capilar. Por outro lado, AG de cadeia longa das reservas de gordura corporal são transportados como ácidos graxos não esterificados (MCGUIRE e BAUMAN, 2002; BAUMAN e GRIINARI, 2003)

Dietas consumidas por vacas leiteiras em lactação têm baixo teor de gordura, geralmente contendo apenas cerca de 4-5% de lipídeos. Os ácidos graxos poliinsaturados predominante nas dietas de ruminantes são o ácido linolênico e o ácido linoleico, o primeiro derivado principalmente de culturas forrageiras, e o último sendo um componente importante das oleaginosas e dos concentrados que são fornecidos para as vacas leiteiras (LOCK E BAUMAN, 2004).

No entanto, aumentar o nível de ALA no leite de ruminantes parece ser particularmente difícil devido à biohidrogenação no rúmen, que resulta em uma relativa baixa taxa de transferência deste ácido graxo da dieta para o leite.

2.5 - Biohidrogenação ruminal e depressão da gordura no leite

A depressão da gordura no leite (DGL) é uma condição na qual a produção de gordura é reduzida, geralmente em 30 a 50%. A DGL é frequentemente o resultado de mudanças na alimentação e ocorre naturalmente nos ruminantes alimentados com dietas altamente fermentáveis ou dietas que contêm altas doses de óleos vegetais ou de peixe.

Um avanço nas teorias da depressão da gordura do leite surgiu após um novo foco nos ácidos graxos trans e sua associação com o percentual de gordura do leite. O efeito de baixo teor de fibra induz alterações no perfil de fermentação ruminal em resposta a um pH mais baixo. Assim como uma fonte de AGPI na dieta para induzir DGL. Este efeito foi demonstrado por Griinari et al. (1998) ao testar dietas com baixa fibra e alto teor de AGPI. Na presença de baixo pH ruminal e AGPI, cerca de metade do ácido graxo C18:1 na gordura do leite foi o trans-10 18:1. Embora o trans-10 18:1 esteja intimamente associado à DGL (Lor et al., 2005), provavelmente este não é a única causa da DGL (SHINGFIELD et al., 2008). Bauman e colaboradores (2000) demonstraram depressão acentuada da gordura do leite em vacas infundidas com CLA trans-10, cis-12. Assim, concluiu-se que o CLA trans-10, cis-12 é provavelmente um dos principais causadores DGL.

Outras pesquisas exploraram fatores de risco nutricional para a formação de CLA bioativo que causa depressão da gordura do leite. Estes incluíram as influências de quantidades de AGI alimentadas, tipo e quantidade de fibra, pH ruminal, ionóforos e taxas de degradabilidade do amido (ALMEIDA et al., 2013; GLASSER et al., 2010; HARVARTINE et al., 2014).

A formação de CLA no rúmen pode ocorrer em função das práticas de manejo alimentar, como superlotação, mistura inadequada de alimento, frequência de alimentação e práticas de armazenamento de ração. Todos esses fatores e suas interações continuam a ser investigados para determinar as melhores práticas para superar a DGL. Em alguns casos, nutricionistas optam por limitar ou mesmo evitar a suplementação de dietas com gorduras insaturadas, em vez de arriscar ocorrência de DGL.

Desta forma, a relação entre a adição de gordura na dieta e o desempenho de vacas leiteiras pode ser variável devido à influência da fonte e da quantidade de gordura utilizada, do método de processamento adotado e do estágio de lactação do animal (PALMQUIST & JENKINS, 1980). Mesmo considerando que a utilização de lipídeos na dieta de ruminantes possa causar uma pequena redução na digestibilidade da fibra, o seu uso é viável devido aos seus efeitos benéficos, tais como aumento da energia bruta da dieta e mudança no perfil de ácidos graxos no leite e na carne.

2.6 - Fontes de óleo na dieta de ruminantes

2.6.1. Óleo de soja

A soja é um grão rico em proteínas, cultivado em todo mundo como fonte de alimento para humanos e animais e destaca-se entre os alimentos proteicos de origem vegetal como fonte alternativa de proteína e energia. Também chamada de *Soja hispida*, *Glycine hispida* ou *Glycine max*, pertence à família das papilionáceas e a subordem das leguminosas (BERTRAND et. Al, 1987). Por ser considerada uma semente oleaginosa, também serve como fonte alternativa de energia através da extração do óleo de soja.

O óleo de soja é rico em ácidos graxos em sua maioria poli-insaturados, sendo que o grau de saturação dos ácidos graxos interfere diretamente no metabolismo do rúmen, consequentemente afetando o grau de aproveitamento nos nutrientes. O ácido linoleico (C18:2 ômega-6), que predomina nas fontes de óleos mais comuns, está presente no óleo de soja em maiores concentrações (DHIMAN et al., 2005).

O ômega-6 tem grande importância para a saúde humana, apresentando características de proteção contra a hipertensão, diminuição do colesterol e o excesso de glicose. (PATTERSON et al., 2012)

Óleos de vegetais nas rações de ruminantes apresentam efeitos desejáveis como, inibição da produção de metano, redução na produção de N-NH₃ ruminal, aumento da eficiência da síntese microbiana e aumento do ácido linoleico conjugado (CLA) (PALMQUIST E MATTOS, 2006).

No entanto, o oferecimento de óleo de soja na dieta de ruminantes deve ser feito com cuidado, já que pode prejudicar o aproveitamento de alimentos no rúmen, em consequência da interferência da atividade microbiana. Para isso, é necessário prestar atenção em relação à quantidade de óleo oferecida na dieta.

2.6.2. Óleo de linhaça

A linhaça é a semente do linho (*Linum usitatissimum*), um alimento considerado funcional, composta por proteínas, lipídios, carboidratos e fibras. Os ácidos graxos presentes na linhaça são poli-insaturados, apresentando aproximadamente 48% de ácido linolênico (ômega-3), e 15% de linoleico (ômega-6) (NOVELLO E POLLONIO, 2012). O ômega-3 é portanto o ácido graxo mais presente na linhaça, o que confere ao grão características desejáveis como prevenção de doenças cardiovasculares em processos inflamatórios (NOVELLO E POLLONIO, 2012).

O óleo de linhaça é produzido através da extração do óleo a partir da semente de linhaça. A extração do óleo pode ser por solventes, ideal quando ainda será refinado, e por prensagem a frio, ideal para a alimentação animal.

O óleo de linhaça é uma excelente fonte de ômega 3 para nutrição humana, fazendo com que o seu consumo gere consequências positivas como redução do colesterol total, LDL, VLDL, redução nos riscos de doenças cardiovasculares e também prevenção de problemas relacionados a circulação como trombose e gangrena. Também possui características desejáveis e importantes como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antialérgicas, além de melhorar a absorção de cálcio e até reduzir alguns tumores como o câncer de pulmão, próstata e mamas (MOLENA-FERNANDES et al., 2010).

