

CYBELE EMÍLIA DE ARAÚJO

Fontes de ácidos graxos ω -6 na alimentação de vacas leiteiras

Pirassununga

2013

CYBELE EMÍLIA DE ARAÚJO

Fontes de ácidos graxos ω -6 na alimentação de vacas leiteiras

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

Departamento:
Nutrição e Produção Animal.

Área de Concentração:
Nutrição e Produção Animal

Orientador:
Prof. Dr. Francisco Palma Rennó

Pirassununga

2013

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.2859
FMVZ

Araújo, Cybele Emília de
Fontes de ácidos graxos ω -6 na alimentação de vacas leiteiras. / Cybele Emília de Araújo. -- 2013.
83 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Nutrição e Produção Animal, Pirassununga, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Nutrição e Produção Animal.

Área de concentração: Nutrição e Produção Animal.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Palma Rennó.

1. Vacas leiteiras. 2. Lipídios. 3. Produção e composição do leite. 4. Digestibilidade. 5. Parâmetros sanguíneos. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Fontes de gordura na alimentação de vacas leiteiras", protocolado sob o nº 2965/2013, utilizando 16 (dezesesseis) bovinos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 10/4/2013.

We certify that the Research "Feeding dairy cows with different fat sources", protocol number 2965/2013, utilizing 16 (sixteen) dairy cows, under the responsibility Prof. Dr. Francisco Palma Rennó, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/10/2013.

São Paulo, 15 de abril de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ARAÚJO, Cybele Emília de

Título: Fontes de ácidos graxos ω -6 na alimentação de vacas leiteiras

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Ao meu pai Cyll e minha mãe Iná:

“Eu tenho tanto pra lhe falar,
Mas com palavras não sei dizer,
Como é grande o meu amor por você.
E não há nada pra comparar,
Para poder lhe explicar,
Como é grande o meu amor por você.”

Roberto Carlos

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por mais uma conquista alcançada, por estar sempre ao meu lado me dando suporte e me guiando para as melhores escolhas e que nos momentos mais difíceis me levantou para seguir em frente.

Agradeço de todo o meu coração meus pais Cyll e Iná que são meus exemplos de vida e amor e que sempre me apoiam em todas as minhas escolhas, e minhas irmãs Francielli e Tamyê que sempre quando precisei estiveram dispostas a me ouvir e me ajudar. Não tem palavras que possam traduzir o quanto vocês são importantes para mim. Amo muito vocês!

À minha segunda família, meu padrinho Delton, minha madrinha Helena, e minhas afilhadas Geovana e Paola pelo carinho, amor e refúgio quando precisei.

Agradeço a família Valeriano que me acolheram com muito carinho, muito obrigada por tudo Nereide, José Maria, Wellington, Renata, Márcio, Beatriz, Isabella, Laurinha, Pietro e João Vitor. E principalmente ao Diego pelo companheirismo, amizade, carinho, amor, conselhos e por sempre estar ao meu lado nos bons e maus momentos, você é muito especial.

Aos meus amigos Josiane, Saulo, Mariela, Lorena e Marcela Cecília, obrigada pelo apoio, por sempre me ouvirem e pelos conselhos. Vocês são a prova que amigo não precisa ser aquele que está do nosso lado todos os dias, e sim aquele que sabe quando o outro precisa de ajuda, conselhos e carinho e entendem a ausência temporária. Muito obrigada por ser amiga de vocês.

À minha amiga Gabriella pela amizade, convivência, conselhos e por sempre estar presente nos momentos mais alegres e mais tristes durante o período em que moramos juntos.

À Universidade Federal de Uberlândia, à Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV), onde concluí a graduação e à todos os professores que tive a oportunidade de conhecer e aprender, principalmente às Prof.^a Terezinha e Alessandra duas grandes amigas, ao Prof.^o Robson que me apresentou ao meu atual orientador, e aos meus ex-orientadores Frederico Ozanam e Anna Lima que me apresentaram a pesquisa, me deram oportunidade de aperfeiçoar durante a graduação para chegar até aqui e me incentivaram a seguir a carreira

acadêmica. Tenho muito orgulho de ter sido orientada de vocês e que além de professores foram grandes amigos.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

Agradeço a empresa Dalquim-Nutriacid Nutrição e Ciência pelo financiamento do projeto, que possibilitou a condução desse estudo.

Ao meu orientador Prof. Francisco Palma Rennó pela oportunidade, orientação, conhecimento e experiência. Obrigada por ter aberto as portas do laboratório onde eu pude crescer muito como profissional e como pessoa.

Aos colegas de grupo de pesquisa Rodolfo, Gustavo Almeida, Tiago Del Valle, Filipe, Thiago Vendramini, Rafael Barletta, Jefferson Gandra, Vitor, Pablo, Elmeson, Gustavo Calomeni, Rodrigo, Lenita e Taissa pelo convívio e amizade durante todo esse tempo.

Em especial, agradeço ao Jeff (Gordim), Rafael (Bisão) e Vitor (Vitones). Não tenho palavras para descrever o quanto vocês três foram importantes para a condução de todo o experimento tanto no manejo, análises laboratoriais e orientação. Aprendi muito com vocês não só no âmbito profissional, mas também como pessoa. Vocês foram fundamentais por todo o meu crescimento durante esse período e sou muito feliz por ser além de colega de grupo também amiga de vocês. Obrigada pelos momentos bons e por serem meu suporte nos momentos mais difíceis. Muito Obrigada!!

À Coisa (Thaila), um anjo que ganhei de presente e que tive a oportunidade de trabalhar. Você foi essencial durante todo o projeto tanto no manejo e laboratório, mas principalmente por ter me ajudado a segurar a barra quando precisei. Muito obrigada por ter feito parte da sua vida, pela sua amizade, pelo seus conselhos, broncas, pelo seu ouvido, pelo colos e por todo o carinho. Amo Você!

Às companheiras de Laboratório Taissa e Lenita pela ajuda durante as análises, risadas e amizade durante esse período.

Às ex colegas de pós graduação Ana Paula e especialmente a Mayara e a Beatriz (Bixuca) pela amizade, aprendizado carinho e por terem me dado um lar quando cheguei em Pirassununga.

Aos novos funcionários Paulo, Lucas, Filipe e Schimit e aos antigos funcionários do LPBL Lenon, Lupércio (Toco), em especial ao Diogo que sempre segurou as pontas, ao Tio Carlão (*in memoriam*) exemplo de vida e alegria, e ao João (Jota) pelo cafezinho de manhã, torradinha e pipoca que sempre fazia nossa alegria depois de uma manhã pesada do manejo. Muito obrigada, vocês foram essenciais para a condução desse projeto.

À todos os estagiários de iniciação científica que tive o prazer de conhecer e trabalhar durante o projeto, meu muito obrigado aos antigos IC's Thiago Vendramini (Catimbó), Caio (Bumba Cabeção), Natasha (Remenda) e aos atuais, Arthur (Faverólis), Victor (Matraca), Mariana (Mel), Kaori (Cala Boca), Guilherme (Urubu), Dado e Barrosã. Em especial á Karen (Japa), Bruna (Baranga), Vanessa (Finfa), Karla (Pink) pela ajuda, pela amizade, carinho, paciência, conselhos e por me aguentarem durante todo esse tempo.

As meninas da república Marofa (FZEA) Liz (Faísca), Camila (BV), Coloral, Klin, Dani e Thaila (Coisa), muito obrigada pela amizade, carinho, risadas, festas e principalmente por ter aberto as portas da casa, onde eu me sentia no meu segundo lar.

Agradeço também aos estagiários da 76ª Medicina Veterinária especialmente a Cala Boca, Saravá, Xodó, Zê, Carol, Carla, Fura, Celina e Débora.

À todos os professores do departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, em especial aos professores Luis Felipe, Paulo Mazza, Marcos Veiga e Angélica Pereira, por todos os ensinamentos e pelo convívio.

Aos colegas da pós graduação do departamento de nutrição em especial a Jú Diniz, Flávio Perna, Larissa, Luciano, Bruno (Papi) ,Esther, Maurício, Eduardo (Frodo), Tiago

Tomazi, Marcos, Cristian, Marina (Nina), Danyllo, Tainá, Alejandro, Frederich, Filipe, Laura pela amizade.

Aos funcionários do VNP, em especial à Alessandra, a Fábria e ao João Paulo que sempre ajudaram quando preciso.

Ao Ari, Gilson e Simi funcionários do Laboratório de Bromatologia do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, pelo auxílio na realização das análises laboratoriais.

À Lucinéia Mestieri, funcionária do Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, pelo imprescindível auxílio na realização das análises laboratoriais.

Aos funcionários da Fábrica de Ração da PCAPS, especialmente ao Seu Cláudio e Israel que me ajudaram durante todas as semanas.

Aos funcionários da Segurança da USP, especialmente os que trabalham na portaria e principalmente pelas trufas que fazia meu dia ficar melhor.

Aos funcionários da empresa HIGLIMP, especialmente a Suélen, Dona Dalva e a Cris, que além de cuidar da limpeza do laboratório também foram amigas e bons ouvidos quando precisei desabafar.

Agradeço por último e mais importante os animais do LPBL utilizadas para todos os experimentos, principalmente as vacas utilizadas no projeto e que mesmo sem falar a língua dos homens souberam demonstrar sentimentos e colaboraram muito para a execução dessa pesquisa. Muito obrigada principalmente á 31, 32 (Raposinha), 33, 34 (Cara de cavalo), 36, 39, 41, 42, 43 (*in memoriam*), 44, 596, 991 (*in memoriam*), 1109, 1136 e 1186.

À todos vocês só tenho a agradecer e dizer que:

“O universo sempre nos ajuda a lutar por nossos sonhos. Porque são nossos sonhos, e só nós sabemos o quanto nos custa sonhá-los.”

(Paulo Coelho)

“Passei a vida tentando corrigir os erros que cometi na minha ânsia de acertar.”

(Clarice Lispector)

RESUMO

ARAÚJO, C. E. **Fontes de ácidos graxos ω -6 na alimentação de vacas leiteiras.** [Sources ω -6 fatty acids in dairy cow diets.]. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de diferentes fontes de ácidos graxos ω -6 na suplementação de vacas em lactação sobre o consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes, fermentação e síntese proteína microbiana ruminal, produção e composição do leite, parâmetros sanguíneos e balanço de energia e nitrogênio. Foram utilizadas 16 vacas da raça Holandesa, agrupadas em quatro quadrados latinos 4x4, balanceados e contemporâneos, recebendo as seguintes dietas: 1) Controle; 2) Óleo de Soja; 3) Sais de cálcio de ácidos graxos (MEGALAC-E®, Química Geral do Nordeste e Arm & Hammer, Inc.); e 4) Sais de cálcio de ácidos graxos, (LACTOPLUS®, Dalquim-Nutriacid Nutrição e Ciência). As dietas 2, 3 e 4 receberam a inclusão de 3% das fontes de ácidos graxos ω -6 na dieta, e a forragem usada no experimento foi silagem de milho. A produção de leite e o consumo de matéria seca foram mensurados diariamente durante todo o período experimental, mas somente os últimos sete dias foram usados para os cálculos. A digestibilidade foi determinada utilizando o indicador interno FDAi. As amostras utilizadas para análise da composição do leite foram coletadas no 16º dia de cada período experimental, sendo provenientes das duas ordenhas diárias. As amostras de sangue foram coletadas em tubos vacuolizados por punção da veia e/ou artéria coccígea. As amostras de líquido ruminal foram coletadas com a utilização de sonda esofágica três horas após a alimentação matinal. Houve redução no consumo de matéria seca para as dietas com adição de ácidos graxos em relação à dieta controle. O consumo matéria orgânica, fibra detergente neutro e carboidratos não fibrosos diminuíram quando adicionado lipídios nas dietas experimentais. O consumo de proteína bruta foi maior para a dieta controle, e entre as fontes de ácidos graxos a dieta com óleo de soja apresentou menor consumo de proteína bruta que as dietas com sais de cálcio. Ainda, as dietas com adição de ácidos graxos apresentaram maior consumo de extrato etéreo, e as fontes de sais de cálcio tiveram redução no consumo de extrato etéreo em relação à dieta com óleo de soja. Não foi observado efeito para o consumo de NDT entre as dietas experimentais, no entanto o consumo de energia líquida de lactação foi maior para as dietas com ácidos graxos em relação a dieta controle. A digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, fibra detergente neutro e carboidratos não fibrosos não foram influenciadas pela adição de lipídios na dieta. A digestibilidade do NDT apresentou efeito da adição de lipídios e as dietas contendo ácidos graxos tiveram maiores

coeficientes de digestibilidade em relação à dieta controle. Não houve efeito dos tratamentos nos valores de pH ruminal na concentração de nitrogênio amoniacal ruminal e na fermentação ruminal. A produção de leite e produção de leite corrigida (kg/dia) para gordura não apresentaram efeito das dietas experimentais, assim como a concentração e rendimento de lactose. A produção de gordura (kg/dia) foi menor para a dieta com óleo de soja em relação à dieta com sais de cálcio, no entanto a porcentagem de gordura no leite não foi influenciada pelas dietas experimentais. A produção de proteína (kg/dia) também não sofreu alteração pelos tratamentos, no entanto a concentração de proteína foi menor para a dieta com óleo de soja do que as demais. As dietas experimentais não influenciaram a síntese de proteína microbiana. O balanço de energia não teve efeito de tratamento. O consumo de nitrogênio e a excreção de fezes (g/dia) foram maiores para a dieta controle em relação às dietas com fontes de ácidos graxos e a dieta com óleo de soja apresentou menor consumo de nitrogênio do que as dietas com sais de cálcio, no entanto o balanço de nitrogênio não apresentou efeito. As concentrações de colesterol total e colesterol-HDL foram maiores para as vacas alimentadas com rações contendo ácidos graxos. A utilização de ácidos graxos insaturados ω -6 nas dietas experimentais de vacas em lactação alterou o consumo e digestibilidade dos nutrientes, a produção de gordura, composição proteica do leite e as concentrações de colesterol e HDL-colesterol.

Palavras-chave: Vacas leiteiras. Lipídios. Produção e composição do leite. Digestibilidade. Parâmetros sanguíneos.

ABSTRACT

ARAÚJO, C. E. **Sources ω -6 fatty acids in dairy cow diets.** [Fontes de ácidos graxos ω -6 na alimentação de vacas leiteiras]. 2013. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

The objective of this study was to examine the effect of feeding diets containing fat supplements ω -6 dairy cows on intake and nutrients digestibility, ruminal fermentation, microbial protein synthesis, composition and milk yield, metabolite concentration in blood and liver tissue, and balance of energy and nitrogen. Sixteen midlactation Holstein cows (180 \pm 20 days in milk) were used four 4 x 4 Latin square balanced, for carry over effect, with 21 days of experimental period. Cows were fed with the following diets: 1) control (C) without fat source; 2) refined soybean oil (SO); 3) calcium salts of unsaturated fatty acids (CSFA1) (MEGALAC-E [®]); 4) calcium salts of unsaturated fatty acids (CSFA2) (LACTOPLUS[®]). Diets 2, 3 and 4 received inclusion of 3% of the sources of ω -6 fatty acids, and the forage used during the experiment was corn silage. Milk yield and dry matter intake was measured daily throughout the experimental period, but the last seven days were used to calculate. Digestibility was determined using the internal indicator ADFi. The samples used for analysis of milk composition were collected on the 16th day of each experimental period, and from the two daily milkings. Blood samples for analysis of blood metabolites were collected in tubes vacuolated by vein puncture and/or coccygeal artery, the 16th experimental day. The samples of ruminal liquid were collected with use of esophageal probe three hours after the morning feeding. There was a reduction in dry matter intake for diets with added fatty acids compared to the control diet. The consumption of organic matter, neutral detergent fiber and non-fiber carbohydrates decreased when added lipids in experimental diets. The crude protein intake was higher for the control diet, and between sources of fatty acid diet with soybean oil consumption had lower crude protein diets with calcium salts. Although, diets with added fatty acids were more intake of ether extract, and sources of calcium salts decreased the ether extract intake in relation to diet with soybean oil. No effect was observed for TDN intake among diets, however the net energy of lactation was higher for diets containing fatty acids compared to control diet. The digestibility of dry matter, organic matter, crude protein, neutral detergent fiber and non-fiber carbohydrates were not influenced by the addition of lipids in the diet. The digestibility of TND had effect of the addition of lipids and fatty diets had higher digestibility compared to the control diet. There were no treatment effects on ruminal pH, ammonia concentration in the rumen and ruminal fermentation. The milk production and milk

production corrected (kg / day) had no effect to the fat diets, and the content and yield of lactose. The fat production (kg / day) was lower for the diet with soybean oil in relationship to diet with calcium salts, however the percentage of milk fat was not influenced by the experimental diets. The protein yield (kg / day) also did not change by the treatments, though the protein concentration was lower for the diet with soybean oil than others. The experimental diets did not affect the synthesis of microbial protein. The balance of energy had no effect of treatment. The nitrogen intake and fecal excretion (g / day) were higher for the control diet compared to diets with sources of fatty acids and soybean oil diet had lower nitrogen consumption of the diets with calcium salts, however nitrogen balance had no effect. The concentrations of total cholesterol and HDL cholesterol were higher for cows fed diets containing fatty acids. The utilization of ω -6 unsaturated fatty acids in the experimental diets for lactating cows alter the intake and digestibility of nutrients, fat production, milk protein composition and concentrations of cholesterol and HDL-cholesterol.