Apesar de todas as boas características, deve-se tomar cuidado ao oferecer óleo de linhaça para bovinos, porque em excesso pode interferir no metabolismo do rúmem, podendo prejudicar o aproveitamento de outros alimentos.

3. HIPÓTESE

A hipótese a ser testada é que a inclusão de fontes de ômega-6 e ômega-3 na dieta de vacas lactantes altera o perfil de gordura do leite, tornando-o um alimento mais adequado ao consumo humano, sem prejudicar o metabolismo da vaca.

4. OBJETIVOS

O objetivo foi produzir um leite com perfil de gordura mais adequado ao consumo humano.

- 1- Avaliar o efeito da suplementação com óleo de soja e linhaça sobre a produção do leite;
- 2- Avaliar o efeito da suplementação com óleo de soja e linhaça sobre a composição do leite;
- 3- Avaliar o consumo de matéria seca de vacas alimentadas com dietas contendo óleo de soja e óleo de linhaça
- 4- Avaliar o efeito da suplementação com óleo de soja e linhaça sobre o perfil metabólico de vacas leiteiras, mensurados através de variáveis sanguíneas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho faz parte de uma série de estudos que, além de avaliar os efeitos da suplementação de ômega-6 ômega-3 sobre o perfil lipídico da gordura presente no leite de vacas lactantes, promoverá avaliação funcional do leite utilizando suínos como modelo para aplicabilidade em humanos. O projeto está incluso no auxílio FAPESP 2015/ 19393-8.

5.1 - Local Experimental

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos sob nº 4939070317. O experimento foi conduzido no Setor de Bovinocultura de Leite da Prefeitura do Campus USP "Fernando Costa" Pirassununga/SP, durante o período de Maio a Agosto de 2017.

5.2 - Animais e manejo diário

Dezoito vacas leiteiras de raça Holandês, múltiparas, 153 ± 62 dias em lactação, com peso corporal médio de $616,33 \pm 152$ kg, ECC médio 3,25 e em diferentes fases de lactação foram selecionadas e foram alojadas em estábulo tipo “free-stall”, separadas individualmente por cerca elétrica, de modo a permitir consumo individual. Todas as vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, às 7:00 e 15:00 horas, em sala de ordenha do tipo espinha de peixe. As medidas gerais de higiene consistiram em pré e pós “dipping” com antisséptico e secagem com papel toalha. A detecção da mastite clínica era realizada diariamente através do teste da caneca de fundo preto, antes de cada ordenha. *California mastitis test* (CMT) era realizado ocasionalmente, pelo menos duas vezes ao mês ou sempre que o ordenhador notasse sinal de mastite clínica, como presença de grumos ou consistência anormal do leite, ou vermelhidão e inchaço na glândula mamária. Os animais foram alimentados individualmente duas vezes ao dia, de acordo com o consumo de matéria seca no dia

anterior, de forma a ser mantido um percentual de sobras das dietas entre 10 e 20% do fornecido, para que não houvesse limitação de consumo.

5.3 - Tratamentos experimentais

As dietas experimentais foram formuladas conforme as recomendações do NRC (2001) para atender as exigências de vacas em lactação média com 25 litros/dia. As diferentes dietas experimentais e água foram fornecidas “ad libitum” durante todo período experimental. Sendo 50% da dieta composta pelo concentrado experimental e 50% volumoso silagem de milho.

Tabela 1 - Ingredientes e composição das dietas experimentais

Variáveis	Inclusão de óleo vegetal		
Ingredientes % MS	Controle	Óleo de Soja	Óleo de Linhaça
Milho moído	30,50	28,00	28,00
Farelo de soja	17,00	17,00	17,00
Óleo de soja	-	2,50	-
Óleo de linhaça	-	-	2,50
Ureia pecuária	0,50	0,50	0,50
Calcário	0,30	0,30	0,30
Fosfato Bicálcico	0,15	0,15	0,15
Sal comum	0,50	0,50	0,50
Sal mineral ¹	1,05	1,05	1,05
Silagem de milho	50,00	50,00	50,00
Composição Bromatológica % MS			
MS	92,01	92,61	91,68
MM	3,38	3,19	3,18
PB	16,64	16,15	16,24
FDN	29,97	29,48	29,42
FDA	18,73	18,14	17,99
EE	3,49	5,67	5,78
Lignina	3,91	3,56	3,61
CT	75,95	74,01	74,18
CNF	45,99	44,53	44,76
NDT	66,77	69,31	69,46

¹ Composição por kg do produto: Enxofre (S) 80g, Magnésio (Mg) 20g, Potássio (K), 20g, Manganês (Mn) 1000mg, Zinco (Zn) 2500 mg, Cobre (Cu) 1500mg, Cobalto (Co) 100mg, Iodo (I) 80 mg, Selênio (Se) 20 mg, Cálcio (Ca) 180g, Fósforo (P) 90 g, Flúor (F) máx. 300mg.

5.4 - Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em 6 quadrados latinos 3 x 3, não-contemporâneos, sendo a unidade experimental animal durante cada período experimental (n = 54 unidades experimentais). Cada um dos três períodos experimental teve duração de 28 dias (21 de adaptação a dieta e 7 dias de coleta). As dietas experimentais consistiram em: 1) Controle (CT): sem adição de óleo; 2) Óleo de Soja (OS): 5% de adição de óleo de soja como fonte de ômega-6 no concentrado experimental (% MS); 3) Óleo de Linhaça (OL): 5% de adição de óleo de soja como fonte de ômega-3 no concentrado experimental (% MS). No presente estudo o óleo de soja e linhaça apresentaram 83,8% e 88,3% de ácidos graxos insaturados, respectivamente.

5.5 – Coleta de dados

5.5.1 -Dieta

Durante cada período de coleta, foram coletadas amostras dos alimentos fornecidos e das sobras, diretamente do cocho e congeladas -21°C, sendo compostas após o término de cada período experimental em uma única amostra por animal para análise bromatológica. As amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 65°C por 72 horas, para determinação da matéria parcialmente seca e posteriormente moídas em moinho do tipo Willey em peneira de 1 mm. Os teores de matéria seca total (105°C) (AOAC 950.15) matéria mineral (AOAC, 942.05) e extrato etéreo (AOAC 920.39) foram determinados de acordo com as metodologias descritas por AOAC (1995).

O teor de proteína bruta (AOAC, 984.13) foi obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25 pelo método de combustão de Dumas, conforme a AOAC (1995). Os teores de fibra detergente neutro e fibra detergente ácido foram obtidos conforme método descrito por Van Soest et al. (1991). A determinação de FDN foi de acordo com as adaptações descritas por Mertens et al. (2002), usando α -amilase e sem adição de sulfito de sódio. Os carboidratos totais foram calculados conforme

metodologia de Sniffen et al. (1992), os teores de carboidratos não-fibrosos foram calculados como proposto por Hall (2000), e os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram calculados segundo Sniffen et al. (1992).