Keywords: Dairy cows. Lipids. Production and milk composition. Digestibility.

Blood parameters.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição química e bromatológica, nutrientes digestíveis totais (NDT), energia líquida de lactação (EL _L), e energia bruta (EB) dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais. ...	44
Tabela 2 – Composição química bromatológica dos concentrados experimentais.....	45
Tabela 3 – Composição química bromatológica das dietas experimentais	46
Tabela 4 - Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) do consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e nutriente de acordo com as dietas experimentais	58
Tabela 5 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros de fermentação ruminal em função das dietas experimentais	61
Tabela 6 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) da síntese de proteína microbiana em função das dietas experimentais.	63
Tabela 7 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) para balanço de nitrogênio em função das dietas experimentais.	65
Tabela 8 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) para o balanço de energia em função das dietas experimentais.....	67
Tabela 9 – Médias e erro padrão da média (EPM) da produção e composição do leite em função das dietas experimentais.....	69
Tabela 10 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) dos metabólitos plasmáticos em função das dietas experimentais	71

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	HIPÓTESE	22
3	OBJETIVOS	23
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
4.1	FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS	24
4.1.1	Óleo de Soja.....	27
4.1.2	Sais de cálcio de ácidos graxos.....	29
4.2	INFLUÊNCIA DOS ÁCIDOS GRAXOS DA FAMÍLIA $\omega 6$ NO DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS	32
4.2.1	Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes.....	32
4.2.2	Produção e composição do leite	35
4.2.3	Fermentação ruminal	37
4.2.4	Síntese de proteína microbiana ruminal, balanço de energia e balanço dos compostos nitrogenados.....	38
4.2.5	Perfil metabólico.....	40
5	MATERIAL E MÉTODOS	42
5.1	Local, instalações e animais	42
5.2	Dietas experimentais.....	42
5.3	Análise de alimentos	47
5.4	Digestibilidade aparente total	47
5.5	Balanço de energia.....	48
5.6	Balanço de nitrogênio	49
5.7	Fermentação ruminal	50
5.8	Síntese de proteína microbiana ruminal	52

5.9	Produção e composição do leite	53
5.10	Parâmetros sanguíneos.....	54
5.11	Avaliação do escore de condição corporal e peso corporal.....	54
5.12	Análises estatísticas	55
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
6.1	Consumo e digestibilidade.....	56
6.2	Fermentação ruminal	60
6.3	Síntese de proteína microbiana.....	62
6.4	Balanço de nitrogênio	64
6.5	Balanço de energia.....	66
6.6	Produção e composição do leite	68
6.7	Parâmetros sanguíneos.....	70
7	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

O consumo de energia é a principal limitação para a produção de leite, sendo determinado pela concentração energética da dieta e por sua taxa de consumo. A utilização de diferentes fontes de ácidos graxos nas dietas de vacas leiteiras tem sido prática comum na alimentação, principalmente por permitir melhoria do status energético desses animais.

A suplementação de vacas em lactação promove um aumento da densidade energética da dieta sem reduzir o seu conteúdo de fibras e, dessa forma, proporciona um maior consumo de energia refletindo em aumento na produção de leite decorrente da melhora na eficiência de utilização dos ácidos graxos dietéticos, conseqüente de menores perdas energéticas durante seu metabolismo.

Para poder utilizar lipídios nas dietas deve se ter atenção para alguns pontos, pois segundo o NRC (2001), as respostas produtivas a suplementação de ácidos para vacas em lactação são dependentes da dieta basal (especialmente o volumoso), estágio de lactação, balanço energético, composição e quantidade da fonte de ácidos graxos utilizada. Portanto, se não respeitadas essas condições, pode ser que a resposta à suplementação dos ácidos graxos não ofereça melhora no desempenho produtivo.

Uma das razões para as diferentes respostas à suplementação de ácidos graxos dietéticos para vacas em lactação são as alterações no consumo de matéria seca quando é iniciada a suplementação, especialmente quando são comparadas diferentes fontes de lipídios (NRC, 2001). Se houver redução de consumo, e a magnitude dessa redução for suficiente para reduzir o consumo diário de energia, não são observadas respostas significativas da adição de ácidos graxos nas dietas de vacas leiteiras. Dessa forma, para que as fontes de lipídios sejam benéficas, estas não devem alterar a fermentação ruminal e, ao mesmo tempo, o consumo de matéria seca e o teor de gordura do leite.

Inúmeras são as fontes de ácidos graxos com potencial para uso como suplemento na dieta de vacas em lactação, dentre elas têm-se o uso de sementes oleaginosas como o grão de soja, semente de linhaça e semente de girassol que podem ser oferecidas *in natura* ou na forma de óleos. Ainda, os ácidos graxos podem ser fornecidos na forma de triglicerídeos, sebo animal e óleo de peixe, porém essas duas últimas fontes são proibidas para uso na alimentação animal no Brasil. Outra opção para o uso de ácidos graxos são as fontes inertes no rúmen, na

forma de sais de cálcio de ácido graxo, como o sais de cálcio de óleo de soja, óleo de palma e óleo de linhaça, por exemplo.

Recentemente, o surgimento de pesquisas demonstrando os benefícios de serem incorporadas as dietas de vacas em lactação fontes insaturadas de ácidos graxos, especialmente fontes ricas nos ácidos graxos poliinsaturados linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3), possibilitaram à indústria de alimentação animal o desenvolvimento de produtos com ácidos graxos complexados ao cálcio formando os sais de cálcio. Entre as fontes de lipídios ricas em ácidos graxos poliinsaturados utilizadas na dieta animal, destaca a utilização do óleo de soja, seja na forma não processada, como óleo degumado ou refinado, ou na forma processada, como sais de cálcio.

Os sais de cálcio normalmente são fontes de ácidos graxos complexadas com cálcio, processados de forma a apresentarem menor interferência nos processos fermentativos em nível de rúmen. Normalmente, as fontes de lipídio não processadas apresentam atividade de biohidrogenação ruminal de 80 a 90% dos ácidos graxos consumidos, enquanto que os sais de cálcio de ácidos graxos apresentam somente cerca de 30 a 40% de biohidrogenação nos ácidos graxos (Klusmeyer & Clark, 1991). Assim, apesar dos sais de cálcio apresentarem potencial de redução do CMS, em nível de rúmen, provavelmente apresentam menor interferência nos processos digestivos.

2 HIPÓTESE

A hipótese científica avaliada neste experimento é que a fonte de ácidos graxos ω -6 protegida ou não por sais de cálcio em dietas de vacas em lactação tem influência positiva no desempenho produtivo, digestão e metabolismo.

3 OBJETIVOS

Objetivou-se avaliar os efeitos de diferentes fontes de ácidos graxos ω -6 na suplementação de vacas em lactação sobre o consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes, fermentação e síntese de proteína microbiana ruminal, produção e composição do leite, parâmetros sanguíneos, balanço de energia e nitrogênio.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS NA ALIMENTAÇÃO DE VACAS LEITEIRAS

Gordura é a denominação genérica usada para compostos que possuem ácidos graxos de cadeia longa. Ácidos graxos são compostos formados por cadeia longa de hidrocarbonetos, apresenta normalmente 22 átomos de carbono e uma estrutura terminal com grupo carboxila. Esses podem ser encontrados nos sistemas biológicos fazendo parte das membranas dos tecidos e também atuam como precursores da regulação do metabolismo. Normalmente estão ligados a moléculas glicerol ou outras estruturas que se ligam ao carbono terminal (LEHNINGER, 2005).

Os ácidos graxos podem ser classificados conforme: o comprimento da cadeia e o grau de insaturação (sendo os ácidos graxos poli-insaturados na maioria formados por duas ligações metilênicas) que tem influência nas características químicas e funções biológicas; geometria de insaturação (*cis* ou *trans* e tem influência no formato da cadeia); ramificação (iso ou ante-iso); dieno conjugado (composto por duas duplas ligações adjacentes sem ligação metilênica); e de acordo com a família n (“ ω ” ou “ômega”) que determina a essencialidade do ácido graxo (PALMQUIST e MATTOS, 2006).

Nutricionalmente os lipídios podem ser agrupados em: lipídios de reserva, que são principalmente triglicerídeos em grãos de cereais e oleaginosas; lipídios de membranas como os galactolipídios e fosfolipídios que representam os lipídios das plantas forrageiras; e por fim em uma mistura heterogênea de outras estruturas moleculares solúveis em éter como as ceras, carotenoides, clorofila, entre outros (KOZLOSKI, 2011).

O lipídio tem 2,25 vezes mais conteúdo energético que os carboidratos e as proteínas (VARGAS, 2002), o que equivale a 9,0 Mcal/Kg, mas isso desde que seja absorvida e disponível para ser metabolizada. Dessa forma, a variação existe em função da digestibilidade de cada fonte de lipídio utilizada na alimentação dos animais.

As dietas de ruminantes caracterizam-se por conter baixos níveis de lipídios, normalmente menor que 3% enquanto que a quantidade de ácidos graxos varia de 18 à 40% em sementes oleaginosas que podem ser usadas como suplementos na alimentação. Existe uma variação do tipo de ácido graxo para cada alimento. Em cereais, e na maioria das sementes oleaginosas, há predominância de ácido linoléico (C18:2 ω -6), enquanto em

frragens o ácido graxo mais comum é o α -linolênico (C18:3 ω -3). Algumas exceções ocorrem, como óleo de palma (rico em C16:0), óleo de canola (C18:1 ω -9) e o óleo de linhaça (C18:3 ω -3) (PALMQUIST; MATTOS, 2006).

O uso de lipídios na alimentação de vacas leiteiras tem sido recomendado para aumentar a densidade energética das dietas e evitar os efeitos prejudiciais de altas quantidades de concentrados ricos em amido sobre o ambiente ruminal (Doreau; Chilliard, 1997). De acordo com Weiss et al. (2011), para suplementar com fontes de lipídios deve-se levar em consideração as diferenças entre as fontes de energia no consumo de matéria seca, a energia bruta e digestibilidade do suplemento e o efeito na digestibilidade dos outros componentes da dieta.

Os lipídios também têm potencial para melhorar a eficiência de utilização da energia, uma vez que os ácidos graxos pré-formados de origem dietética são incorporados diretamente no lipídio do leite, sem a perda de calor associada à síntese de ácidos graxos, poupando energia para outras funções produtivas da glândula mamária e melhorando a eficiência na produção de ATP a partir de ácidos graxos de cadeia longa em comparação ao acetato, fonte energética fundamental nos ruminantes (Doreau et al., 1991; Chilliard, 1993; Garnsworthy, 1997)

Para aumentar a concentração energética da dieta, é necessário aumentar a proporção de alimentos concentrados. Contudo, o fornecimento máximo de concentrado deve ser limitado, respeitando a necessidade de um mínimo de fibra para o funcionamento ideal do ambiente ruminal e manutenção dos teores de gordura do leite (Vargas et al., 2002). O aumento do nível de energia pelo uso de lipídios é especialmente importante na fase inicial da lactação, em que o consumo de alimentos é limitado pelo stress pós-parto (15% em média), evitando, assim, a perda de peso, o balanço energético negativo e, conseqüentemente, a redução da produção total de leite na lactação e a baixa eficiência reprodutiva (GRUMMER et al., 1990; SANTOS et al., 2006).

Wu et al. (1991) e Gagliostro e Chilliard (1992) afirmaram que o fornecimento de fontes lipídicas na dieta leva a grande variação de produção de leite, justificando o fato pelos diferentes estados fisiológicos que se encontram as vacas, ao tipo de volumoso que é disponibilizado como dieta basal, à quantidade de energia total consumida pelo animal quando suplementado e à quantidade e composição da fonte de lipídios utilizados na dieta. Segundo Scott et al. (1995), essa variação na produção encontra-se entre -4,4 a 9,6 kg/dia de leite/kg de lipídios adicionados à dieta.

Allen (2000) relatou que a principal desvantagem da utilização de ácidos graxos insaturados em dietas de ruminantes se deve ao efeito sobre o consumo que reflete sobre a produção de leite, e sugere que a redução do consumo provocado por dietas ricas em lipídios se deve a fatores metabólicos e não a digestibilidade ruminal da fração fibrosa, que é pouco afetada quando for fornecido com até 50% de forragem (Bateman; Jenkins, 1998). Embora a concentração energética em lipídios seja maior que em carboidratos e proteínas, elevadas quantidades de lipídios além de reduzir o consumo, diminui a quantidade de energia ingerida (NRC, 2001).

Outro ponto a ser discutido quando se oferece dietas ricas em lipídios refere-se ao efeito na microbiota do rúmen. Quando é fornecido suplementos lipídicos insaturados em doses elevadas, ocorre um efeito tóxico sobre as bactérias grampositivas do rúmen, principalmente na população celulolítica (Nagaraja et al., 1997). Consequentemente ocorre alteração da relação acetato:propionato, aumentando a produção de propionato as custas do acetato, levando a redução de metano e de amônia ruminal (Jenkins, 1993).

A eficiência da síntese microbiana, por vezes, é aumentada à medida que os lipídios substituem parte do concentrado na dieta (EIFERT et al., 2006). Nagaraja et al. (1997), exemplificam essa afirmação com o uso de óleo de soja nas dietas e seu efeito defaunatório, que viabiliza maior crescimento bacteriano, em virtude da menor predração. Ainda, a influência dos lipídios sobre os microorganismos ruminais depende da quantidade ingerida, da presença de ácidos graxos livres, e da sua capacidade de formar uma barreira física sobre o alimento para dificultar a colonização microbiana (PALMQUIST, 1989; JENKINS, 1995; SANTOS et al., 2001).

Vacas de alta produção de leite necessitam de grande demanda energética no início da lactação para amenizar o balanço energético negativo, consequente da ingestão insuficiente de alimentos, necessária para manutenção dos tecidos e da produção de leite (Block et al., 2001; Grummer et al., 2004). Como solução têm se utilizado fontes lipídicas na dietas de vacas em lactação fornecendo maior aporte energético sendo uma das opções a suplementação de alimentos ricos em ácido linoléico (C18:2 n-6) ou também conhecido como ácidos graxos ω 6.

Em cereais, e na maioria das sementes oleaginosas, há predominância de ácido linoléico (PALMQUIST; MATTOS, 2006). As fontes mais utilizadas de ácidos graxos ω 6 e ω 3 são sementes de oleaginosas e sais de cálcio de ácidos graxos, que podem ser utilizados como agentes nutraceuticos em vacas leiteiras no período de transição e início de lactação (GANDRA, 2012).

Ácidos graxos com insaturação conjugada não são normalmente constituintes da dieta do rebanho leiteiro e quando adicionados AG insaturados na dieta de vacas lactantes, aumentam de forma natural os compostos conjugados, como o ácido linoléico conjugado (SANTOS et al., 2001b) que está presente em altas concentrações na gordura do leite (PARODI, 1994).

4.1.1 Óleo de Soja

O uso de óleos nas dietas de vacas leiteiras tem potenciais efeitos sobre o metabolismo ruminal (BAUMAN e GRIINARI, 2001). O óleo de soja possui em torno de 75% de ácidos graxos insaturados em sua composição, de modo que estes podem atuar na diminuição da produção de metano e do aumento da produção de CLA no leite (ALLEN, 2000; ONETTI; GRUMMER, 2004; PALMIQUIST; MATTOS, 2006).

Seu uso em dietas para ruminantes, segundo Lin et al. (1995) apresenta efeitos positivos na produção e desempenho animal como inibição da produção de metano, redução da concentração de NH₃ ruminal, aumento na eficiência da síntese de proteína microbiana ruminal e aumento de ácido linoléico conjugado (CLA) no leite. Entretanto, Vargas et al. (2002) afirmaram que o uso de óleo de soja apresenta desvantagens como redução na digestibilidade da matéria seca, e na relação acetato propionato, diminuindo o teor de gordura do leite.

Eifert et al. (2006) em seu estudo comparando diferentes fontes de amido com a inclusão (2,25%) ou não de óleo de soja nas dietas de vacas em lactação afirmou que a inclusão de óleo de soja na dieta diminui o consumo e mantém o nível de produção, aumentando a eficiência alimentar e alterando a composição do leite. De acordo com Onetti et al. (2001) a utilização de óleo de soja nas dietas de vacas no início da lactação não tem apresentado reduções no consumo de matéria seca, sendo essa resposta ligada a qualidade da FDN da forragem e da relação volumoso:concentrado.

Segundo Ben Salem et al. (1993), óleos reduzem a digestibilidade aparente total de carboidratos quando se fornece silagem de milho como volumoso quando comparado com feno de gramíneas. Assim, os efeitos de ácidos graxos insaturados podem ser variáveis devido às diferenças na dieta basal (UEDA et al., 2003). Ainda, Allen (2000) enfatiza que respostas

diferentes são esperadas com diferentes suplementos de ácidos graxos, pois os efeitos da suplementação são inerentes às características físicas e químicas específicas dos ácidos graxos suplementados.

Ao avaliar a suplementação na dieta com óleo de soja (4,6% na MS) para vacas em lactação, Vargas et al. (2002) concluíram que ácidos graxo insaturados na dieta levaram a uma redução na relação de acetato:propionato por estimulação das bactérias produtoras de propionato. Santos et al. (2001) utilizando a mesma porcentagem de inclusão do óleo de soja encontraram aumento significativo no teor de ácido linoleico conjugado no lipídio do leite.

A utilização de óleos insaturados tem efeitos sobre a população microbiana ao alterar a atividade da população celulolítica, influenciando a digestibilidade ruminal da fibra (Jenkins, 1993; Eifert et al., 2005). Assim, Eifert et al. (2006) afirmaram que o óleo de soja pode apresentar efeitos diferentes aos grãos de soja extrusados, principalmente sobre a atividade das bactérias ruminais, como *Butyrivibrio fibrisolvens*, alterando a formação de CLA e o processo de biohidrogenação.

Utilizando como volumoso silagem de milho e feno de alfafa e inclusão de 5% de óleo de soja na matéria seca total em dietas de vacas no terço médio da lactação, Huang et al. (2008) verificaram que ocorreu pouco ou nenhum efeito sobre a fermentação ruminal e destacou que a fonte de lipídio utilizada é a melhor opção para melhorar a produção de ácido linoleico do leite. Santos et al. (2009) suplementando vacas no período de transição, utilizaram 3% de óleo de soja no concentrado e verificaram que os ácidos graxos insaturados não influenciaram o consumo e o desempenho produtivo, mas aumentou a ingestão de energia e melhorou o balanço de nutrientes durante o início da lactação.

Ueda et al. (2003) enfatizaram que se têm poucas informações sobre o uso de óleos na digestibilidade de vacas leiteiras lactantes, já que a inclusão de níveis de 2% a 3% de óleo na matéria seca total da dieta tem importância prática. Pode haver diminuição da taxa de passagem, de forma que ocorra aumento do aproveitamento da fibra da dieta, influenciando também o consumo de energia líquida (JENKINS, 1993).

Bu et al. (2007) comparando óleo de soja com óleo de semente de linhaça com inclusão de 4% na matéria seca da dieta, encontrou melhor resultado para suplementação com ácido linoleico, aumentando o CLA nos ácidos graxos do leite. Dhiman et al. (2000) estudando essas duas fontes de ácidos graxos, encontraram resultados semelhantes em relação ao CLA e ainda uma diminuição no teor de gordura do leite para ambos, sendo maior para o óleo de semente de linhaça.

4.1.2 Sais de cálcio de ácidos graxos

Vacas no início da lactação possuem maior mobilização de reservas corporais para atender suas necessidades energéticas. Suplementação de fontes lipídicas nas dietas de vacas em lactação corresponde a uma alternativa para animais de alta produção por causa da elevada densidade energética, amenizando o balanço energético negativo no início da lactação, e como opção para superar as limitações das dietas com grande quantidade de grãos (WEST; HILL 1990; CHOUINARD; GIRARD; BRISSON 1998).

Quanto às fontes, segundo o NRC (2001), lipídios inertes (protegidos) no rúmen, como sais de cálcio de ácidos graxos, têm sido uma boa opção e seu uso pode se tornar rotineiro em muitos sistemas de produção. O uso do lipídio protegida na produção leiteira tem sido estudada por apresentar também vantagens no ponto de vista econômico, pois é alternativa para o produtor para amenizar os aumentos no custo dos insumos e a redução das margens de lucro da atividade leiteira (NÖRNBERG et al., 2006).

Diversos tipos de suplementos comerciais contendo lipídios inertes no rúmen estão disponíveis no mercado. O mais comum deles são os sais de cálcio de ácidos graxos, obtido a partir de ácidos graxos de cadeia longa. Esses ácidos graxos reagem com o cálcio, unidos na forma de sal do tipo R-COO-Ca, popularmente conhecido como sabão de cálcio. Existem no mercado sais de cálcio de ácidos graxos formados a partir de óleo de palma, colza e soja, sendo que os dois últimos são mais insaturados e podem mais dissociados e biohidrogenados no rúmen. (FREITAS JÚNIOR, 2008).

A suplementação de lipídios na dieta de sais de cálcio é proposto como um método de proteção da biohidrogenação do rúmen, porque esses sais são complexados aos ácidos graxos para tornar o composto insolúvel em ambiente ruminal (CHOUINARD; GIRARD; BRISSON, 1998). Além disso, os lipídios que são insolúveis ou não disponíveis no rúmen podem permitir maior inclusão na dieta (WEST; HILL, 1990).

Os sais de cálcio de ácidos graxos aumentaram à produção de leite e/ou a porcentagem de lipídio sem alterar a digestibilidade da dieta em estudos conduzidos por Erickson e Murphy e Clark (1992); Fearon e KilPatrick (1991); Klusmeyer et al. (1991a); Klusmeyer et al. (1991b) e Sklan et al. (1992). Contudo, Chouinard, Girard e Brisson (1998) afirmou que os sais de cálcio tanto de linhaça quanto de óleo de soja não foram capazes de aumentar a concentração de ácido linolênico e linoleico no leite, respectivamente, e conclui que

aparentemente os sais de cálcio desses ácidos graxos não foram eficazes na proteção contra a biohidrogenação ruminal.

De acordo com Chalupa et al. (1984), vacas alimentadas com sais de cálcio aumentam o consumo de energia sem alterar a fermentação ruminal. Klusmeyer et al. (1991a) compararam a inclusão de sais de cálcio de ácidos graxos combinado com fontes diferentes de proteína e concluíram que não houve alteração na fermentação ruminal sugerindo que os sais de cálcio são inertes no rúmen.

Weiss e Wyatt (2004) utilizaram sais de cálcio de óleo de palma em seu estudo verificaram que a ingestão de matéria seca foi reduzida quando a concentração desse ácido graxo era de 3,4%, entretanto esses animais tiveram uma maior produção de leite. Além disso, a fermentação ruminal e digestibilidade das fibras não sofreu efeito, enquanto que a energia digestível da matéria seca e matéria orgânica foram maiores por causa do aumento da digestibilidade dos ácidos graxos adicionados na dieta. Esta fonte de lipídio tem efeitos menores sobre a digestão da fibra, evitando variações na porcentagem de lipídio do leite o que ocorre em vacas em lactação alimentadas com grande quantidade de lipídios insaturados (FIRKINS; EASTRIDGE, 1994)

Nörnberg (2006) comprovou que as fontes lipídicas utilizadas em seu estudo não afetaram o consumo voluntário de matéria seca e proporcionaram uma maior produção de leite, de modo que a fonte de sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma promoveu maior produção de leite corrigida para 3,5% de gordura e melhorou a eficiência alimentar. A inclusão de sais cálcio de ácidos graxos na dieta de vacas leiteiras de alta produção pode gerar diferentes efeitos sobre a fermentação ruminal de acordo com a fase de lactação. No início da lactação ocorre uma redução da relação acetato: propionato decorrente da grande variação no consumo. Enquanto que nas vacas no terço médio de lactação a redução é explicada pelo aumento no consumo de matéria seca que altera a taxa de passagem, que pode reduzir a degradação da fibra diminuindo a produção de ácidos graxos voláteis, principalmente o acetato. Dessa forma, diminuindo a produção de acetato ocorre menor teor de gordura no leite, melhora o balanço energético e a atividade ovariana no início do pós-parto (BUTLER, 2004; ONETTI; GRUMMER, 2004).

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

Freitas Júnior (2008), em seu estudo comparou dietas recebendo ácidos graxos de forma natural com a inclusão de grão de soja, na forma inerte como sais de cálcio de óleo de soja e ácido graxos insaturados livres com inclusão de óleo de soja na dieta. De acordo com seus resultados a dieta contendo sais de cálcio apresentou redução no consumo de matéria seca e menor teor de lipídio no leite em relação às demais, contudo não ocorreu diferença na digestibilidade aparente total e também sobre o balanço de nitrogênio, mas apresentou maior eficiência energética.

Maturana Filho (2009), em sua pesquisa com vacas no período de transição alimentadas com sais de cálcio de óleo de soja e óleo de soja refinado, não encontrou diferença no consumo de matéria seca, escore de condição corporal. Porém, foi observado melhor balanço de energia no pós-parto e no desempenho reprodutivo dos animais. Entretanto, vacas alimentadas com fontes de ácidos graxos apresentaram redução na produção de leite corrigida, no teor e na produção de gordura do leite.

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

Ferlay, Chilliard e Doreau (1992) afirmaram que apesar dos vários estudos relacionando as diferentes fontes de lipídio no desempenho lactacional de vacas leiteiras, existem pouca informação em relação a comparação do efeito dos diferentes tipos de sais de cálcio de ácido graxo. Apesar das limitações referentes à biohidrogenação ruminal e teor de lipídio no leite, o uso de lipídio inerte na alimentação de vacas no período de lactação consiste em uma forma alternativa para as dietas melhorando a eficiência energética e reduzindo o teor de amido da dieta que causa comprometimento a fermentação ruminal.

4.2 INFLUÊNCIA DOS ÁCIDOS GRAXOS DA FAMÍLIA ω 6 NO DESEMPENHO PRODUTIVO DE VACAS LEITEIRAS

4.2.1 Consumo e digestibilidade da matéria seca e nutrientes

O consumo de energia, segundo Allen (2000), é uma limitação fundamental na produção de leite para vacas em alta produção e é determinado pelo consumo de matéria seca e conteúdo de energia líquida da dieta. O NRC (2001) considera que mudanças no padrão de digestibilidade da fração fibrosa, alterações na fermentação ruminal e redução no teor de gordura do leite são indicativos que a suplementação de lipídios promove respostas fisiológicas nos animais.

A suplementação de ácidos graxos para vacas em lactação aumenta a densidade energética da dieta e melhora a ingestão de energia. Allen (2000), em sua revisão afirma que os mecanismos que justificam a depressão do consumo de matéria seca quando é adicionado ácidos graxos na dieta não são claros, mas podem ser resultados do efeito sobre a fermentação ruminal, motilidade intestinal, aceitabilidade das, liberação de hormônios intestinais e oxidação dos ácidos graxos no fígado.

Dois principais pontos devem ser destacados quando se analisa alterações no CMS em vacas suplementadas com fontes de lipídio: 1) aceitabilidade do suplemento de lipídio relacionado às alterações no consumo de matéria seca e se o período de adaptação não for suficiente para os animais, às respostas à suplementação podem não representar a realidade; 2) tipo e nível de suplementação de ácidos graxos utilizados, pois respostas diferentes são observadas de acordo com as características químicas e físicas dos ácidos graxos utilizados (NRC, 2001).

O efeito depressor dos ácidos graxos sobre o consumo de matéria seca pode estar relacionado a inibição do crescimento microbiano e, conseqüentemente, a fermentação da fibra, reduzindo a taxa de passagem da digesta pelo trato gastrintestinal. Em sua pesquisa, Vargas et al. (2002) ao compararem dois níveis de inclusão de lipídios (3% e 7% na matéria seca) de duas fontes diferentes de ácidos graxos, grão de soja e óleo de soja encontrou efeito depressor dos ácidos graxos sobre o consumo de matéria seca sem afetar os parâmetros ruminais, com exceção do butirato e pH.

Bu et al. (2007) comparando utilização de óleo de soja e de linhaça (4% da MS da dieta) não encontraram diferença e efeitos negativos sobre o consumo de matéria seca. Ueda et al. (2003) avaliaram a suplementação de óleo de soja em 4 e 6% da matéria seca total, utilizando feno de gramínea na proporção volumoso concentrado de 65:45, e não observaram redução no consumo de matéria seca e consumo de matéria orgânica. Zheng et al. (2005) não observaram redução no CMS em vacas com média de 40 dias em lactação e recebendo cerca de 500g de óleo/dia (2% da matéria seca total), utilizando silagem de milho como maior parte do volumoso.

Quando são avaliadas diferentes fontes de lipídios nas dietas de vacas leiteiras, diferentes respostas são esperadas estando relacionadas ao tipo e nível de inclusão do suplemento de ácidos graxos na dieta. Para dietas contendo de 5 a 6% de extrato etéreo na matéria seca, segundo o NRC (2001), a adição de óleo de sementes e ácidos graxos parcialmente hidrogenados reduz o consumo.

De acordo com Rabiie (2012) o consumo de matéria seca diminui em todas as pesquisas que utilizaram fontes de lipídio na dieta, e a diferença média foi de 0,88 kg/vaca/dia e foi mais significativa para o grupo que incluía nas dietas sais de cálcio (menos o Megalac que teve mesmo efeito das outras fontes de lipídio). Onetti e Grummer (2004) também encontraram uma redução no consumo de matéria seca.

Freitas Júnior (2008) encontrou diminuição no consumo de matéria seca referente a dieta com sais de ácidos graxos (3% na MS da dieta) quando comparado com grão de soja integral e óleo de soja. Weiss e Wyatt (2004) também encontraram um menor consumo para dietas contendo 3,2% de sais de cálcio em relação a dietas com 1,2% de sais de cálcio e triglicerídeos hidrogenados de óleo de palma.

Para Allen (2000) a suplementação de lipídio dietético apresenta efeitos diferentes sobre o CMS em relação ao grau de insaturação dos ácidos graxos, em que ácidos graxos insaturados apresentam maior redução do CMS quando comparado com os ácidos graxos saturados.

Ao analisar a digestibilidade dos lipídios deve-se levar em consideração o tamanho da cadeia, sendo maior digestibilidade de fontes de lipídios ricas em C:16 em relação ao C:18, de acordo com os trabalhos de Elliott et al., (1995); Goodling e Grummer, (1998) e Harvatine e Allen, (2006b). Utilizando três suplementos de ácidos graxos diferentes em relação a forma e composição química, Weiss Pinos-Rodriguez e Wyatt. (2011) encontraram que quanto mais insaturado maior a digestibilidade, assim como a suplementação de ácidos graxos é mais digestível do que a de triacilglicerídeos.

Adicionar lipídios à dieta de ruminante pode interromper a fermentação no rúmen, levando a uma redução na digestibilidade de fontes não lipídicas. Outro efeito é uma diminuição da digestibilidade dos carboidratos estruturais, acompanhada por redução na produção de metano, hidrogênio, ácido graxos voláteis e na relação acetato:propionato. Quando os suplementos de lipídios inibem fermentação ruminal, podem reduzir a digestibilidade da fibra no trato gastrointestinal (JENKINS, 1993). Ben Salem et al. (1993) afirmaram que os óleos reduzem a digestibilidade aparente total de carboidratos quando se fornece silagem de milho como volumoso comparado com outros volumosos como o feno de gramíneas.

Schauff e Clark (1992) compararam a adição de grão de soja, sais de cálcio ou ambos na dieta de vacas em lactação e concluíram que as fontes utilizadas reduziram a digestibilidade da MS, MO, FDA e ácidos graxos C:18, sendo que a maior redução foi em dietas com 16% de grão de soja extrusado associado com 6% de sais de cálcio. Chouinard, Girard e Brisson (1998) também encontraram maior digestibilidade aparente total da matéria seca, proteína bruta, extrato etéreo e FDN para dietas contendo sais de cálcio em relação a dieta sem adição de lipídio.

A adição de óleo de soja em vacas secas reduziu o consumo de matéria orgânica e matéria seca, mas não apresentou efeito da digestibilidade total da MS, MO, nitrogênio ou FDN, porém, diminui a digestibilidade dos ácidos graxos (BATEMAN; JENKINS, 1998). Lundy et al. (2004) utilizaram óleo de soja, sais de cálcio de óleo de soja, amida de óleo de soja e sais de cálcio com amida de óleo de soja e não encontraram diferença na digestibilidade da matéria seca e FDN.