5.5.2 -Leite

A produção de leite correspondeu ao somatório da produção das duas ordenhas diárias, sendo mensurada diariamente em medidor eletrônico de fluxo (DeLaval®) de ordenha mecânica. Os resultados foram importados através do programa Alpro (DeLaval, Tumba, Suécia) e salvos em planilhas. Em cada período de coleta experimental, foram coletadas amostras de leite de cada animal, composta pelas duas ordenhas, manhã e tarde proporcionalmente (60:40). Esta coleta foi feita durante 3 dias consecutivos, em tubo coletor de 100 mL contendo conservante bronopol. As amostras de leite foram mantidas em refrigerador até o final de cada período experimental, e sequencialmente enviadas para o Laboratório Clínica do Leite da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP). As amostras de leite foram analisadas quanto à gordura, proteína, lactose, sólidos totais pelo processo de infravermelho através do analisador Bentley 2000 (Bentley Instruments®); nitrogênio ureico por método enzimático espectrofotométrico pelo analisador ChemSpec 150 (Bentley Instruments®) e contagem de células somáticas por citometria de fluxo, utilizando-se os aparelhos Bentley 2000® e Somacount 300®. O extrato seco desengordurado (ESD) foi obtido pela diferença do teor de gordura e de sólidos totais do leite.

As amostras de leite para determinação do colesterol e perfil de ácidos graxos foram colhidas durante o período de coleta e analisadas ao final do experimento. Estas amostras foram acondicionadas em frascos plásticos com capacidade de 100 mL, ao final da ordenha da manhã e tarde, diretamente do balão volumétrico, após agitação de homogeneização de cada amostra. Após a coleta, as amostras foram armazenadas em freezer a -21°C. As análises de colesterol foram realizadas no Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP de acordo com a metodologia proposta por Saldanha et al. (2004). Ao leite previamente

descongelado e homogeneizado (10g) foram adicionados 8 mL de solução de KOH 50% e 12 mL de álcool etílico, sendo a solução colocada em banho-maria a 60°C sob agitação constante por 15 minutos. Depois foram acrescentados 10 mL de água destilada até o resfriamento completo. A extração foi realizada com hexano sob agitação intensa. Após separação, uma amostra de 4 mL da fase hexânica era retirada, seca sob N₂ e misturada à 0,5 mL de isopropanol, com agitação em vórtex até completa solubilização.

Para quantificação do colesterol através da metodologia enzimática, foi utilizado o kit Laborlab®, composto por dois reativos de cor, além do reativo enzimático. Após procedimento especificado pelo kit, foi realizada leitura à absorbância contra o branco, igualmente preparado a 499 nm. A curva padrão foi constituída a partir de uma solução padrão de colesterol (1,006 mg/100mL), com concentração variando de 0,01 a 0,08 mg/mL.

O perfil de ácidos graxos foi determinado pelo Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP). Para extração da gordura as amostras de leite foram descongeladas e centrifugadas a 11000 rpm por 30 minutos. Da nata sobrenadante foram retiradas 400 mg para extração da gordura segundo Hara e Radim (1978). A metilação foi feita através do uso de uma solução metanólica de metóxido de sódio, de acordo com Christie (1982). O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa (ThermoFinnigan®, modelo Trace 2000), utilizando coluna capilar de sílica fundida, SP -2560 (100mm x 0,25 mm x 0,2 mm; supelco) e detector de ionização de chama (FID). O hidrogênio foi utilizado como gás de arraste a um fluxo de 1mL/min e as temperaturas do injetor e detector de 250 e 300°C, respectivamente. A razão de injeção das amostras e o fluxo de ar foram ajustados, assim como o fluxo de nitrogênio. A temperatura foi controlada e um padrão de manteiga (CRM -164; Commission of the European Communities, Community bureau of Reference, Brussels, Belgium) contendo valores certificados para alguns ácidos graxos que foi utilizada para determinar suas recuperações e calcular os respectivos fatores de correção. A concentração dos ácidos graxos foram expressos em % de ácidos graxos totais.

5.5.3 - Sangue

Coletas de sangue foram realizadas no 28º dia de cada período, por meio de punção na veia coccígea, antes do fornecimento da dieta. As amostras foram coletadas em dois tubos sem anticoagulante e um tubo com fluoreto. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 2.000g por 15 minutos a uma temperatura de 4°C para obtenção do plasma, que acondicionado em tubos de 2 mL do tipo “ependorff” e congelado a -20°C.

Triglicerídeos, ureia, nitrogênio ureico, glicose, albumina, proteína total, colesterol total, HDL, LDL, creatina, gama glutamil transferase (GGT), aspartato aminotransferase (AST) foram determinados por meio de kits comerciais (Randox®) que utilizam métodos colorimétricos enzimáticos ou cinéticos enzimáticos. A leitura foi realizada em analisador automático de bioquímica sanguínea (Sistema de Bioquímica Automático SBA -200 – CEL®) e em leitora de microplacas (Marca Asys, Modelo Expert Plus – UV).

5.6 – Análise estatística

Os resultados encontrados em cada período experimental foram convertidos em um mesmo arquivo Excel, importados e analisados pelo programa computacional Statistical Analysis System® (SAS, 2001). Os dados foram avaliados quanto à normalidade resíduo e a homogeneidade das variâncias através do Proc-UNIVARIATE e Proc-GLM. A contagem de células somáticas foi transformada em log (10) (SCC -1) para atender a premissa estatística de normalidade dos resíduos. Após checagem da normalidade dos dados, o procedimento estatístico adotado foi de acordo com os efeitos principais dos tratamentos, pelo comando Proc-MIXED do SAS (versão 9.0), com auxílio de contrastes ortogonais, onde contrataste um (C1) comparou a média dos óleos de soja mais óleo de linhaça com a dieta controle, enquanto o contraste dois (C2) comparou a média do tratamento óleo de soja com o tratamento óleo de linhaça. O nível de significância adotado foi 5%, de acordo com o seguinte modelo:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + Q_j + A(Q)_k + P_l + e_{ijkl}$$

em que Y_{ijkl} = é o valor observado; μ = média geral; T_i = efeito fixo de tratamento i , $i=1$ a 3; Q_j = efeito fixo do quadrado latino j , $j = 1$ a 3; $A(Q)_k$ = efeito aleatório do animal k dentro de cada quadrado latino, $k = 1$ a 18; P_l = efeito fixo do período l , $l = 1$ a 3; E_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação. Os graus de liberdade foram calculados de acordo com o método Satterthwaite (DDFM = Satterth) e apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Esquema de análise de variância para delineamento em quadrado latino replicado.