Weiss e Wyatt (2004), concluíram em seu experimento que o tipo ou quantidade de lipídio adicionado na dieta não afetou a fermentação ruminal e a digestibilidade das fibras, e a digestibilidade da matéria seca e matéria orgânica foram maiores para as dietas com sais de cálcio de óleo de palma do que para triglicerídeos hidrogenados de óleo de palma, por causa do aumento da digestibilidade dos ácidos graxos.

4.2.2 Produção e composição do leite

De acordo com Palmquist (1994), os efeitos de dietas ricas em lipídios são benéficos para vacas de alta produção, principalmente para aumentar a eficiência, não só da produção de leite, mas também do restabelecimento das reservas de lipídios corporais durante a lactação. Grummer, Mashek e Hayirli (2004) afirmaram a importância na suplementação de lipídio na dieta de vacas em lactação com o objetivo de aumentar a densidade calórica da dieta sem reduzir o conteúdo de fibras, e promover aumento da ingestão de energia e produção de leite.

O uso de alguns tipos de lipídios suplementares tem aumentado a produção e a percentagem de gordura do leite, mas, ao mesmo tempo, tem diminuído a percentagem de proteína. Quando há substituição de carboidratos disponíveis no rúmen pelos ácidos graxos, estes tem efeito tóxico sobre os microorganismos do rúmen que causam redução no crescimento microbiano e efeito sobre o transporte de aminoácidos na glândula mamária. Assim, o conteúdo de proteína do leite pode diminuir por causa da deficiência de um ou mais aminoácidos (SANTOS et al., 2001).

Staples, Thatcher e Mattos (2001) também citaram que a resposta produtiva da utilização de lipídio dietético suplementar para vacas em lactação pode resultar em acréscimos na produção de leite de até 2,0 a 2,5 Kg/vaca/dia, condicionando estes resultados a adaptação dos animais as dietas contendo lipídio e ao tempo suficiente de avaliação para responderem as dietas ricas em energia.

Cant, Peters, Baldwin (1993) e Harrison, Kincaid e McNamara (1995), ao suplementarem a dieta de vacas lactantes com ácidos graxos, obtiveram redução na proteína do leite. Esses autores observaram que os ácidos graxos, além de reduzir o fluxo sanguíneo mamário, diminuí a concentração arterial de aminoácidos no sangue, inibindo a atividade da insulina. A redução da proteína do leite tem sido explicada pela redução da síntese microbiana, uma vez que lipídios não são fontes de energia para o crescimento microbiano (SNIFFEN et al., 1992), ou pela diminuição da disponibilidade de aminoácidos na glândula mamária (WU; HUBER, 1994).

Segundo Maiga e Schingoethe (1997), o crescimento microbiano no rúmen fornece aminoácidos para as células mamárias, que são necessários para a síntese de proteínas do leite. As bactérias ruminais durante a fermentação geram compostos nitrogenados e carbonados que abastecem a maior parte dos aminoácidos usados pelas vacas na síntese de

proteína do leite. Em adição, a produção de ácido propiônico durante fermentação ruminal também é uma forma de contribuir para a síntese protéica do leite.

O efeito inibitório dos lipídios sobre a digestibilidade da matéria seca da dieta e diminuição da relação acetato/propionato (produto final de degradação da celulose) no rúmen contribui para a redução do suprimento de ácido acético, precursor de 50% da gordura do leite, principalmente dos ácidos graxos de cadeia curta (CHALUPA; VECCIARELLI; ELSER, 1986; PALMQUIST, 1989; SANTOS, 2001).

Palmquist (1991) não encontrou efeito na produção de leite pela fonte de lipídio, porém, foi menor quando os animais consumiram dietas com maior teor de lipídio. Ainda nesse mesmo estudo a produção de leite com e sem correção para 4% não sofreu efeito da inclusão de lipídio na dieta, principalmente quando esta não estava na forma protegida. Entretanto, Pinto (1997) obteve melhora na produção de leite em dieta contendo lipídio protegida (Magnapac) comparado ao óleo de soja, ambos a 7% de lipídios, e em relação ao controle, com 4% de lipídios.

Wu e Hurber (1993) revisaram dados de 49 experimentos, envolvendo 83 comparações entre dietas com e sem adição de lipídio em vacas leiteiras, e observaram que na maioria dos casos o teor de proteína foi reduzido pela adição de fontes de lipídio nas dietas. Estes autores concluíram que a redução do teor de proteína verificada nos estudos avaliados pode ser explicado em parte pelo aumento da produção de leite, sendo o grau de depressão dependente da fonte de lipídio utilizada e resposta a suplementação. Wu, Huber e Chan (1994); Silva (1997); Pinto (1997) e Vargas et al. (2002), ao suplementarem vacas lactantes com lipídios não encontraram alteração na composição de leite referente a lactose, sólidos totais, sólidos totais e densidade.

Segundo Santos (2001), aumentos na produção de leite foram observados pelo uso de sais de ácidos graxos com cálcio a nível de 4% da MS da dieta (KIN et al., 1993; PEIXOTO et al., 1994), pelo uso de ácidos graxos protegidos – Magnapac (PINTO, 1997), sebo bovino (MALAFAIA et al., 1996) e pela inclusão de 13% de grão de soja tostado na dieta total (FALDET; SATTER, 1991).

4.2.3 Fermentação ruminal

A adição de lipídios na dieta pode influenciar a fermentação ruminal diminuindo a digestibilidade de fontes de energia não lipídicas. Em carboidratos estruturais essa redução pode alcançar mais que 50% quando tem a inclusão de até 10% de lipídio, e essa menor digestibilidade é acompanhada por uma diminuição na produção de metano, hidrogênio, ácidos graxos voláteis e na relação de acetato:propionato. Ao mesmo tempo, a inibição da fermentação ruminal leva a uma depressão na digestibilidade da fibra no trato digestivo (JENKINS, 1993).

Jenkins (1993) atribui às diferenças na estrutura das fontes de lipídios, o fato de se ter respostas variadas na inclusão de ácidos graxos, assim quando aumenta o grau de insaturação aumenta a digestibilidade do ácido graxo, mas também aumenta a probabilidade da fermentação ser prejudicada. A taxa de liberação dos ácidos graxos no rúmen também tem influência, pois quando a quantidade de ácidos graxos insaturados excede a capacidade de biohidrogenação, esses se acumulam e vão interferir na fermentação.

Segundo o NRC (2001), reduções na ingestão de MS, teor de gordura do leite, e digestão ruminal da fibra são indicadores de que a fermentação sofreu alteração. Lipídios insaturados inibem as bactérias ruminais gram-positivas e estimulam aquelas produtoras de propionato, causando decréscimo na relação acetato:propionato e produção de metano (RICHARDSON et al., 1976; CHALUPA et al., 1984; VARGAS et al., 2002).

A relação acetato:propionato no líquido ruminal é influenciada pela dieta, variando de 3,5:1 em dieta à base de volumoso a 1,25:1 em dieta rica em concentrado (Nagaraja et al., 1997). O aumento de ácido acético é associado com maior produção e concentração de lipídio no leite, entretanto o aumento de ácido propiônico possui relação inversa com o lipídio no leite e aumenta a concentração de proteína no leite (Firkins, 2006). Contudo, a diminuição na relação acetato:propionato, que ocorre por alteração na fermentação ruminal, vai comprometer a produção e composição de leite.

As sementes de oleaginosas, de modo geral, apresentam elevado percentual de ácidos graxos insaturados (75% em média), como os ácidos oléico, linoléico e linolênico, que são líquidos à temperatura ambiente e têm efeito inibitório sobre a população bacteriana Gram-positiva (VAN NEVEL; DEMEYER, 1988). A inibição das bactérias gram – positivas, quando adicionado lipídios nas dietas, se dá pelo enfraquecimento da ligação das enzimas

celulases para digestão da celulose, assim, ocorre uma redução da atividade das bactérias celulolíticas (JENKINS, 1993) e conseqüentemente uma menor digestibilidade da fibra.

Palmquist (1988) especularam que o aumento de volumoso na dieta reduz a toxicidade dos ácidos graxos insaturados. Palmquist (1990) não encontrou diferença nas concentrações molares de ácidos graxos voláteis com adição de sais de cálcio em diferentes concentrações (500g e 1000g/dia) em comparação a dieta sem lipídio para vacas jersey, usando como volume silagem de milho e feno de alfafa (59% da MS). Weiss e Wyatt (2004) também não encontraram diferença nos tratamentos em relação a fermentação ruminal ao utilizarem sais de ácidos graxos.

Elliot, Drackley e Weigel (1996) compararam a inclusão na dieta de diferentes formas de proteção de ácidos graxos de cadeia longa (sais de cálcio, perolizado e floculado) e não encontrou diferença na fermentação ruminal em relação a dieta sem adição de lipídio. De acordo com Schauff e Clark (1996), a inclusão de doses crescentes de sais de cálcio de ácido graxo na dieta não alterou o pH do fluido ruminal e a concentração total de AGV e sugeriram a inclusão de até 6% de sais de cálcio para não promover efeitos deletérios na fermentação ruminal e na digestibilidade da maioria dos nutrientes. a fermentação ruminal Huang et al. (2008) não encontraram efeito para a concentração total de ácidos graxos voláteis e na relação acetato:propionato, comparando combinações de óleo de soja e de CLA , sugerindo que a adição de lipídio na dieta não tem efeito na fermentação ruminal.

4.2.4 Síntese de proteína microbiana ruminal, balanço de energia e balanço dos compostos nitrogenados

De acordo com Clark et al (1992), a deficiência de qualquer nutriente pode reduzir a síntese de proteína microbiana, a passagem de aminoácidos para o intestino delgado e a produção de leite, mas os dois fatores nutricionais mais susceptíveis são a energia e a proteína. Vacas leiteiras consomem proteína bruta para suprir nitrogênio, que será usado como substrato para crescimento microbiano no rúmen. A parcela que escapou da degradação ruminal corresponde a proteína endógena que é responsável em fornecer aminoácidos para manutenção e produção de leite.

A maior parte de proteína que chega para a digestão abomasal e intestinal de origem microbiana é usado para estimar o balanço dos compostos nitrogenados e a síntese de proteína

microbiana. Elevadas concentrações sanguíneas de ureia no leite são positivamente correlacionadas a ingestão de nitrogênio e associadas a maior taxa de excreção urinária de ureia. Portanto, a concentração de nitrogênio uréico no plasma e no leite é uma forma usada para avaliar o estado nutricional proteico e a eficiência de utilização do nitrogênio, resultando em indicadores do equilíbrio ruminal entre nitrogênio e energia (VASCONCELOS et al., 2010).

Segundo Oliveira et al. (2001), as excreções de ureia e nitrogênio na urina têm sido determinadas por uma única amostragem, chamada de amostra *spot*. De acordo com Vasconcelos et al. (2010) existem vários métodos para estimar a síntese microbiana ruminal, e o mais usado é a excreção urinária de derivados de purina, que é estimada pela soma das quantidades de ácido úrico e alantoína excretadas na urina mais a quantidade de alantoína secretada no leite.

Doreau e Ferlay (1995), em revisão reuniram os principais resultados ao longo de dez anos referentes a adição de lipídios na dieta e seu efeito na síntese de proteína microbiana, e concluíram que em estudo *in vivo* ocorre aumento na eficiência de síntese microbiana atribuída a redução de protozoários e concentração de nitrogênio amoniacal. Entretanto, em relação aos estudos *in vitro*, apresentou redução no crescimento bacteriano, quando eram adicionados lipídios no meio de cultivo.

Se o lipídio é utilizada com sucesso no dieta de vacas leiteiras, não deve de forma significativa alterar a fermentação ruminal ou disponibilidade de AA e outros nutrientes necessários para o produção de leite (CLARK; KLUSMEYER; CAMERON 1992). De acordo com o NRC (2001), alimentos ricos em proteína frequentemente resultam em maior demanda de água, em virtude do aumento calórico da proteína e da eliminação de resíduos do metabolismo. A otimização da produção de proteína microbiana e ácidos graxos voláteis a partir da fermentação ruminal depende não só da competição microbiana por nutrientes, principalmente bactérias e protozoários, mas também do sinergismo entre as bactérias anaeróbicas, as metanogênicas, fungos e protozoários (KARNATI et al., 2009).

De acordo com Weiss (1998), as variações nos valores de energia líquida dos alimentos podem ser explicadas por variações normais na utilização de energia pelas vacas, por diferenças entre experimentos causadas pelo delineamento experimental, por fatores relacionados ao animal (consumo de MS e homogeneidade dos animais), por fatores relacionados à dieta (fonte e quantidade de PB) e por erros analíticos (medida da variação do PV).

Dados reportados por Nörnberg et al. (2004) comprovaram que a fonte de energia afeta a eficiência energética. O amido e a fibra têm efeito negativo, enquanto o lipídeo tem efeito positivo na eficiência energética, pois não promove perda de energia pela produção de metano ou energia urinária (Andrew et al., 1991).

De acordo com os dados de Santos et al. (2009), as vacas alimentadas com a dieta contendo óleo de soja, durante o período de transição, apresentaram melhor balanço de energia em comparação àquelas mantidas com a dieta controle, e os animais começaram a melhorar o balanço de energia a partir da terceira semana de lactação. Estes autores atribuíram o melhor balanço de energia à manutenção do consumo com o fornecimento de dieta de maior densidade energética.

4.2.5 Parâmetros sanguíneos

Durante o período de lactação é possível estimar os processos de adaptação metabólica a novas situações fisiológicas e de alimentação a partir dos metabólitos sanguíneos. A adição de lipídios na dieta durante esse período não apresenta dados consistentes, mas espera-se aumento dos níveis de colesterol total, triglicerídeos, e colesterol nas frações HDL, LDL e VLDL, especialmente em função do aumento do nível de lipídio circulante (BAUMAN; LOCK, 2006).

De acordo com Christensen et al. (1994), o metabolismo ruminal, absorção intestinal, transporte sistêmico, metabolismo sistêmico, secreção e deposição de lipídios no organismo são aspectos diretamente ligados ao metabolismo de lipídios e podem influenciar os parâmetros sanguíneos em animais recebendo ácidos graxos nas dietas. Schauff e Clark (1992) e Elliott et al. (1993) enfatizaram que o aumento da concentração de colesterol total no sangue ocorre devido à elevação da demanda necessária para digestão, absorção e transporte de ácidos graxos de cadeia longa ingerida advinda das fontes de ácidos graxos.

O perfil metabólico varia em função da fase de lactação e nível de produção. Vacas de alta produção apresentam níveis sanguíneos de colesterol, uréia e aspartato aminotransferase (AST) significativamente mais elevados, e níveis de cálcio e glicose mais baixos comparados com vacas de baixa produção (GONZALES; ROCHA, 1998). Elliott et al. (1993) e Bremmer, Ruppert e Clark (1998) verificaram aumento da concentração de triglicerídeos e colesterol total em vacas no início de lactação com médias de produção de 40, 35 e 25 Kg/dia.

Além dos metabólitos relacionados ao lipidograma, é importante determinar a concentração de nitrogênio e ureia circulante para fazer avaliação do balanço de nitrogênio, por refletir no metabolismo ruminal da proteína e possibilita avaliar o balanço de proteína/energia da dieta (GONZALES; ROCHA, 1998). Assim, Drackley et al. (1992) e Elliott et al. (1993) avaliaram a suplementação de lipídio em vacas Holandesas e não observaram mudanças nas concentrações de uréia no sangue dos animais. De acordo com Schauff et al. (1992), mudanças nas concentrações de uréia e nitrogênio plasmático poderiam ser atribuídas às baixas concentrações de nitrogênio amoniacal no rúmen.

Freitas Júnior (2010) encontrou maiores concentrações de colesterol total e colesterol-LDL vacas alimentadas com dietas contendo fontes de lipídio em relação à dieta controle. As concentrações de uréia e nitrogênio uréico, no soro e no leite, foram semelhantes entre as dietas utilizadas, senão para a dieta contendo sais de cálcio de ácidos graxos, que foram menores do que a dieta controle.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local, instalações e animais

O experimento foi conduzido nas dependências do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite do Departamento de Nutrição e Produção Animal (VNP) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, Campus de Pirassununga, no período de 23 de agosto a 14 de novembro de 2011.

Foram utilizadas 16 vacas da raça Holandesa, agrupadas em quatro quadrados latinos 4x4, contemporâneos e balanceados, de acordo com o período de lactação. O experimento foi constituído por quatro períodos, com duração de 21 dias cada um, sendo os 14 primeiros dias de adaptação às dietas e os demais para avaliar as variáveis mensuradas. Para melhor distribuição dos tratamentos avaliados, as vacas foram selecionadas de acordo com a produção de leite anterior, peso corporal, ordem de partos e escore de condição corporal.

Os animais foram alojados em estábulo tipo “free-stall”, em baias individuais, sendo ordenhados mecanicamente duas vezes ao dia. Após os procedimentos de ordenha os animais ficaram cerca de 1 hora em um curral de descanso, para a avaliação da ocorrência de cios, e ao mesmo tempo, para exercitarem. O consumo de matéria seca das dietas foi avaliado de forma individual e mensurado diariamente.

5.2 Dietas experimentais

Os animais foram alimentados com quatro dietas durante o período experimental, formuladas para serem isonitrogenadas, de forma a atenderem as exigências nutricionais de vacas em lactação com aproximadamente 600 kg de peso corporal, 12 semanas de lactação, produzindo diariamente 35,0 kg de leite com 3,5% de gordura, conforme recomendações do NRC (2001).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente dentro dos quadrados latinos para receber as seguintes dietas experimentais: 1) Controle (C), composto por dieta basal de aproximadamente 2,5% de extrato etéreo; 2) Óleo de soja (OS), composto por dieta com

aproximadamente 5,5% de extrato etéreo, baseada na inclusão de 3,0% de óleo de soja refinado no concentrado; 3) Sais de cálcio de ácidos graxos (SC1) (MEGALAC-E®, Química Geral do Nordeste e Arm & Hammer, Inc.), composto por dieta com aproximadamente 5,5% de extrato etéreo, baseada na inclusão de 3,0% de sais de cálcio de ácidos graxos no concentrado 4) Sais de cálcio de ácidos graxos (SC2), (LACTOPLUS®, Dalquim-Nutriacid Nutrição e Ciência), composto por dieta com aproximadamente 5,5% de extrato etéreo, baseada na inclusão de 3,0% de sais de cálcio de ácidos graxos no concentrado. As respectivas dietas e água foram fornecidos “*ad libitum*” e o volumoso utilizado durante o experimento foi a silagem de milho.

Durante o período experimental, os animais recebiam a dieta em proporção 50:50 (volumoso:concentrado) duas vezes ao dia. No período da manhã e a tarde, às 8:00 e a tarde às 13:30 horas. As proporções de silagem de milho e concentrado foram fornecidas na forma de dieta total e completa.

A proporção dos ingredientes no concentrado e dieta total, assim como a respectiva composição química - bromatológica das dietas experimentais, concentrado e ingredientes encontram-se nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 1 – Composição química-bromatológica, nutrientes digestíveis totais (NDT), energia líquida de lactação (EL_L), e energia bruta (EB) dos ingredientes utilizados nas dietas experimentais

Itens	SM ⁵	FS ⁶	FB ⁷	OS ⁸	SC1 ⁹	SC2 ¹⁰
Matéria seca ¹	29,71	87,31	86,30	99,74	97,20	95,40
Matéria orgânica	93,52	93,12	97,12	-	76,19	76,63
Matéria mineral ²	6,48	6,88	2,88	-	23,81	23,37
Proteína bruta ²	8,67	49,70	8,40	-	-	-
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro ²	11,14	8,00	1,40	-	-	-
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido ²	5,12	4,48	3,46	-	-	-
Extrato etéreo ²	3,74	2,07	3,13	99,74	83,27	81,73
Carboidratos não fibrosos ²	29,17	29,73	69,58	-	-	-
Fibra em detergente neutro ²	54,08	11,19	7,97	-	-	-
FDN corrigida para cinzas e proteína ²	47,60	4,31	5,09	-	-	-
Fibra em detergente ácido ²	36,05	6,78	3,40	-	-	-
FDA indigestível ²	10,96	0,40	0,74	-	-	-
Lignina ²	6,30	2,20	3,10	-	-	-
Nutrientes digestíveis totais ³	64,14	79,85	86,34	183,96	165,97	165,97
Energia líquida de lactação ³ (Mcal/Kg)	1,87	2,31	2,20	2,32	2,29	2,29
Energia bruta ⁴ (Mcal/Kg de MS)	3,90	4,09	3,75	9,36	8,69	8,69

¹Valor expresso em porcentagem da matéria natural; ²Valores expressos em porcentagem da matéria seca; ³Valores estimados pelas equações do NRC (2001); ⁴Obtido com auxílio de bomba calorimétrica; ⁵SM: Silagem de milho; ⁶FS: Farelo de soja; ⁷FB: Fubá de milho; ⁸OS: Óleo de soja; SC1⁹ Megalac - E®; ¹⁰SC2 Lactoplus®.

Tabela 2 – Composição químico-bromatológica dos concentrados experimentais

Ingredientes (%MS)	Concentrados experimentais ⁶			
	C	OS	SC1	SC2
Fubá de milho	52,64	46,09	47,81	47,84
Farelo de soja	40,68	41,24	41,24	41,24
Óleo de soja	-	5,99	-	-
Sais de cálcio	-	-	5,99	5,99
Ureia	0,80	0,80	0,80	0,80
Sulfato de amônia	0,08	0,08	0,08	0,08
Bicarbonato de sódio	1,58	1,58	1,58	1,58
Fosfato bicálcico	1,10	1,10	1,10	1,10
Óxido de magnésio	0,18	0,18	0,18	0,18
Calcáreo	1,98	1,98	0,22	0,22
Mistura mineral ¹	0,44	0,44	0,44	0,44
Sal comum	0,52	0,52	0,52	0,52
Composição química				
Matéria seca ²	87,34	88,15	87,81	87,71
Matéria orgânica ³	89,01	89,16	87,48	87,51
Matéria mineral ³	10,99	10,84	12,52	12,49
Proteína bruta ³	26,88	26,61	26,75	26,75
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro ⁴	4,78	4,26	4,40	4,40
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido ⁴	5,08	4,89	5,25	5,25
Extrato etéreo ³	2,49	8,26	7,34	7,25
Carboidratos não fibrosos ³	50,89	45,54	44,96	45,08
Fibra em detergente neutro ³	8,75	8,29	8,43	8,43
Fibra em detergente ácido ³	4,55	4,36	4,42	4,42
Lignina ³	2,53	2,34	2,39	2,39
Nutrientes digestíveis totais ⁵	78,29	85,51	82,90	82,81
Energia líquida de lactação ⁵ (Mcal/Kg)	2,08	2,74	2,60	2,59
Energia bruta (Mcal/kg MS)	3,72	4,04	4,07	4,07

¹Composição por kg do produto: Cobalto (mín) 250mg; Cobre (mín) 10.40g; Etoxiqium 206mg; Iodo (mín) 625mg; Manganês (mín) 42,70g; Selênio (mín) 316mg; Vitamina A (mín) 4000000UI; Vitamina D3 (mín) 1000000UI; Vitamina E (mín) 18750UI; Zinco (mín) 42,70g; ²Valor expresso em porcentagem da matéria natural; ³Valores expressos em porcentagem da matéria seca; ⁴Valores expressos em porcentagem do nitrogênio total; ⁵Valores estimados pelas equações do NRC (2001); ⁶Controle (C); Óleo de soja (OS); Megalac - E® (SC1); Lactoplus® (SC2).

Tabela 3 – Composição químico-bromatológica das dietas experimentais

Ingredientes (%)	Dietas experimentais ⁶			
	C	OS	SC1	SC2
Silagem de milho	50,02	50,05	50,05	50,05
Fubá de milho	26,31	23,02	23,88	23,88
Farelo de soja	20,33	20,60	20,60	20,60
Óleo de soja	-	2,99	-	-
Sais de cálcio	-	-	2,99	2,99
Ureia	0,40	0,40	0,40	0,40
Sulfato de amônia	0,04	0,04	0,04	0,04
Bicarbonato de sódio	0,79	0,79	0,79	0,79
Fosfato bicálcico	0,55	0,55	0,55	0,55
Óxido de magnésio	0,09	0,09	0,09	0,09
Calcáreo	0,99	0,99	0,13	0,13
Mistura mineral ¹	0,22	0,22	0,22	0,22
Sal comum	0,26	0,26	0,26	0,26
Composição química				
Matéria seca ²	58,53	58,94	58,77	58,71
Matéria orgânica ³	91,92	92,12	92,28	92,28
Matéria mineral ³	8,74	8,66	9,50	9,49
Proteína bruta ³	17,78	17,64	17,71	17,71
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro ⁴	7,96	7,70	7,77	7,77
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido ⁴	5,10	5,01	5,19	5,19
Extrato etéreo ³	3,12	6,00	5,54	5,49
Carboidratos não fibrosos ³	36,85	36,74	37,33	37,33
Fibra em detergente neutro ³	31,41	31,18	31,25	31,25
Fibra em Detergente ácido ³	20,08	19,98	20,01	20,01
Lignina ³	4,41	4,32	4,35	4,35
Nutrientes digestíveis totais ⁵	68,44	73,92	74,66	74,66
Energia líquida de lactação ⁵ (Mcal/Kg)	1,91	1,98	2,00	2,00
Energia bruta (Mcal/kg MS)	3,69	3,97	3,95	3,95

¹Composição por kg do produto: Cobalto (mín) 250mg; Cobre (mín) 10.40g; Etoxiqium 206mg; Iodo (mín) 625mg; Manganês (mín) 42,70g; Selênio (mín) 316mg; Vitamina A (mín) 4000000UI; Vitamina D3 (mín) 1000000UI; Vitamina E (mín) 18750UI; Zinco (mín) 42,70g; ²Valor expresso em porcentagem da matéria natural; ³Valores expressos em porcentagem da matéria seca; ⁴Valores expressos em porcentagem do nitrogênio total; ⁵Valores estimados pelas equações do NRC (2001); ⁶Controle (C); Óleo de soja (OS); Megalac - E® (SC1); Lactoplus® (SC2).

5.3 Análise de alimentos

Diariamente foram feitas pesagens da quantidade de volumoso e concentrado fornecidas e das sobras de cada dieta experimental, para estimar o consumo individual. Os animais foram arraçoados de acordo com o consumo de matéria seca do dia anterior, de forma a ser mantido o percentual de sobras das dietas entre 5 e 10 % do fornecido. Durante os sete dias de período experimental foram coletadas amostras de silagem, dos ingredientes do concentrado e sobras para a realização de análises bromatológicas e cálculo do consumo de matéria seca e nutrientes.

Nos alimentos fornecidos e nas amostras de sobras foram analisados os teores de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), extrato etéreo (EE), proteína bruta (PB), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) e lignina de acordo com as metodologias descritas por Silva e Queiroz (2002). O teor de proteína bruta (PB) foi obtido pela multiplicação do teor de nitrogênio total por 6,25.

Os nutrientes digestíveis totais observados $NDT = PBd + FDNd + (EEd * 2,25) + CNFd$ foram calculados de acordo com Weiss et al. (1992). Os teores de fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente neutro livre de cinza e proteína (FDNcp), e fibra detergente ácido (FDA) foram obtidos conforme método descrito por Van Soest e Mason (1991), utilizando-se α -amilase sem adição de sulfito de sódio na determinação do FDN, em Sistema Ankon®.

5.4 Digestibilidade aparente total

As fezes foram coletadas via retal no 17º, 18º e 19º dias de cada período experimental, sempre antes das ordenhas da manhã e da tarde, sendo acondicionadas em sacos plásticos e armazenadas em freezer à -20 °C, e ao final do período de coleta foi feita à amostra composta por animal com base no peso seco ao ar.

Na determinação da digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes a quantidade total de matéria seca fecal excretada foi estimada pela concentração de fibra em detergente ácido indigestível (FDAi). As amostras de silagem, sobras e fezes foram pré-secas

em estufa com ventilação forçada (65°C/72 horas), e, em conjunto com as demais amostras de ingredientes, foram processadas em moinho de facas com peneiras de orifícios de 2 mm.

Para avaliação dos teores dos componentes indigestíveis, as amostras processadas foram acondicionadas em sacos de tecido não-tecido (TNT-100g/m²), com dimensões de 4 x 5 cm. As alíquotas foram acondicionadas em todos os sacos, segundo a relação de 20 mg de matéria seca por centímetro quadrado de superfície (NOCEK, 1988).

Antes da incubação das amostras duas vacas da raça Holandesa foram adaptadas durante 7 dias com dieta a base de farelo de soja e milho moído, e recebendo silagem de milho como volumoso. Posteriormente ao período de adaptação dos animais, as amostras foram incubadas no rúmen por período de 288 horas, segundo adaptação de técnica descrita por Casali et al. (2008).

Após a retirada do rúmen os sacos foram lavados com água corrente até o total clareamento desta, e imediatamente conduzidos à estufa de ventilação forçada (65°/72 horas). Após este período, os sacos foram submetidos à secagem em estufa não ventilada (105°C/45 minutos), sendo retirados, acondicionados em dessecador (20 sacos/dessecador), e pesados, obtendo-se a matéria seca indigestível. Posteriormente, os sacos foram submetidos ao tratamento com detergente ácido (MERTENS, 2002) por uma hora, em equipamento analisador de fibra Ankon®. Após este período foram lavados com água quente e acetona, sendo secos e pesados conforme procedimento anterior. Ao final deste tratamento, obteve-se a FDAi.

5.5 Balanço de energia

Para obtenção do consumo de energia bruta e realização do cálculo da eficiência do uso de energia consumida, as amostras de silagem, ingredientes e concentrados foram analisadas quanto ao seu teor de energia bruta em bomba calorimétrica, de acordo com Havartine e Allen (2006). O consumo de energia digestível (CED) foi obtido por meio do coeficiente de digestibilidade das dietas experimentais e do consumo de energia bruta, de acordo com os valores de energia obtidos para os ingredientes e a silagem de milho (HAVARTINE e ALLEN, 2006).

O consumo de energia líquida (CEL), os valores de energia líquida de produção (EL_P) e energia líquida de ganho (EL_g), foram calculados de acordo com as equações do NRC

(2001), a seguir: $CEL \text{ (Mcal/dia)} = 0,703 \times EM \text{ (consumo)} - 0,19 + \{[(0,097 \times EM \text{ (consumo)} + 0,19)/97] \times [EE - 3]\}$; $EM \text{ (consumo)} = 1,01 \times (ED \text{ (consumo)} - 0,45) + 0,0046 \times (EE - 3)$ onde: EM = energia metabolizável; EE = extrato etéreo; ED = energia digestível.

Os valores de energia metabolizável (EM) foram obtidos pela seguinte fórmula: $EM \text{ (Mcal/Kg)} = [1,01 * \{(\%CNF/100) * 4,2 + (\%FDN/100) * 4,2 + (\%PB/100) * 5,6 + (\%AG/100) * 9,4 - 0,3\} - 0,45] + 0,0046 * (EE - 3,0)$.

Para o cálculo de energia digestível (ED) dos suplementos de lipídio com e sem glicerol foram utilizadas as seguintes fórmulas: Com glicerol $ED \text{ (Mcal/dia)} = [9,4 * DAG * 0,9 * (EE/100) + (4,3 * 0,1 * (EE/100))]$; Sem glicerol $ED \text{ (Mcal/dia)} = 9,4 * DAG * (EE/100)$, onde: DAG = digestibilidade dos ácidos graxos.

Os valores de energia líquida de produção (EL_p) foram calculados segundo a fórmula: $EL_p \text{ (Mcal/dia)} = \text{produção de leite (Kg)} \times (0,0929 \times G\% + 0,0563 \times pv\% + 0,0395 \times \text{lactose}\%)$ onde: G%=teor de lipídio no leite; pv=teor de proteína verdadeira do leite.

A mudança de peso de corpo vazio (MPCV) foi calculada a partir do peso vivo (PV) onde: $PCV = 0,817 * PV$. A energia líquida de ganho foi calculada através da fórmula: $EL_g = 1,42 EM - 0,174 * EM + 0,0122 * EM * 1,65$.

A eficiência de utilização de energia foi calculada de acordo com Harvatine e Allen (2006) da seguinte forma: $\text{Eficiência produção de leite} = EL \text{ (consumo)} - EL \text{ (ganho PV)} - EL \text{ (leite)}$; $\text{Eficiência lactação} = EL \text{ produção de leite} + EL \text{ ganho de PV} / \text{Consumo de ED}$.

5.6 Balanço de nitrogênio

Para o cálculo de balanço de nitrogênio foi realizada a determinação da concentração de creatinina na urina de acordo com metodologia descrita por Valadares et al. (1999) e Rennó (2003). As amostras *spot* de 50 mL de urina foram obtidas de todas as vacas no 16º dia de cada período experimental, quatro horas após a alimentação matinal, durante micção estimulada por massagem na vulva. As alíquotas de 50 mL de urina (amostra *spot*) foram filtradas e alíquotas de 10 mL foram diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico e foram armazenadas a -15 °C para posteriores análises de ácido úrico e alantoína. Uma amostra de urina pura foi armazenada para determinação dos compostos nitrogenados totais, de uréia e creatinina.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Laborlab®), utilizando reação enzimática calorimétrica cinética em aparelho SBA-200 CELM®. Para a realização dessa análise, 100 µL de urina foram diluídos em 4.900 µL de água deionizada. Os resultados obtidos foram calculados pela seguinte fórmula: Creatinina (mg/dL) = creatinina (mg/dL) * 0,020 * 50 (BIGGS e COPPER, 1961).