Causas de variação	GL
Efeito de tratamento	2
Efeito de quadrado	5
Efeito de período	2
Efeito de animal dentro de quadrado	12
Resíduo	34
Total	53

O efeito de dieta foi estudado com os seguintes contrastes ortogonais (C1 = Controle vs Fontes de Gordura; e C2 = Óleo de Soja vs Óleo de Linhaça), utilizando um nível de 5% de significância. Todas as variáveis passaram pela análise de homogeneidade das variâncias e normalidade dos resíduos (teste de Shapiro-Wilk), sendo retirados out-liers e transformação de dados quando necessários.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 - Produção e composição do leite

A adição de óleo de soja e linhaça diminuiu o consumo de matéria seca em vacas em lactação em 1.93 kg/dia ($P = 0.02$). No entanto, a produção de leite, kg/vaca/dia e a produção de leite corrigida (PLC) não foram afetadas (Tabela 3) pelos tratamentos. Apesar da redução do consumo de matéria seca causado pela adição de óleos nas dietas, este efeito não foi o suficiente para afetar a produção de leite no presente estudo.

Quando óleos vegetais são adicionados na dieta de vacas, ocorre liberação direta de ácidos graxos insaturados no rúmen, provocando modificações no mecanismo de fermentação deste órgão. Além disso, devido à baixa palatabilidade, os óleos vegetais possuem a capacidade de diminuir o consumo de matéria seca em ruminantes (FRANKLIN et al., 1999). A diminuição do consumo de matéria seca se deve também aos efeitos causados pelo óleo de soja e linhaça, que causam recobrimento das partículas de alimentos.

Apesar de aumentar a energia da dieta e proporcionar um acréscimo do desempenho produtivo, a presença de óleo impede o adesão de bactérias celulolíticas, assim como o acesso de enzimas à celulose, causando desta forma prejuízo à degradação de fibras. Além disso, ácidos graxos poliinsaturados são tóxicos a bactérias, em especial Gram positivas, e protozoários ruminais ((PALMQUIST, MATTOS, 2006)). Esta toxicidade deve-se à modificações da composição lipídica das membranas de micro-organismos que causa alteração nas propriedades físico-químicas destes organismos e modifica a permeabilidade da membrana microbiana, inibindo a atividade destes ou até mesmo causando morte microbiana (KOZLOSKI, 2002).

A porcentagem e produção de gordura em kg/vaca/dia foram reduzidas com a inclusão dos óleos na dieta das vacas em comparação ao controle, não havendo diferenças entre os óleos.

De maneira similar, observou-se redução na porcentagem de sólidos totais (ST) no leite de vacas suplementadas com fontes $\omega 6$ e $\omega 3$, no entanto, tal diferença não foi observada na produção de ST em kg/vaca/dia.

O teor e a produção de proteína, lactose e extrato seco desengordurado (ESD) não foi influenciado pela suplementação de $\omega 6$ e $\omega 3$. Similarmente, não foi observada diferenças na CCS.

A adição de ácidos graxos insaturados na dieta de vacas leiteiras pode reduzir a gordura de leite devido a formação de ácidos graxos *trans*, que são provenientes da biohidrogenação parcial de ácidos graxos por parte dos micro-organismos ruminais. Ácidos graxos *trans* possuem o potencial de reduzir a atividade de enzimas sintetizadoras de ácidos graxos de até 16 carbonos na glândula mamária, como por exemplo Acetil-CoA sintase e Ácido graxo sintase (BAUMAN, HARVATINE, LOCK, 2011).

A adição de óleos vegetais não afetou a concentração de NU do leite. Este efeito é normalmente observado quando ha mudanças a fração proteica da dieta. No presente estudo, a utilização de óleo de linhaça ou soja ocasionou uma diminuição na concentração de nitrogênio presente no leite.

Tabela 3 - Efeito da inclusão de óleo de soja linhaça na dieta de vacas em lactação sobre a produção e composição do leite de vacas.

	Tratamento			EPM ⁴	P ⁵	C1 ⁶	C2 ⁷
	CT ¹	OS ²	OL ³				
PL ⁸ (Kg)	25,87	26,00	25,30	1,57	0,85	-	-
PLC ⁹ (4% gor)	22,92	21,26	20,96	1,02	0,19	-	-
GB ¹⁰ (%)	3,37	2,75	2,89	0,2	<0,01	<0,01	0,33
GB kg/vaca/dia	0,81	0,67	0,68	0,43	0,01	<0,01	0,73
PB ¹¹ (%)	3,29	3,35	3,30	0,09	0,38	-	-
PB kg/vaca/dia	0,83	0,84	0,80	0,04	0,65	-	-
LC ¹² (%)	4,35	4,31	4,37	0,06	0,10	-	-
LC kg/vaca/dia	1,14	1,13	1,12	0,06	0,89	-	-
ST ¹³ (%)	12,01	11,25	11,61	0,30	<0,01	<0,01	0,47
ST kg/vaca/dia	3,04	2,92	2,86	0,14	0,46	-	-
ESD ¹⁴ (%)	8,64	8,75	8,71	0,13	0,11	-	-
ESD kg/vaca/dia	2,23	2,24	2,18	0,11	0,82	-	-
CCS ¹⁵ (cel/mL)	247,15	231,33	266,09	62,27	0,52	-	-
NU ¹⁶ (mg/dL)	14,39	12,23	12,64	0,69	0,14	-	-

¹Controle ²Óleo de soja ³Óleo de linhaça ⁴Erro padrão da média ⁵Valor de P ⁶Contraste 1 (CON vs. OS + OL) ⁷Contraste 2 (OS vs. OL) ⁸Produção de leite ⁹Produção de leite corrigida ¹⁰Gordura bruta ¹¹Proteína Bruta ¹²Lactose ¹³Sólidos totais ¹⁴Estrato seco desengordurado ¹⁵Contagem de células somáticas ¹⁶Nitrogênio uréico.

6.2 – Perfil da gordura do leite

Dentre os ácidos graxos *trans* que atuam na depressão da gordura do leite podem ser mencionados o C18:2 *trans*10 cis12, C18:1 *trans*10 e C18:1 *trans*11. Estes ácidos graxos são resultados da biohidrogenação incompleta de ácidos graxos poliinsaturados no rúmen (LEITE, 2006). Suspeita-se que no presente estudo, muitos desses ácidos graxos passaram pelo rúmen sem sofrer completa biohidrogenação devido à grande quantidade de ácidos graxos presentes na dieta, que superou a capacidade das bactérias de ruminais de biohidrogená-los.

Os ácidos graxos que escapam parcialmente ou totalmente da biohidrogenação podem ser absorvidos pelos enterócitos presentes epitélio do intestino delgado. Se absorvidos, serão reesterificados a triglicerídeos e transportados em quilomícrons, inicialmente via sistema linfático e posteriormente no sistema sanguíneo. Uma vez no

sangue, quilomícrons são direcionados aos tecidos periféricos, como a glândula mamária, aumentando assim a quantidade de ácidos graxos insaturados na gordura do leite (PALMQUIST, MATTOS, 2006).