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

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

O nitrogênio total das amostras de urina e leite foram determinados de acordo com as metodologias descritas por Silva e Queiroz (2002), onde a quantidade em gramas de nitrogênio para cada 100 mL de urina ou leite foi obtido dividindo-se o valor de proteína bruta das amostras pelo fator 6,25 para as amostras de urina e do fator 6,38 para as amostras de leite.

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

5.7 Fermentação ruminal

Para avaliação dos parâmetros de fermentação ruminal, as amostras de líquido ruminal foram coletadas com a utilização de sonda esofágica três horas após a alimentação da manhã. Logo após a coleta foram determinados os valores de pH ruminal utilizando phagâmetro. As amostras foram armazenadas em caixas térmicas e encaminhadas ao Laboratório de Bromatologia da FMVZ-USP.

No laboratório as amostras foram centrifugadas a 2.000 x g por 15 minutos, 1 mL do sobrenadante foi colocado em tubo de ensaio e adicionando-se 0,2 mL de ácido fórmico P.A., arrolhado e identificado e armazenado em congelador a -20 °C para determinação de ácidos graxos de cadeia curta. Da mesma amostra 2 mL do sobrenadante foi pipetado e armazenado em tubos de ensaio contendo 1 mL de ácido sulfúrico a 1 N, para posterior determinação da concentração de nitrogênio amoniacal (N-NH₃).

A metodologia utilizada para análise de ácidos graxos de cadeia curta foi preconizada por Erwin et al. (1961), sendo utilizado cromatógrafo a gás (Modelo 9001 Gás Chromatograph, Marca Finnigan) equipado com coluna de vidro de 02 metros de comprimento x 1/4, empacotada com 80/120 Carbopack B-DA/4% Carbowax 20M. Os gases utilizados foram o nitrogênio como gás de arraste na vazão de 25 mL/minuto, oxigênio como gás comburente na vazão de 175 mL/minuto, e hidrogênio como gás combustível na vazão de 15 mL/minuto. As temperaturas utilizadas do vaporizador foi de 220 °C, do detector de ionização de chamas de 250 °C e da coluna de sepadieta de 195 °C por 3 minutos, aumentando 10 °C/minuto até 200 °C.

Soluções padrão a 0,1 Normal de ácido acético, propiônico e butírico foram preparadas e padronizadas com hidróxido de potássio (KOH) 0,1 Normal, a fim de produzir solução padrão de ácidos graxos voláteis de concentração conhecida. As determinações foram realizadas injetando-se 1 µL de amostra em cromatógrafo integrado a computador, que processava os cálculos de quantificação, utilizando-se do software BORWIN versão 1.21 para cromatografia.

O nitrogênio amoniacal (N-NH₃) foi determinado pelo método de ácido salicílico. Foram adicionados aos tubos contendo amostras de líquido ruminal e ácido sulfúrico a 1 N, 1 mL de tungstato de sódio a 10%, e posteriormente as amostras foram centrifugadas a 1.200 x g durante 15 minutos. Em seguida foram pipetados 25 µL do sobrenadante a um tubo limpo e neste adicionados 5 mL do reagente fenol e 5 mL de hipoclorito.

Os tubos foram agitados para homogeneização das amostras e colocados em banho-maria a 37 °C durante 15 minutos adquirindo coloração azul. Após resfriamento as amostras foram analisadas em espectrofotômetro quanto a sua absorbância e os resultados obtidos foram utilizados em equação de regressão para calcular a concentração em mg/dL, onde: Concentração de N-NH₃ (mg/dL) = Absorbância - (a)/b; b= R² da equação elaborada a partir do padrão.

5.8 Síntese de proteína microbiana ruminal

As análises para determinação da síntese de proteína microbiana foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do VNP-FMVZ-USP. As amostras utilizadas para análise de alantoína no leite foram coletadas de dois dias alternados, sendo provenientes das duas ordenhas diárias. Uma alíquota de 10 mL de leite foi diluída com 5 mL de ácido tricloroacético a 25%, sendo filtrada em papel-filtro e congelada para posterior determinação dos níveis de uréia e alantoína no leite desproteínizado. Alíquotas de 50 mL de urina (amostra *spot*) foram obtidas de todas as vacas no 16º dia do período experimental, aproximadamente 4 horas após a alimentação, durante micção estimulada por massagem na vulva. A urina foi filtrada e alíquotas de 10 mL foram diluídas imediatamente em 40 mL de ácido sulfúrico a 0,036 N para evitar destruição bacteriana dos derivados de purinas e precipitação do ácido úrico. Uma amostra de urina pura foi armazenada para determinação dos compostos nitrogenados totais, de uréia e creatinina.

As concentrações de creatinina foram determinadas por meio de kits comerciais (Laborlab®), utilizando reação enzimática calorimétrica cinética em aparelho SBA-200 CELM®. O volume urinário total diário foi estimado dividindo-se as excreções urinárias diárias de creatinina pelos valores observados de concentração de creatinina na urina das amostras *spot*, segundo Oliveira et al. (2001).

A excreção urinária diária de creatinina foi estimada a partir da excreção média diária, estabelecida de 24,05 mg/Kg de peso vivo para vacas leiteiras (CHIZZOTTI, 2004). Dessa forma, com a excreção média diária de creatinina e a concentração de creatinina (mg/dL) na amostra *spot* de urina, foi estimado o volume total diário de urina, em litros por vaca/dia. Os níveis de alantoína na urina e os de ácido úrico na urina e alantoína do leite foram determinados pelo método colorimétrico, conforme metodologia de Fujihara et al. (1987), descrita por Chen e Gomes (1992).

A excreção total de derivados de purinas foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretadas na urina e da quantidade de alantoína excretada no leite, expressas em mmol/dia. As purinas microbianas absorvidas (Pabs, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de derivados de purinas (DP, mmol/dia), por meio da equação $Pabs = (DP - 0,236 * PV^{0,75}) / 0,84$, em que 0,84 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purina e $0,236 * PV^{0,75}$, a excreção endógena de derivados de purina (ORELLANA BOERO et al., 2001).

Foram avaliadas também as purinas absorvidas, considerando-se a excreção endógena de $0,512 \cdot PV^{0,75}$ e a recupedieta de 0,70 encontradas por González-Ronquillo et al. (2003). A síntese ruminal de compostos nitrogenados (N_{mic} , gN/dia) foi calculada com base nas purinas absorvidas (P_{abs} , mmol/dia), utilizando-se a equação (CHEN e GOMES, 1992): $N_{mic} = (70 \cdot P_{abs}) / (0,83 \cdot 0,134 \cdot 1.000)$, em que 70 é o conteúdo de N nas purinas (mgN/mol); 0,134, a relação N purina: N total nas bactérias (VALADARES et al., 1999); e 0,83, a digestibilidade intestinal das purinas microbianas.

5.9 Produção e composição do leite

As vacas foram ordenhadas mecanicamente duas vezes ao dia, às 6:00 e as 15:30 horas, sendo a produção de leite registrada diariamente durante todo o período experimental. A produção de leite foi corrigida para 3,5% de gordura (PLC) segundo fórmula de Sklan et al. (1992), onde $PLC = (0,432 + 0,1625 \cdot \text{teor de lipídio do leite}) \cdot \text{Kg de leite}$. Foi determinado o teor de gordura e proteína do leite.

As amostras utilizadas para análise da composição do leite foram obtidas no 16º de cada período experimental, sendo cada amostra proveniente das duas ordenhas diárias. Foram determinados também os teores de gordura, proteína e lactose. Para a determinação do teor de gordura no leite foram utilizadas amostras a fresco, segundo a metodologia descrita por Gerber (COELHO; ROCHA, 1977) no Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal do VNP-FMVZ-USP. Também foram realizadas as análises no leite de nitrogênio total (NT) e lactose utilizando o equipamento LACTOSCAN no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP. Para determinação da uréia e nitrogênio uréico no leite, as amostras de leite foram desproteinizadas da mesma forma que as amostras utilizadas na análise da alantoína. As análises da concentração de uréia no leite desproteinado foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, por meio de kits comerciais (Laborlab® e CELM®). A concentração de nitrogênio uréico no leite foi determinada indiretamente por meio da seguinte fórmula: Nitrogênio uréico = uréia (mg/dL)/2,14.

5.10 Parâmetros sanguíneos

As coletas de sangue foram realizadas no 19º dia de cada período experimental por punção da veia e/ou artéria coccígea, antes do fornecimento das dietas no período da manhã. As amostras foram coletadas em tubos com vácuo (*vacutainer*) de 10 mL para dosagem dos parâmetros sanguíneos glicose, colesterol total, colesterol-HDL, proteínas totais, albumina, uréia e nitrogênio uréico, as enzimas aspartato aminotransferase (AST) e gama glutamil transferase (GTT), no soro.

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

As análises das concentrações dos parâmetros sanguíneos foram realizadas no Laboratório de Bioquímica e Fisiologia Animal do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ-USP, por meio de kits comerciais (Laborlab® e CELM®) que utilizam método enzimático colorimétrico de ponto final, sendo a leitura realizada em analisador automático de bioquímica sanguínea (Sistema de Bioquímica Automático SBA-200 CELM®).

5.11 Avaliação do escore de condição corporal e peso corporal

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

5.12 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram submetidos ao SAS (Version 9.1.3, SAS Institute, Cary, NC 2004), verificando a normalidade dos resíduos e a homogeneidade das variâncias pelo PROC UNIVARIATE.

Os dados foram analisados, pelo PROC MIXED de acordo com a seguinte modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + Q_i + A_j + P_y + T_k + e_{ijk}$$

onde: Y_{ijk} = variável dependente, μ = média geral, Q_i = efeito de quadrado ($i = 1$ to 4), A_j = efeito de animal ($j = 1$ to 16), P_y = efeito do período ($y = 1$ to 4), T_k = efeito do tratamento ($k = 1$ to 4), e e_{ijk} = erro. Efeito aleatório $A_j P_y$ = efeito de animal e período respectivamente. Os graus de liberdade calculados foram realizados de acordo com o método satterthwaite ($ddfm = satterth$).

Os dados obtidos foram analisados por contrastes ortogonais, sendo: contraste C1 = controle vs fontes de gordura; C2 = óleo de soja vs gordura protegida; C3 = Megalac-E vs Lactoplus. Foi adotando nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Consumo e digestibilidade

Os resultados referentes ao consumo diário de MS e nutrientes, de acordo com as dietas experimentais, podem ser observados na tabela 4. Observou-se efeito ($P < 0,05$) no CMS e CMO, em que os animais submetidos às dietas com fontes de lipídios apresentaram menores valores no consumo do que aqueles que receberam a dieta controle. De forma semelhante, foi observado efeito ($P < 0,05$) para o consumo de FDN e CNF, no qual os animais que receberam dieta com adição de lipídios apresentaram menor consumo do que os animais receberam a dieta controle. Os animais submetidos às dietas com adição de lipídio apresentaram menor CMS, e como os níveis de CNF e FDN eram semelhantes entre as dietas, esse menor CMS levou à redução no consumo desses nutrientes.

O consumo de proteína bruta foi maior ($P < 0,05$) para a dieta controle em relação às dietas com adição de lipídios, justificado pelo consumo de matéria seca de acordo com a tabela 4. Foi observado efeito para o consumo de proteína bruta entre as fontes de lipídios, e os animais que receberam óleo de soja apresentaram menor valor em relação aos animais que consumiram sais de cálcio na dieta. Essas diferenças podem ser explicadas pela diferença numérica do consumo de matéria seca (Tabela 4) que foi menor para a dieta com óleo de soja e que refletiu no consumo de proteína bruta.

Foi observado efeito ($P < 0,05$) (Tabela 4) no consumo de EE, no qual os animais que receberam dietas com fontes de lipídios apresentaram maior consumo de EE do que os animais submetidos à dieta controle. Este resultado pode ser explicado pelo maior teor de EE das dietas com fontes de lipídios (Tabela 3). Também foi observado efeito ($P < 0,05$) para o consumo de extrato etéreo, nos animais que receberam óleo de soja, estes apresentaram maiores valores do que os animais que receberam sais de cálcio de ácidos graxos, resultados este explicado pelos teores de EE das dietas (Tabela 3).

Para dietas contendo de 5 a 6% de extrato etéreo na matéria seca, segundo o NRC (2001), a adição de óleo de sementes e ácidos graxos parcialmente hidrogenados reduz o consumo, de uma forma geral, e a adição de sais de cálcio de ácidos graxos nas dietas de vacas leiteiras resulta em diminuição linear no consumo de matéria seca. Assim, neste

experimento, a suplementação de ácidos graxos ω -6 tanto na forma de óleo de soja quanto na forma de sais de cálcio, apresentaram redução no consumo e não diferiram entre si.

Não foi observado efeito para o consumo de NDT ($P>0,05$) entre as dietas experimentais (Tabela 4), resultado este que pode ser explicado pelos teores de extrato etéreo apresentados pelas dietas experimentais (Tabela 3), pois mesmo ocorrendo diminuição de consumo de matéria seca para as dietas com ácidos graxos, estas apresentavam maiores teores de extrato etéreo e conseqüentemente maiores consumos de NDT. O consumo de EL_L foi maior ($P>0,05$) para as dietas com ácidos graxos em relação à dieta controle (Tabela 4), o que pode ser justificado pela maior EL_L das dietas com fontes de lipídios (Tabela 3).

Embora existam estudos sobre o uso de lipídio na dieta de vacas em lactação, os mecanismos pelo qual esta suplementação influencia o consumo ainda não estão devidamente elucidados. No entanto, de acordo com Allen (2000), há fortes evidências de que o efeito do lipídio sobre a fermentação ruminal, motilidade intestinal, aceitabilidade da dieta com suplemento, liberação de hormônios intestinais, mecanismos regulatórios que controlam a ingestão de alimentos e a capacidade limitada dos ruminantes de oxidar os ácidos graxos sejam as principais razões da inibição de consumo.

Rabiee et al. (2012) apresentaram que todas as fontes suplementares de ácidos graxos causam uma diminuição no CMS, em média de 880 g/vaca/dia, sendo que a maior redução é observada quando os sais de cálcio de ácidos graxos são utilizados como fontes de lipídios suplementar, o qual apresenta redução média no CMS de 2,11 kg/vaca/dia em comparação com dietas sem de fontes suplementares de ácidos graxos. Esses mesmos autores também acrescentaram, por meio de regressão multivariada, que o fator determinante para o controle do CMS não está inteiramente relacionado com os níveis de ácidos graxos nas dietas, mas sim com o tempo e o período de suplementação das fontes de ácidos graxos, independentemente do grau de insaturação destas fontes.

Tabela 4- Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) do consumo e digestibilidade aparente total da matéria seca e nutriente de acordo com as dietas experimentais

Parâmetros	Dietas experimentais ¹				Média	EPM	Probabilidades ²		
	C	OS	SC1	SC2			C1	C2	C3
<i>Consumo kg/dia</i>									
Matéria seca	23,18	21,24	21,98	21,91	22,08	0,32	0,003	0,074	0,862
Matéria orgânica	21,16	19,61	19,92	19,86	20,14	0,29	0,002	0,406	0,865
Proteína bruta	4,31	3,93	4,08	4,07	4,10	0,05	0,003	0,047	0,871
Extrato etéreo	0,72	1,32	1,26	1,23	1,13	0,03	<0,001	0,003	0,179
Fibra detergente neutro	6,74	6,11	6,36	6,36	6,39	0,10	0,001	0,080	0,984
Carboidrato não fibrosos	9,35	8,26	8,22	8,26	8,52	0,13	<0,001	0,899	0,822
Nutrientes digestíveis totais	16,58	16,25	16,33	16,12	16,32	0,22	0,189	0,922	0,515
<i>Mcal/dia</i>									
Energia líquida lactação	43,12	47,78	47,24	45,96	45,02	0,68	<0,001	0,172	0,199
<i>Coefficiente de Digestibilidade %</i>									
Matéria seca	70,17	72,62	72,48	70,98	71,56	0,54	0,081	0,425	0,246
Matéria orgânica	72,02	74,66	73,98	72,51	73,29	0,55	0,109	0,203	0,252
Proteína bruta	75,71	77,64	77,66	76,48	76,87	0,47	0,088	0,540	0,281
Extrato etéreo	80,94	88,79	88,19	87,10	86,51	0,71	<0,001	0,098	0,457
Fibra detergente neutro	54,61	53,96	58,07	55,55	55,55	0,71	0,379	0,063	0,151
Carboidrato não fibrosos	75,69	77,71	75,93	74,38	75,93	0,92	0,866	0,200	0,497
NDT ³	64,89	71,37	69,18	66,88	68,08	0,61	<0,001	0,002	0,060
<i>Consumo % PC⁴</i>									
Matéria seca	3,64	3,34	3,45	3,45	3,47	0,04	0,004	0,090	0,957
Fibra detergente neutro	1,06	0,96	1,00	1,00	1,00	0,01	0,001	0,104	0,960

¹Controle; Óleo de soja refinado, Sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac-E®); Sais de cálcio de ácidos graxos (Lactoplus®);

²C1 = controle vs fontes de ácidos graxos; C2 = óleo de soja vs sais de cálcio; C3 = sais de cálcio 1 vs sais de cálcio 2;

³Nutrientes digestíveis totais; ⁴PC: peso corporal.

Freitas Júnior et al. (2008), utilizaram vacas no terço médio de lactação, com média de produção de 25 Kg/dia, e observaram menor consumo de matéria seca para os animais suplementados com sais de cálcio de ácidos graxos. As fontes utilizadas nesse trabalho foram óleo de soja, grão de soja cru e integral e sais de cálcio de ácidos graxos, e os resultados foram semelhantes aos encontrados no presente estudo. Weiss e Wyatt (2004) também encontraram menor CMS para dietas contendo 3,2% de sais de cálcio em relação a dietas com 1,2% de sais de cálcio e triglicerídeos hidrogenados de óleo de palma.

De acordo com os experimentos realizados no nosso grupo de pesquisa como os de Barletta (2010); Maturana Filho (2009); Freitas Júnior (2009, 2012) e Gandra (2012) e dos resultados encontrados em literatura (UEDA et al., 2003; ZHENG et al., 2005; NORBERG, 2006) em vacas em início de lactação geralmente não é observado efeito no consumo de MS,

no entanto em vacas em meio e final de lactação, com DEL acima de 100 dias, pode ocorrer pequena redução no consumo de MS quando fontes de lipídeos são adicionadas as dietas (WEISS; WYATT, 2004; VARGAS et al, 2002).

Os resultados de digestibilidade aparente total da matéria seca e dos nutrientes podem ser observados na tabela 4. Não houve diferença ($P>0,05$) na digestibilidade aparente total da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta, fibra detergente neutra e carboidratos não fibrosos entre as dietas experimentais.

Alguns autores (SCHAUFF; CLARK, 1992; BEN SALEM, 1993; CHOUINARD; GIRARD; BRISSON, 1998) tem observado diminuição na digestibilidade da fibra quando se adiciona fontes lipídicas às dietas, e a magnitude de redução está relacionada não somente a quantidade, mas também ao tipo de ácido graxo presente nas fontes, sendo que lipídios compostos por ácidos graxos insaturados tendem a provocar maior depressão na digestibilidade (DOREAU; CHILLIARD, 1997). Entretanto, quando esta fonte de lipídio é fornecida na forma de sementes oleaginosas ou sais de cálcio de ácidos graxos estes efeitos na digestibilidade podem ser amenizados ou mesmo não existirem devido a lenta liberação dos ácidos graxos no ambiente ruminal.

Gandra (2012) comparou a inclusão de sementes oleaginosas (semente de linhaça e grão de soja cru e integral) com sais de cálcio de ácidos graxos na dieta de vacas em lactação e não encontrou efeito na digestibilidade da matéria seca, matéria orgânica, proteína bruta e FDN nas dietas experimentais. Freitas Júnior et al. (2008) não encontrou diferença na digestibilidade aparente total dos nutrientes nas dietas com adição de ácidos graxos. Ao avaliar a inclusão de óleo de soja, grão de soja cru e integral e sais de cálcio em dietas para vacas em lactação, Freitas Júnior (2012) também não observou efeito das fontes de lipídios sobre a digestibilidade da MS e nutrientes.

Foi observado efeito ($P<0,05$) na digestibilidade do NDT (Tabela 4), em que os animais que receberam fontes de lipídio apresentaram maiores valores devido a maior digestibilidade do extrato etéreo. Com relação ao consumo de matéria seca e FDN em %PC foi observado efeito ($P>0,05$) entre as dietas experimentais, que é justificado pelo consumo de matéria seca e de FDN que foi maior para a dieta sem adição de ácidos graxos (Tabela 4).

O efeito do uso de lipídios sobre a digestibilidade dos nutrientes da dieta pode ser influenciado por uma série de fatores, especialmente pela característica inerente ao suplemento e sua forma de utilização, como o nível e tipo do suplemento utilizado, e o tipo de volumoso utilizado durante a suplementação. A redução na digestibilidade da matéria seca total e da fibra pode reduzir a taxa passagem e, conseqüentemente, o consumo de matéria

seca. Fontes de lipídio na forma de óleos reduzem a digestibilidade aparente total da fibra quando utilizados silagem de milho como volumoso (Ben Salem et al., 1993).

De acordo com Jenkins (1993), os lipídios da dieta diminuem a digestibilidade da fibra por formar um filme que recobre a partícula de alimento, impedindo a adesão microbiana ou por efeito tóxico direto sobre as bactérias celulolíticas. Segundo o NRC (2001), o aumento no grau de insaturação de ácidos graxos fornecidos na dieta pode aumentar a digestibilidade da fonte de lipídio, porém se houver reduções no consumo de matéria seca, a porcentagem de gordura no leite e digestibilidade da fibra são indicadores que a fermentação ruminal foi alterada pela suplementação do lipídio.

Os dados apresentados nesse estudo foram descritos anteriormente na literatura, em que a adição de ácidos graxos na dieta de vacas em lactação notadamente no terço médio da lactação, reduz o consumo de matéria seca e de nutrientes, exceto o consumo de extrato etéreo, que é maior para as fontes de lipídios. Os mecanismos que causam essa redução não estão devidamente elucidados e precisa de mais estudos que avaliem diferentes fontes de lipídios em condições específicas de fornecimento. No entanto, apesar de reduzir o consumo de matéria seca, a adição de ácidos graxos melhorou o NDT observado das dietas, resultou em melhor consumo de energia e as fontes de SC não influenciaram na digestibilidade do FDN.

6.2 Fermentação ruminal

A tabela 5 apresenta os resultados referentes ao pH, N-NH₃ ruminal, concentrações molares e percentuais de ácido acético, propiônico e butírico, percentual do total de AGCC e relação acetato:propionato. Não houve efeito ($P>0,05$) das dietas experimentais sobre os valores de pH ruminal e N-NH₃, mesmo para as vacas que apresentaram menor consumo ($P<0,05$) (Tabela 4) com dietas contendo lipídio em relação às que receberam a dieta controle.

Não foi observado efeito ($P>0,05$) na concentração em mmol/L de ácido acético, propiônico e butírico, assim como também não ocorreu efeito das dietas com adição de lipídios na concentração total de ácido graxo de cadeia curta e na relação acetato:propionato (Tabela 5). No entanto, a porcentagem de ácido acético e propiônico apresentaram efeito ($P<0,05$) para as dietas com sais de cálcio de ácidos graxos, em que a dieta sais de cálcio 2 teve redução de ácido acético e aumento de ácido propiônico em relação a dieta sais de cálcio 1 (Tabela 5). A porcentagem de ácido butírico não apresentou efeito ($P>0,05$).

Karnati et al. (2009) não encontraram diferença nas concentrações de N-NH₃ (18,4; 18,4; 18,5; 18,6 mg/dL) ao comparar dietas sem suplementação com 5% de lipídio insaturado, 2,5 μ M de monensina e 250 μ M de bromoetanossulfato com a dieta controle. Esses mesmos autores não encontraram também efeito negativo da adição de lipídios na concentração total e individual de AGV, assim como também não houve efeito sobre a relação acetato:propionato. Weiss e Wyatt (2004) não observaram efeito no pH, N-NH₃ e no total de AGV (mmol/L) nas dietas com a inclusão de 1,5 e 3,0% de sais de cálcio em relação à dieta controle.

Havartine e Allen (2006) utilizando a inclusão de 5% de AG saturado, 2,5% de AG saturado e mais 2,9% de sais de cálcio, e 5,7% de sais de cálcio na dieta em vacas em lactação observaram efeito na concentração e perfil de AGV nas dietas com lipídios em relação à dieta controle. Nesse trabalho houve redução de acetato (52,5; 49,3; 49,8; 50,2 mmol/L) e aumento da concentração de propionato (32,1; 33,9; 34,0; 33,4 mmol/L).

Tabela 5 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros de fermentação ruminal em função das dietas experimentais

Parâmetros	Dietas experimentais ¹				Média	EPM	Probabilidades ²		
	C	OS	SC1	SC2			C1	C2	C3
pH	6,58	6,61	6,67	6,64	6,62	0,03	0,410	0,520	0,767
	mg/dL								
N-NH ₃	18,68	22,41	18,69	21,69	20,37	0,84	0,153	0,185	0,121
	mmol/L								
Acético	95,88	95,96	90,81	91,85	93,62	3,37	0,716	0,598	0,918
Propiônico	30,71	27,83	26,53	30,84	28,98	1,33	0,464	0,795	0,265
Butírico	15,95	15,29	15,74	15,75	15,68	0,67	0,822	0,788	0,998
Total de AGCC	142,54	139,08	133,09	138,45	138,28	5,11	0,648	0,801	0,725
	%								
Acético	68,04	69,15	68,76	66,47	68,10	0,43	0,910	0,069	0,020
Propiônico	21,00	19,67	19,75	22,25	20,66	0,50	0,610	0,149	0,021
Butírico	10,95	11,17	11,48	10,36	11,22	0,18	0,412	0,661	0,673
	Mmol								
Rel C2/C3 ³	3,37	3,48	3,54	3,04	3,44	0,10	0,926	0,389	0,052

¹Controle; Óleo de soja refinado, Sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac-E®); Sais de cálcio de ácidos graxos (Lactoplus®); ²C1 = controle vs fontes de ácidos graxos; C2 = óleo de soja vs sais de cálcio; C3 = sais de cálcio 1 vs sais de cálcio 2; ³Relação acético: propiônico.

Freitas Júnior (2008) ao avaliar a inclusão de ácidos graxos na dieta na forma de óleo de soja refinado, grão de soja cru e integral e sais de cálcio, não observou efeito das fontes de lipídios sobre as concentrações de ácidos graxos de cadeia curta, em porcentagem e proporção molar. Utilizando as mesmas dietas, Freitas Júnior (2012) não encontrou efeito das fontes de lipídios sobre as concentrações molares do total de AGCC e dos ácidos acético, propiônico e butírico.

De acordo com os resultados desse experimento, pode-se afirmar que a inclusão de 3% de lipídios na dieta de vacas em lactação não alterou pH, no N-NH₃ e a fermentação ruminal.

6.3 Síntese de proteína microbiana

Os resultados referentes à síntese de proteína microbiana em função das dietas experimentais estão apresentados na tabela 6. Não foi observado efeito ($P>0,05$) na excreção em mmol/L de alantoína no leite e na urina. Não houve diferença ($P>0,05$) nas excreções diárias em mmol/dia de alantoína na urina e no leite, e ácido úrico na urina e para a produção de urina em L/dia, entre as dietas experimentais. De forma semelhante, não houve diferença nas concentrações ($P>0,05$) das purinas totais e purinas absorvíveis em mMol/dia (Tabela 6). Foi encontrado efeito ($P<0,05$) na excreção em mmol/L de ácido úrico na urina, em que a dieta com óleo de soja foi maior que as fontes de sais de cálcio de ácidos graxos. A relação alantoína e derivados de purina apresentou efeito ($P<0,05$) entre as dietas com sais de cálcio de ácidos graxos (Tabela 6).

Não foi observada diferença ($P>0,05$) para a produção de nitrogênio microbiano e proteína bruta microbiana, em g/dia, entre as dietas experimentais (Tabela 6). Da mesma maneira não foi observada diferença ($P>0,05$) na eficiência da síntese de proteína microbiana entre as dietas experimentais (Tabela 6).

A síntese de proteína microbiana é um dos produtos da fermentação ruminal, dessa forma qualquer alteração dos seus resultados é indicativo que a microbiota ruminal sofreu efeito da dieta. Assim, os resultados desse experimento demonstraram que as adições das fontes de lipídios das dietas experimentais não alteraram a produção de proteína microbiana ruminal mostrando o potencial da utilização dessas fontes de ácidos graxos nas dietas em vacas em lactação.

De acordo Palmquist e Mattos (2006), a suplementação com fontes de ácidos graxos reduz a quantidade de carboidratos rapidamente fermentáveis, podendo diminuir a quantidade de substrato disponível para a síntese de proteína microbiana. Porém, alguns resultados encontrados na literatura (FREITAS JÚNIOR et al. 2010; VASCONCELOS et al. 2010) não demonstraram efeito da adição de lipídios na dieta sobre a síntese de proteína microbiana.

Tabela 6 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) da síntese de proteína microbiana em função das dietas experimentais

Parâmetros ³	Dietas experimentais ¹				Média	EPM	Probabilidades ²		
	C	OS	SC1	SC2			C1	C2	C3
	<i>Mmol/L</i>								
Al-leite	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,001	0,619	0,615	0,225
Al-urina	5,82	6,21	5,25	6,21	6,02	0,29	0,624	0,067	0,153
Ác-úrico	5,25	6,27	5,21	4,87	5,40	0,29	0,711	0,041	0,613
	<i>Mmol/dia</i>								
Al-leite	1,00	1,06	1,12	0,95	1,03	0,06	0,608	0,758	0,104
Al-urina	183,82	202,06	167,28	190,32	185,87	7,36	0,860	0,165	0,232
Ác-úrico	163,04	182,56	164,10	153,49	165,80	6,82	0,781	0,097	0,513
Pt	347,87	385,69	332,51	344,77	352,71	12,04	0,787	0,070	0,676
Alan:Pt	53,26	52,22	50,52	55,78	52,95	1,03	0,828	0,653	0,034
Pabs	575,39	651,31	550,75	564,42	585,47	23,58	0,772	0,064	0,810
	<i>g/dia</i>								
N mic	362,14	409,92	346,63	355,24	368,48	14,84	0,772	0,064	0,810
Pb mic	2317,95	2562,02	2166,46	2220,25	2316,67	91 50	0,992	0,063	0,809
	<i>g Pbmic/Kg NDT</i>								
Eficiência	141,51	160,30	135,44	142,65	144,97	6,50	0,689	0,089	0,610
	<i>L/dia</i>								
Urina	15,18	14,87	14,08	16,26	16,03	1,43	0,720	0,478	0,069

¹Controle; Óleo de soja refinado; Sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac-E®); Sais de cálcio de ácidos graxos (Lactoplus®);

²C1 = controle vs fontes de ácidos graxos; C2 = óleo de soja vs sais de cálcio; C3 = sais de cálcio 1 vs sais de cálcio 2;

³Alantoína no leite (Al-leite); Alantoína na urina (Al-urina), Ácido úrico (Ác-úrico); Purinas totais (Pt); Derivados de purinas (Dp); Purinas absorvíveis (Pabs); Nitrogênio microbiano (N mic); Proteína microbiana (Pb mic).

FREITAS JÚNIOR et al. (2010), utilizando inclusão de 3% de sais de cálcio de ácidos graxos insaturados e óleo de soja, e 16% de grão de soja cru na matéria seca das dietas, e VASCONCELOS et al. (2010) trabalhando com vacas de alta produção alimentadas com

diferentes formas da soja, não encontraram efeito das dietas com ácidos graxos sobre a síntese microbiana ruminal.

Barletta (2010) não observou alteração na síntese de proteína microbiana utilizando até 24% de inclusão de grão de soja nas dietas, encontrando como nitrogênio microbiano 269,90 g/dia. Resultado semelhante foi encontrado por Naves (2010), que utilizou 20% de grão de soja nas dietas, encontrando como nitrogênio microbiano 225,98 g/dia. Venturelli (2011) também não observou efeito da inclusão de grão de soja cru e integral até o nível de 27% na MS sobre a síntese de proteína microbiana e obteve como nitrogênio microbiano 171,28 g/dia.