Dos ácidos graxos com 16 carbonos, o C16 (Palmítico) diminuiu com a adição de óleo na dieta em comparação ao controle (Tabela 4, $P < 0.01$). Este efeito é de grande interesse, pois o ácido palmítico parece estar relacionado com o aumento de colesterol sanguíneo (BAUMAN E GRIINARI, 1996). O colesterol, por sua vez, é uma substância complexa que apresenta inúmeras funções no organismo. Porém, ocorrendo aumento e acúmulo no organismo pode acarretar aumento em sua concentração no sangue e, como consequência, doenças coronarianas como arterosclerose, hipertensão arterial, diabete mellitus e formação de cálculos biliares (HOPKINS, 1992). Nenhuma diferença foi observada entre as vacas alimentadas com óleo de soja ou linhaça quanto ao ácido palmítico.

Os ácidos graxos C18 (Ácido esteárico), C18:1 cis-9, C18:1 cis-12 e C18:1 cis-13 tiveram maior concentração na gordura do leite nas dietas suplementadas com óleo de soja e linhaça. O C18:2 cis-9 cis-12 apresentou diferença entre os óleos, tendo maior concentração com o uso de óleo de soja. Portanto, o aumento da concentração de ácido linoleico pode ter ocorrido devido a passagem do óleo de soja pelo rúmen sem passar pelo processo de biohidrogenação, sendo absorvido nos enterócitos do intestino delgado e utilizados como matéria prima da gordura no leite.

Os ácidos graxos C18:3 n-3 (ácido linolênico - ômega 3) e C18:3 n-6 (ácido linoleico - ômega 6) apresentaram diferenças com a adição de óleo e entre as fontes de óleo, o ômega 3 foi mais presente no leite das vacas suplementadas com óleo, sendo maior com óleo de linhaça. Já o ômega 6 esteve mais presente no leite de vacas que consumiram dieta controle, apresentando maior concentração com óleo de soja. A relação entre ômega 6/ômega 3 foi menor no tratamento de óleos, com maior presença no tratamento com óleo de linhaça.

No geral, o uso de óleo na dieta das vacas diminuiu o percentual de ácidos graxos saturados e aumentou o percentual de ácidos graxos insaturados (tabela 5), como visto em Eifert et al. (2006), não apresentando diferenças entre os dois tipos de óleo. Com isto resultou em uma menor relação entre ácido graxo saturado por

insaturado nos tratamentos com óleos. Isto pode ser explicado pelo fato de os animais consumirem alimentos com altos teores de ácidos graxos insaturados, o que fez com que boa parte tenha escapado da biohidrogenação que ocorre no rúmen, sendo então absorvidos no intestino e resultando em um leite com maiores teores de ácidos graxos insaturados.

Tabela 4 - Efeito da inclusão de óleo de soja e linhaça na dieta de vacas em sobre o perfil de ácidos graxos do leite (%).

Variável	Tratamento			EPM ⁴	P ⁵	C1 ⁶	C2 ⁷
	CT ¹	OS ²	OL ³				
c6	1,84	1,08	1,28	0,09	<0.01	<0.01	0.02
c8	1,13	0,57	0,72	0,71	<0.01	<0.01	<0.01
c10	2,67	1,32	1,6	0,11	<0.01	<0.01	0.03
c12	346	1,98	2,22	0,12	<0.01	<0.01	0.11
c12:1	0,1	0,05	0,06	<0,01	<0.01	<0.01	0.42
c13	0,14	0,08	0,09	0,01	<0.01	<0.01	0.36
c13anteiso	0,09	0,05	0,06	<0,01	<0.01	<0.01	0.52
c14	11,5	8,75	9,12	0,26	<0.01	<0.01	0.61
c15	1,26	0,85	0,88	0,1	<0.01	<0.01	0.67
c15anteiso	0,53	0,40	0,43	0,02	<0.01	<0.01	0.32
c15iso	0,51	0,16	0,17	<0,01	<0.01	<0.01	0.55
c16	34,43	26,18	24,29	1,12	<0.01	<0.01	0.13
c16 iso	0,18	0,10	0,17	0,02	0.94	-	-
c16:1 c-9	1,95	1,73	1,62	0,13	0.07	-	-
c17	0,43	0,37	0,36	0,02	0.02	<0.01	0.59
c17iso	0,39	0,34	0,37	0,01	0.03	0.02	0.16
c17:1	0,21	0,19	0,18	0,02	0.19	-	-
c18	8,65	11,65	12,32	0,49	<0.01	<0.01	0.29
c18:1cis9	20,56	27,08	27,96	0,95	<0.01	<0.01	0.4
c18:1cis11	0,9	1,06	0,99	0,06	0.13	-	-
c18:1cis12	0,38	0,53	0,52	0,04	<0.01	<0.01	0.72
c18:1cis13	0,09	0,16	0,16	0,01	<0.01	<0.01	0.82
c18:2cis9cis12	2,13	2,65	2,03	0,13	<0.01	0.11	<0.01
c18:3n3	0,26	0,33	0,94	0,05	<0.01	<0.01	<0.01
c18:3n6	0,02	0,01	0,01	<0,01	<0.01	<0.01	<0.01
c20:0	0,11	0,12	0,11	0,01	0.24	-	-
c20:1	0,07	0,08	0,11	0,03	0.63	-	-
c21	0,01	0,009	0,03	0,01	<0.01	0.04	<0.01
c22	0,02	0,02	0,02	0,03	0.7	-	-
c23	0,01	0,006	0,003	<0.01	<0.01	<0.01	0.08

c24	0,02	0,02	0,01	<0.01	<0.01	0.14	<0.01
c24:1	0,03	0,02	0,01	<0.01	<0.01	<0.01	0.26

¹Controle ²Óleo de soja ³Óleo de linhaça ⁴Erro padrão da média ⁵Valor de P ⁶Contraste 1 (CON vs. OS + OL) ⁷Contraste 2 (OS vs. OL)

Os teores de ômega 3 aumentaram na gordura do leite com a suplementação de óleo e foi maior no tratamento com o óleo de linhaça (tabela 5). A porcentagem de ômega 6 aumento com a suplementação dos óleos em comparação ao controle e foi maior com a inclusão do óleo de soja.

Essas diferenças estão relacionadas com os teores de ômega 6 e 3 presentes nos óleos de soja e linhaça, respectivamente. Na soja, o ômega 6 corresponde a cerca de 54% dos ácidos graxos no total, como visto em Silva et al. (2010). Segundo Novello e Pollonio (2012), o perfil de ácidos graxos da linhaça é composto de certa de 48% de ômega 3 e 15% de ômega 6.

Tabela 5 - Efeito da inclusão de óleo de soja e linhaça na dieta de vacas em lactação sobre a qualidade nutricional da fração lipídica do leite (%).

Variável	Tratamento			EPM	P	C1	C2
	CT	OS	OL				
Colesterol	14,08	14,38	12,86	0,84	0,05	0,39	0,02
Saturados	65,72	54,09	54,26	1,62	<0,01	<0,01	0,94
Insaturados	34,24	54,91	45,74	1,20	<0,01	<0,01	0,60
Rel. Sat/ins	2,54	1,66	1,65	0,13	<0,01	<0,01	0,97
Monoinsaturados	24,95	30,89	31,61	1,10	<0,01	<0,01	0,56
Poliinsaturados	2,41	3,00	2,97	0,16	<0,01	<0,01	0,89
Ômega-3	0,26	0,33	0,94	0,04	<0,01	<0,01	<0,01
Ômega-6	2,15	2,67	2,03	0,13	<0,01	<0,01	0,05
Relação n6/n3	8,20	8,09	2,16	5,09	<0,01	0,04	0,04

A porcentagem de colesterol na gordura do leite não foi diferente com a adição de óleo na dieta das vacas (Tabela 5), mas foi diminuído entre as fontes de óleo, sendo menor com o óleo de linhaça. A quantidade de colesterol no tratamento com óleo de soja foi parecida com o encontrado em Paschoal (2007).

Ambos óleo de soja e linhaça diminuíram a concentração de ácidos graxos saturados, a medida que aumentaram a quantidade de ácidos graxos insaturados no leite de vacas, melhorando assim a relação entre os ácidos graxos

saturados/insaturados. Além disso, o óleo de soja e de linhaça aumentaram significativamente o teor de ácidos graxos mono e poli-insaturados (tabela 5). O teor de ácidos graxos de família ômega-3 foi significativamente maior quando vacas recebiam óleo de linhaça do que a dieta controle ou suplementação de soja, comprovando que houve grande quantidade dos ácidos graxos insaturados deixaram o rúmem sem ser biohidrogenados. A concentração de ácidos graxos de ômega-6 foi superior no grupo suplementado com óleo de soja. A relação n-6/n-3 do leite melhorou quando dietas contendo óleos vegetais foram oferecidas a vacas, e dentre as vacas suplementadas, foi ainda mais adequado na dieta contendo óleo linhaça.

A proporção da ingestão n-6/n-3 na dieta humana foi modificada ao longo da evolução da espécie. O consumo de alimentos naturais eram a única ou a mais abundante opção para os primórdios, no entanto, com o advento da revolução industrial alterou abruptamente a relação n-6/n-3. Atualmente, recomenda-se aumento da ingestão de alimentos com perfil adequado de n-6/n-3, mais próximos da dieta dos primórdios (estimada em 3:1). A Organização Mundial da Saúde (OMS) juntamente à Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) recomendam a razão de (5:1) podendo chegar até (10:1) os valores sugeridos para uma alimentação equilibrada entre ômega 6 e 3. O leite de vacas alimentadas com óleo de soja e linhaça torna-se uma opção válida na procura de alimentos mais saudável, ocasionando melhor prevenção contra determinadas doenças coronarianas. No presente estudo, o leite de vacas alimentadas com óleo de soja resultou numa razão n-6/n-3 de 8,0, muito próximo ao recomendado pela FAO e a OMS. Ainda melhor, o leite de vacas alimentadas com óleo de linhaça resultou numa razão de 2,16.

Estes resultados são interessantes de um ponto de vista de nutrição e saúde humana vez que ácidos graxos de família ômega-3 são precursores de eicosanoides com propriedades anti-inflamatórias e baixo poder inflamatório. Por isso, estes ajudam na prevenção de doenças cardiovasculares, uma vez que controlam o estreitamento da luz arterial ao evitar deposição de gordura nas paredes dos vasos sanguíneos. (MARTIN et al., 2006). Este acúmulo de gordura nos vasos causam lesões, que estimulam a formação de coágulos e trombos que podem obstruir

abruptamente o fluxo de sangue formado em cima de uma placa de gordura existente na parede interna da artéria (MARTIN et al., 2006).

6.2 – Perfil metabólico

A suplementação com óleo de soja e linhaça não alterou as variáveis sanguíneas (tabela 6) AST, GGT, ureia, albumina, creatinina e proteínas totais. Além de não ter alterado significativamente os valores de AST e GGT, os valores encontrados no presente estudo estão dentro da normalidade dos valores descritos na literatura para animais saudáveis (GRANDE, SANTOS, 2014).

A AST é uma enzima sintetizada no fígado e é produzida em excesso em resposta a lesões causada em hepatócitos, normalmente devido a excesso de mobilização de lipídica (GRANDE, SANTOS, 2014). Os valores encontrados em todos os tratamentos então de acordo com os valores normais da literatura, onde vacas sadias apresentam concentrações inferiores a 120 U/L.

A GGT é uma enzima encontrada em vários locais no organismo como fígado, pâncreas, rins de bovinos. Essa enzima aparece elevada alterações hepáticas na ocorrência de desordens no fígado. No presente estudo, a suplementação com óleo de soja e vegetal não alterou os valores de GGT. Além disso, os valores encontrados estão de acordo com correspondentes da literatura para animais saudáveis que é 15 a 37 U/L (COZZI et al., 2011).

De maneira similar, os valores de albumina não foram alterados significativamente, estando ainda de acordo com os descritos na literatura para animais saudáveis (3 a 4.2 g/dL), de acordo com Gonzáles, Borges e Cecim (2000).. A albumina é produzida no fígado e liberada na corrente da sanguínea. Sendo a proteína de maior concentração no sangue, é responsável pelo equilíbrio osmótico sanguíneo e pelo transporte de vitaminas e hormônios. Valores alterados de albumina estão relacionados a problemas renais, inflamação intestinais, sendo também indicativos de

Table 6 - Efeito da inclusão de óleo de linhaça e soja na dieta de vacas em lactação sobre alguns componentes sanguíneos

Variável	Tratamento			EPM ⁴	P valor	C1 ⁵	C2 ⁶
	CT ¹	OS ²	OL ³				
AST U/L ⁷	72,94	74,88	68,28	2,34	0,16	-	-
GGT U/L ⁸	33,50	34,11	33,72	1,18	0,94	-	-
Ureia mg/dL	41,00	38,83	40,17	1,40	0,58	-	-
Albumina g/dL	3,51	3,48	3,51	0,02	0,62	-	-
Creatinina mg/dL	1,02	1,01	1,04	0,02	0,68	-	-
Proteínas totais g/dL	7,40	7,31	7,34	0,06	0,61	-	-
CQ U/L ⁹	111,61	132,80	94,72	16,27	0,30	-	-
Colesterol mg/dL	149,39	198,56	194,39	4,17	<0.01	<0.01	0.50
Triglicerídeos mg/dL	12,50	13,87	14,28	0,65	0,14	-	-
HDL mg/dL	78,44	100,61	95,33	3,79	<0,01	<0.01	0.35
LDL mg/dL	68,4	95,21	96,21	4,55	<0,01	<0.01	0.88
VLDL mg/dL	2,54	2,73	2,84	0,13	0,28	-	-
Glicose mg/dL	62,28	61,92	63,06	0,74	0,58	-	-

alterações no fígado. No presente estudo, os valores normais albumina indicam que suplementação com óleo soja e linhaça não comprometeu as função hepática e renal em vacas lactantes.

A creatinina é um composto com capacidade de filtrar o sangue e indica o funcionamento dos rins. A creatinina é um resíduo produzido pela quebra de uma proteína chamada creatina fosfato, o que está dentro do intervalo de referência de 1,0 a 2,0 mg/dL (KANEKO, HARVEY, E BRUSS, 2008).

Em revisão de literatura desenvolvida por Grande e Santos (2014), os seguintes valores referência foram encontrados para variáveis sanguíneas como glicose 45,04-73,87 mg/dL, proteína total 6,6-9,0 g/dL e colesterol total 115,83-193,05 mg/dL. Dentre os parâmetros sanguíneos mensurados no estudo, a suplementação com óleo de soja e linhaça não demonstrou indicativo de distúrbios metabólicos causado pelo elevado teor lipídico na dieta, uma vez que as variáveis

mencionadas dentro da normalidade para vacas em lactação saudáveis. No entanto, vale ressaltar que os valores de colesterol total foram significativamente maiores quando as vacas foram alimentadas com óleo de soja e linhaça (tabela 6). Além disso, se encontram um pouco acima do esperado pela literatura (115,83-193,05 mg/dL).

Este efeito provavelmente foi observado devido ao aumento da ingestão de ácidos graxos decorrente da suplementação com óleos vegetais. No entanto, estes resultados colaboram com os resultados encontrados por Welter et al. (2016), quando alimentaram vacas em lactação com diferentes níveis de óleo de canola na dieta, também com o intuito de melhorar o perfil dos ácidos graxos do leite.

Apesar do colesterol total ter aumentado no presente estudo, os valores de HDL também aumentaram. O HDL é lipoproteína de alta densidade, e atua de forma benéfica ao mobilizar o colesterol em excesso presente no sangue para o fígado. Ao chegar no fígado, o excesso de colesterol poderá ser metabolizado e desta forma, evita o acúmulo de gordura nos tecidos periféricos de vacas, o que resultaria em acúmulo de gordura corporal que em vacas apresenta efeitos negativos na taxa de concepção e pode inclusive resultar em parto distócico.

7. CONCLUSÃO

Ao fim do experimento, um leite com um perfil de gordura mais adequado ao consumo humano, isto é, com a relação ômega-6/ômega-3 foi produzido. O leite de vacas alimentadas com óleo de linhaça superou a proporção recomendada pela FAO para uma alimentação equilibrada entre ômega 6 e 3 (5:1). A consumo de matéria seca diminuiu, assim como a porcentagem e produção de gordura do leite, sem afetar a produção de leite nem o perfil metabólico dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis**. Arlington, VA. 11.ed. Washington, 1990.

ALMEIDA, O.C.; PIRES, A.V.; SUSIN, I.; GENTIL, R.S.; MENDES, C.Q.; QUEIROZ, M.A.A.; FERREIRA, E.M.; EASTRIDGE, M.L. Milk fatty acids profile and arterial blood milk fat precursors concentration of dairy goats fed increasing doses of soy bean oil. **Small Ruminant Research** 114 (2013) 152– 160.

BAUMAN, D.E., GRINARI, J.M. (2003) Nutritional Regulation of Milk Fat Synthesis, **Annu. Rev. Nutr.** 23, 203–227.

BAUMAN, D. E.; HARVATINE, K. J.; LOCK, A. L. Nutrigenomics, Rumen-Derived Bioactive Fatty Acids, and the Regulation of Milk Fat Synthesis. **Annual Review of Nutrition**. v.31, p.299–319, 2011.

BAUMAN, D.E., MATHER, I.H., WALL, R.J., LOCK, A.L., 2006. Major Advances Associated With The Biosynthesis Of Milk. **J. Dairy Sci.** 89, 1235–1243.

BERTRAND, J.P., LAURENT, C., LECLERCQ, V. 1987. **O Mundo da Soja**. Edusp, p. 139.

BRENNER, R. R. Biosynthesis And Interconversion Of Essential Fatty Acids. In: A. L. Willis. **Handbook Of Eicosanoids: Prostaglandins And Related Lipids, V. 1, Chemical And Biochemical Aspects, Part A**, Florida (USA): CRC Press, 1987. P. 99-117.

CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A.; BERNARD, L.; ROUEL, J.; DOREAU, M. Diet, Rumen Biohydrogenation And Nutritional Quality Of Cow And Goat Milk Fat. **Europe Journal Science Technology**, V. 109, P. 828-825, 2007.

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

COZZI, G., RAVAROTTO, L., CONTIERO L., MORO, M. Reference values for blood parameters in Holstein dairy cows: Effects of parity, stage of lactation, and season of production. **Journal of Dairy Science**. Volume 94, Issue 8, August 2011, Pages 3895-3901.

DHIMAN, T.R.; Nam, S.H. and Ure, A.L. 2005. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. **Crit Rev Food Sci**, 45: 463-482

DRACKLEY, J. K. **Overview of Fat Digestion and Metabolism in Dairy Cows**. University of Illinois, Urbana, 2004.

EATON, S. B.; EATON III, S.; SINCLAIR, L.; CORDAIN, L.; MANN, N. Dietary Intake Of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids During The Paleolithic. **World Review Of Nutrition And Dietetics** V.83, P.12- 23, 1998.

EIFERT, E. C. et al. 2006. Perfil de ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e monensina no início da lactação. **R. Bras. Zootec.**, v.35, n.1, p.219-228, 2006

FAGUNDES, L. A. Ômega-3 & Ômega-6: O Equilíbrio dos ácidos graxos essenciais na prevenção de doenças. **Porto Alegre: Fundação de Radioterapia do Rio Grande Do Sul**, 2002. 111 P.

GRANDE, P. A. SANTOS, G. T. O uso de perfil metabólica na nutrição de vacas leiteiras. Artigos técnicos da série Nutrição e Manejo Animal do Núcleo Pluricisciplinar de Pesquisa e Estudo da Cadeia Produtiva do Leite. Universidade Estadual de

Maringá, Maringá. Disponível em: <http://www.nupel.uem.br/perfilmetabolico-vacas.pdf>. Acesso em 30 de setembro de 2018.

FRANKLIN, S. T. et al. Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.129, p.2048-2052, 1999.

GLASSER, F.; FERLAY, A.; DOREAU, M.; LOOR, J.J.; CHILLIARD, Y. t10,c12-18:2-Induced Milk Fat Depression is Less Pronounced in Cows Fed High-Concentrate Diets. **Lipids**, v. 45, p. 877–887, 2010. DOI 10.1007/s11745-010-3460-x.

GONZÁLES, F. H. D.; BORGES, J. B.; CECIM, M. **Uso de provas de campo e de laboratório clínico em doenças metabólicas e ruminais em bovinos**. Porto Alegre, 2000.

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, 1251–61, 1998.

HALL, M. B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates: nutritional relevance and analysis, a laboratory manual**. Gainesville: University of Florida, 2000. (Extension Bulletin, 339).

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraciton of tissues with low-toxicity solvent. **Analitical Biochemistry**, v 90, p.420-426, 1978.

HARVATINE, K.J.; BOISCLAIR, Y.R.; BAUMAN, D.E. Liver x receptors stimulate lipogenesis in bovine mammary epithelial cell culture but do not appear to be involved in diet-induced milk fat depression in cows. **Physiological Reports**, v. 2, n. 3, 2014, e00266, doi: 10.1002/phy2.266.

HOPKINS, P.N. Effects of dietary cholesterol on serum cholesterol : a meta-analysis

and review. **American Journal Clinical Nutrition**, v. 55, p. 1060-1070, 1992.

HUNTINGTON, J.A., GIVENS, D.I., 1995. **The in situ technique for studying the rumen degradation of feeds: a review of the procedure**. Nutr. Abstr. Rev. B 65, 63–93.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 6. ed. San Diego: Academic, 2008.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica Dos Ruminantes**. Editora UFSM, Santa Maria: UFSM, 2002, 139p.

LEITE, L. C. **Perfil de ácidos graxos do leite e metabolismo de lipídios no rúmen de vacas recebendo dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou de peixe**. Piracicaba, SP. 2006. 97f. Tese (Doutorado em Agronomia – Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

LOCK, A. L.; BAUMAN, D. E. Modifying Milk Fat Composition of Dairy Cows to Enhance Fatty Acids Beneficial to Human Health. **Lipids**, Vol. 39, no. 12, 2004.

MANSUR A. P., DESIDÉRIO, F. Mortalidade por Doenças Cardiovasculares no Brasil e na Região Metropolitana de São Paulo: Atualização 2011. **Arquivos Brasileiro de Cardiologia**, 2012; [online].ahead print, PP.0-0

MARTIN, C. A; ALMEIDA, V. V; RUIZ, M. R. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Rev. Nutr.**, Campinas, 19(6):761-770, nov./dez., 2006

McGUIRE, M.A., and BAUMAN, D.E. (2002) Milk Biosynthesis and Secretion, in **Encyclopedia of Dairy Sciences** (Roginski, H., Furquay, J.W., and Fox, P.F., eds.), pp. 1828–1834, Elsevier Sciences, London.

MEZOMO, I. F. B. **Os Serviços de Alimentação: Planejamento e Administração**. Barueri (SP): Manole; 2002

MEDEIROS, S. R; Informe Técnico: uso de Lipídeos em dietas de ruminantes. **Embrapa Gado De Corte**, Campo Grande-MS, 2012

MERTENS, D. R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. **Journal of AOAC International**, v. 85, n. 6, p. 1217-1240, 2002.

MOLENA-FERNANDES, C. A., SCHIMIDT, G., NETO-OLIVEIRA, E. R., BERSANI-AMADO, C. A., CUMAN, R. K. N. Avaliação dos efeitos da suplementação com farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) marrom e dourada sobre o perfil lipídico e a evolução ponderal em ratos Wistar. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.12, n.2, p.201-207, 2010.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7th rev. ed. Natl.Acad. Sci., Washington, DC. 2001.

NOCEK, J.E. In situ and other methods to estimate ruminal digestion and energy digestibility: A review. **Journal Dairy Science**, v. 71, n. 8, p. 2051-2069, 1988.

NOVELLO, D., POLLONIO, M. Caracterização físico-química e microbiológica da linhaça dourada e marrom (*Linum Usitatissimum* L.). **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, 2012; 71(2):291-300.

OMS - **Organização Mundial da Saúde**. Disponível em: <<http://www.who.int/es/>>. Acesso em: 17 de outubro de 2016.

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, AND JENKINS, T. C. A 100-Year Review: Fat feeding of dairy cows. **Journal Of Dairy Science**. V 100, P 10061–10077. 2017.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo De Lipídeos. In: BERCHIELI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds.) **Nutrição De Ruminantes. Jaboticabal: FUNEP**, 2006. P. 287-310.

PASCHOAL, J. J. **Efeito da dieta contendo alta inclusão de soja extrusada e fonte orgânica de selênio sobre a composição, teor de CLA, perfil de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite de vacas holandesas**. Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo, Pirassununga, p. 1-130, 2007.

PATTERSON, E. R. WALL, G. F. FITZGERALD, R. P. ROSS, AND C. STANTON. Health Implications Of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. **Journal Of Nutrition And Metabolism**; 2012, Article ID 539426, 16 Pages Doi:10.1155/2012/539426

PERINI, J. A. L; STEVANATO, F. B; SARGI, S. C. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta immune. **Rev. Nutr.**, Campinas, 23(6):1075-1086, nov./dez., 2010

PETIT, H. V., R. J. DEWHURST, J. G. PROULX, M. KHALID, W. HARESIGN, AND H. TWAGIRAMUNGU. 2001. Milk Production, Milk Composition, And Reproductive Function Of Dairy Cows Fed Different Fats. Canadian. **Journal of Animal Science** 81:263–271.

SAS INSTITUTE. SAS user's guide: statistics, version 9.0. **Cary: SAS Institute**, 2002.

SALDANHA, T.; MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N.; **Ciência e Tecnologia Alimentar**. 2004, 24, 109.

SHINGFIELD, K. J., Y. CHILLIARD, V. TOIVONEN, P. KAIRENIUS, AND D. I. GIVENS. 2008. *Trans-Fatty Acids And Bioactive Lipids In Ruminant Milk*. **Adv. Exp. Med. Biol.** 606:3–65.

SMITH, W. A. Fats For Lactating Dairy Cows. In: CONGRESS OF THE SOUTH AFRICAN SOCIETY OF ANIMAL PRODUCTION, 1990, Stellenbosch. **Anais... Animal Production**. Stellenbosch: University Of Stellenbosh, 1990.

SNIFFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J. et al. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability **Journal Animal Science**, Illinois, v.70, p. 3562-3577, 1992.

TSIPLAKOU, E., AND G. ZERVAS. 2013. The Effect Of Fish And Soybean Oil Inclusion In Goat Diet On Their Milk And Plasma Fatty Acid Profile. **Livestock Science**. 155:236–243.

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

WELTER, Katiéli Caroline. **Efeito da inclusão de óleo de canola na dieta de vacas em lactação**. 2015. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Produtividade Animal) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2015. doi:10.11606/D.74.2015.tde-31032015-092234. Acesso em: 2019-01-14.