GOZHO et al. (2008) avaliaram a excreção dos derivados de purina e nitrogênio microbiano total com a suplementação de sementes de canola e de linhaça como fontes de lipídios em dietas com média de 5,2% de extrato etéreo, em vacas da raça Holandês, e também não observaram efeito das fontes de lipídios sobre a excreção dos derivados de purina e nitrogênio microbiano total. Freitas Júnior (2012) não encontrou diferença nas excreções de derivados de purina, produção de nitrogênio microbiano, proteína bruta microbiana e eficiência da síntese de proteína microbiana entre as dietas com adição de 16,0% grão de soja, 3,0% de óleo de soja e 3,0% de sais de cálcio na matéria seca.

Assim os resultados obtidos neste experimento sugerem que a suplementação de lipídios na dieta, tanto na forma de óleo de soja livre ou óleo de soja protegido por sais de cálcio não afetam a síntese de proteína microbiana ruminal.

6.4 Balanço de nitrogênio

Houve efeito ($P < 0,05$) das dietas experimentais sobre o consumo de nitrogênio total (g/dia) (Tabela 7), em que a dieta controle apresentou maior consumo do que as dietas com ácidos graxos, explicado pelo maior consumo de matéria seca e proteína bruta da dieta sem lipídios (Tabela 4). As dietas com sais de cálcio apresentaram maior consumo ($P < 0,05$) de nitrogênio total (g/dia) em relação à dieta com óleo de soja, justificado também pela diferença no consumo de matéria seca e de proteína bruta (Tabela 4) entre as fontes de ácidos graxos.

A excreção (g/dia) de nitrogênio nas fezes foi maior ($P < 0,05$) para a dieta controle do que as dietas com lipídios, explicado pelo maior consumo de nitrogênio total (g/dia) (Tabela 7) da dieta sem ácidos graxos. No entanto a porcentagem de nitrogênio das fezes em relação ao consumo de nitrogênio total (g/dia) não apresentou efeito ($P > 0,05$).

Não foi observado efeito ($P>0,05$) para o balanço de nitrogênio (em g/dia), porcentagem do nitrogênio total consumido, eficiência de utilização de nitrogênio para produção de leite, excreção de nitrogênio (% e g/dia) na urina e no leite (Tabela 7).

Tabela 7 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) para balanço de nitrogênio em função das dietas experimentais.

Variável	Dietas experimentais ¹				Médias	EPM	Probabilidades ²		
	C	OS	SC1	SC2			C1	C2	C3
	<i>Consumo (g/dia)</i>								
Nitrogênio Total	689,60	628,80	652,80	651,20	655,60	8,66	<0,001	0,030	0,845
	<i>Excreção (g/dia)</i>								
Fecal	185,34	160,30	164,16	175,65	171,36	6,14	0,006	0,159	0,145
Urinário	170,61	169,13	170,75	154,81	166,32	5,21	0,578	0,561	0,210
Leite	149,61	148,57	148,08	149,81	149,01	3,67	0,809	0,912	0,664
	<i>Balanço (g/dia)</i>								
Nitrogênio	184,04	150,80	169,81	170,93	168,91	14,60	0,586	0,130	0,972
	<i>Excreção (% Nitrogênio Total)</i>								
Fecal	26,87	25,49	25,15	26,92	26,13	0,72	0,051	0,272	0,212
Urinário	24,74	26,89	26,15	23,77	25,36	1,68	0,640	0,087	0,124
Leite	22,10	23,09	22,36	23,18	22,68	0,62	0,076	0,173	0,518
	<i>Balanço (% Nitrogênio Total)</i>								
Nitrogênio	26,68	23,98	26,01	26,24	25,76	1,07	0,524	0,630	0,842
	<i>g Nitrogênio no Leite/g Nitrogênio Consumido</i>								
Eficiência	0,22	0,23	0,22	0,23	0,22	0,06	0,088	0,101	0,618

¹Controle; Óleo de soja refinado; Sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac-E®); Sais de cálcio de ácidos graxos (Lactoplus®); ²C1 = controle vs fontes de ácidos graxos; C2 = óleo de soja vs sais de cálcio; C3 = sais de cálcio 1 vs sais de cálcio 2;

Côrtes et al. (2010) não encontraram diferença no balanço de N em seu experimento, no qual utilizaram a inclusão de sais de cálcio e semente de linhaça como fonte de ácidos graxos. Weiss e Wyatt (2004) utilizaram baixa e alta inclusão de sais de cálcio e triglicerídeos hidrogenados e encontraram menor excreção de nitrogênio nas fezes para as fontes com lipídios e maior excreção de nitrogênio na urina em relação à dieta controle. Barletta (2010), trabalhando com níveis crescentes de extrato etéreo não observou efeito no balanço de nitrogênio nas dietas que receberam 4,0 e 6,0% de EE em relação à dieta controle.

Assim como o estudo apresentado, Freitas Júnior (2008) observou menor consumo de nitrogênio total e menor excreção de nitrogênio nas fezes para as vacas alimentadas com sais

de cálcio de ácidos graxos, conseqüente da redução no consumo de matéria seca, contudo não encontrou efeito das dietas com lipídios sobre o balanço de nitrogênio e excreção de nitrogênio no leite e na urina.

6.5 Balanço de energia

Ao avaliar o consumo de energia bruta não foi observado diferença ($P>0,05$) entre as dietas experimentais (Tabela 8). Este resultado está de acordo com o CMS e o consumo de EE, onde o menor consumo de MS apresentado pelos animais submetidos às dietas com fontes de lipídios foi compensado pelo maior consumo de EE (Tabela 4), o que explica esta igualdade no consumo de EB.

No entanto, o consumo de energia metabolizável e consumo de energia digestível sofreu influência ($P<0,05$) pelas dietas experimentais, em que SC1 apresentou maior consumo de EM e ED que o SC2 (Tabela 9). Estes resultados podem ser justificados pelo consumo de MS em que os animais submetidos à dieta saís de cálcio 1 apresentaram um consumo de MS um pouco superior que a dieta saís de cálcio, e também pelo coeficiente de digestibilidade da MS (Tabela 4), que foi numericamente maior para à dieta saís de cálcio 1 em relação à dieta saís de cálcio 2. Estes coeficientes de digestibilidade são usados para o cálculo do consumo de ED ($CE_D = CE_B * CD_{MS}$) e para o consumo de EM ($CE_M = CE_D * 0,83$) (NRC, 2001; HAVARTINE; ALLEN, 2006).

O consumo de energia líquida de lactação apresentou efeito ($P<0,05$), em que as dietas com adição de lipídios na dieta apresentaram maiores valores de EL_L (Tabela 9). A utilização de energia líquida pode ser alterada pelos suplementos de lipídios, possivelmente devido às diferenças na digestibilidade de ácidos graxos específicos presentes nos suplementos utilizados (Tabela 4).

Ao avaliar a produção de energia EL_L não apresentou efeito ($P>0,05$) de tratamentos. Em relação produção de EL_G foi maior ($P<0,05$) para as dietas com ácidos graxos (Tabela 9), isso pode ter ocorrido porque a produção de energia líquida de lactação foi suficiente para suprir a demanda de produção e o excedente foi direcionado para o aumento da produção de energia líquida de ganho.

Em relação ao balanço de energia não foi observado efeito ($P>0,05$) entre as dietas experimentais (Tabela 9), estes dados podem ser explicados pela fase de lactação na qual os animais se encontram (balanço energético positivo). Esse modelo de cálculo foi escolhido por ser o mais utilizado para cálculo de balanço de energia e por eliminar os erros de aumento de ganho de peso

vivo que podem superestimar o aumento nas exigências de manutenção (HARVATINE; ALLEN, 2006).

Tabela 8 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) para o balanço de energia em função das dietas experimentais.

Parâmetros	Dietas experimentais ¹				Média	EPM	Probabilidades ²		
	C	OS	SC1	SC2			C1	C2	C3
<i>Consumo</i>									
EB ³ (Mcal/dia)	87,50	86,94	90,53	86,78	87,94	1,50	0,773	0,430	0,139
EM ⁴ (Mcal/dia)	52,12	54,08	56,15	51,81	53,54	1,14	0,248	0,954	0,035
ED ⁵ (Mcal/dia)	61,34	63,69	66,14	61,03	63,05	1,34	0,235	0,954	0,035
EL _L ⁶ (Mcal/dia)	42,40	49,34	48,74	45,62	46,52	0,93	<0,001	0,140	0,069
<i>Produção</i>									
EL _L ⁷ (Mcal/dia)	21,51	20,93	21,30	21,66	21,35	0,52	0,624	0,229	0,492
EL _G ⁸ (g)	10,72	18,28	17,27	13,83	15,02	0,89	<0,001	0,076	0,055
<i>Balanço de energia</i>									
Balanço	10,17	10,13	10,16	10,12	10,15	0,11	0,323	0,937	0,172
<i>Eficiência energética</i>									
EL _L /CED	0,36	0,34	0,33	0,36	0,35	0,008	0,058	0,367	0,027
EL _L +EL _G /CED	0,53	0,61	0,58	0,58	0,58	0,006	<0,001	0,015	0,928

¹Controle; Óleo de soja refinado; Sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac-E®); Sais de cálcio de ácidos graxos (Lactoplus®); ²C1 = controle vs fontes de ácidos graxos; C2 = óleo de soja vs sais de cálcio; C3 = sais de cálcio 1 vs sais de cálcio 2; ³Energia bruta; ⁴Energia metabolizável; ⁵Consumo de energia digestível; ⁶Energia líquida; ⁷Energia líquida de lactação; ⁸ Energia líquida de ganho.

Foi observado efeito ($P < 0,05$) na eficiência para o consumo de energia líquida de lactação, em que as fontes de lipídios protegidas no rúmen apresentaram diferença entre si. Este resultado pode ser explicado pela diferença do consumo de ED que foi maior para SC1, e como a produção e consumo de EL_L não apresentou efeito ($P > 0,05$) para essas fontes, portanto o SC2 apresentou maior eficiência.

Houve efeito ($P < 0,05$) na eficiência líquida de produção em que as fontes com adição de lipídios apresentaram maior eficiência em relação a dieta controle, e a dieta com adição de ácidos graxos livres apresentou maior eficiência de produção do que as fontes de ácidos graxos protegidos no rúmen, estas não diferiram entre si (Tabela 9). Entretanto, é preciso considerar que a composição do ganho de peso corporal não foi determinada, dessa forma, possivelmente o cálculo de ganho de energia líquida de peso corporal pode superestimar a energia líquida retida.

Freitas Júnior (2008) utilizou fontes de lipídios e encontrou aumento da eficiência energética das dietas contendo sais de cálcio (0,37), no entanto não houve efeito no balanço de energia. Weiss et al. (2011), ao suplementarem vacas em lactação com fontes de lipídios com

diferentes formas (AG saturados e livres, triacilglicerídeos e sais de cálcio de ácido graxo) obteve maior consumo de ED para as dietas experimentais com ácidos graxos.

O consumo de ED foi maior para fontes de sais de cálcio e também aumentou de acordo com maior concentração de sais de cálcio na dieta (7,3 Mcal/kg de MS) segundo Weiss e Wyatt (2004). De acordo com esses autores se houver um erro na estimativa do consumo de EL de lactação, este se encontra na conversão da ED em EL_L pois a concentração de ED é estimada com precisão pelo NRC (2001), e afirmam ser necessários mais estudos para obter melhores comparações entre EL_L real e a estimada.

Havartine e Allen (2006), não encontraram diferença no balanço energético ao suplementarem dietas com fontes de lipídios saturados, saturados e sais de cálcio e somente sais de cálcio em relação a dieta sem ácidos graxos, para vacas canuladas (11,5; 12,6; 11,2; 8,6 Mcal/dia) . Assim, o balanço de energia não foi alterado pela adição de ácidos graxos insaturados nas dietas experimentais tanto na forma livre como complexada ao cálcio. Apesar das dietas com fontes de lipídios ter provocado uma redução no CMS, estas promoveram maior aproveitamento de energia e o SC2 apresentou-se a fonte de ácidos graxos mais eficiente para produção de energia líquida de lactação.

6.6 Produção e composição do leite

Não houve efeito ($P>0,05$) das fontes das dietas experimentais sobre a produção de leite, produção de leite corrigida (Tabela 7). A produção de lactose e proteína em kg/dia não apresentaram efeito ($P>0,05$), assim como também a porcentagem de gordura e lactose não sofreram alterações ($P>0,05$) para os animais alimentados com ácidos graxos insaturados na dieta.

A produção (kg/dia) de gordura no leite apresentou efeito ($P<0,05$) para às dietas experimentais com adição de lipídios (Tabela 7), em que as fontes com sais de cálcio tiveram maior produção que a dieta com óleo de soja. Portanto, essa diferença entre as dietas, óleo de soja e sais de cálcio, pode ser atribuída à diferença numérica na produção de leite e no teor que foi maior para às dietas com sais de cálcio de ácidos graxos.

Houve efeito ($P<0,05$) na porcentagem de proteína do leite (Tabela 7), no qual a dieta contendo óleo de soja apresentou maior porcentagem em relação às fontes de sais de cálcio de ácidos graxos insaturados. Este resultado pode ser justificado pela diferença numérica na

produção de leite que foi menor para a dieta de óleo de soja em relação às demais dietas experimentais.

Weiss, Pinos-Rodríguez e Wyatt (2011), utilizando adição de 3% de lipídios nas dietas experimentais, não encontrou diferença na produção de leite, porém as vacas alimentadas com sais de cálcio apresentaram menor concentração proteica no leite (0,10%), sem alterar a produção de proteína no leite. Segundo esses autores o mecanismo pelo qual a suplementação de lipídios reduz a porcentagem de proteína não é conhecida, mas podem envolver o fornecimento de proteína metabolizável e atribuíram essa redução ao menor consumo de MS e consequentemente de proteína metabolizável para a dieta contendo sais de cálcio.

Tabela 9 – Médias e erro padrão da média (EPM) da produção e composição do leite em função das dietas experimentais

Parâmetros	Dietas experimentais ¹				Média	EPM	Probabilidades ²			
	C	OS	SC1	SC2			C1	C2	C3	
	<i>kg/dia</i>									
Produção de Leite	31,82	31,30	32,68	32,24	32,01	1,64	0,680	0,075	0,553	
Produção Corrigida ³	32,21	31,23	32,87	32,48	32,20	1,56	0,592	0,083	0,438	
Gordura	1,13	1,09	1,15	1,14	1,13	0,06	0,460	0,036	0,283	
Lactose	1,43	1,42	1,49	1,45	1,45	0,07	0,573	0,236	0,352	
Proteína	0,95	0,95	0,96	0,96	0,96	0,05	0,814	0,803	0,734	
	<i>Porcentagem</i>									
Gordura	3,56	3,47	3,52	3,53	3,52	0,22	0,135	0,182	0,869	
Lactose	4,54	4,54	4,51	4,52	4,52	0,06	0,413	0,159	0,351	
Proteína	3,02	3,04	3,01	2,98	3,01	0,04	0,575	0,011	0,270	

¹Controle; Óleo de soja refinado; Sais de cálcio de ácidos graxos (Megalac-E®); Sais de cálcio de ácidos graxos (Lactoplus®); ²C1 = controle vs fontes de ácidos graxos; C2 = óleo de soja vs sais de cálcio; C3 = sais de cálcio 1 vs sais de cálcio 2; ³Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura.

Segundo Santos et al. (2001), os lipídios aumentam a eficiência energética para a síntese do leite, sem aumentar a extração de aminoácidos pela glândula mamária, resultando em depressão do conteúdo da proteína do leite. Ainda, de acordo com o mesmo autor, decréscimos na concentração da proteína do leite com adição de lipídios na dieta pode ser resultado de suprimento insuficiente de aminoácidos para produção de proteína do leite, necessária para acompanhar o aumento da produção de leite, estimulado pela suplementação com lipídios.

Relling e Reynolds (2007) avaliaram a suplementação de ácidos graxos inertes no rúmen e não encontraram diferença na produção de leite entre as dietas experimentais. Lundy (2004) em seu experimento comparou o fornecimento de óleo de soja em diferentes formas (2,45% óleo de soja, 2,75% de sais de cálcio e amido de óleo de soja, sais de cálcio de óleo de soja e amido de óleo de soja) e encontrou maior produção de leite para a dieta com óleo de soja (34,6; 32,5; 32,0; 32,4) e redução na porcentagem de gordura para as dietas com óleo de soja protegido (3,11; 2,56; 3,04; 2,46).

Chouinard; Girard, e Brisson (1998) compararam dieta sem adição de lipídios com 3 dietas recebendo a inclusão de 4% de diferentes fontes de sais de cálcio (canola, soja e linhaça) e não encontraram diferença na produção de leite (35,9; 36,2; 37,0; 38,8 kg/dia), no entanto observaram efeito na produção de leite corrigido para dietas com adição de lipídios (35,7; 30,1; 31,4; 35,2 kg/dia). Nesse mesmo estudo, houve redução no teor (4,05; 2,67; 2,98; 3,56%) e rendimento de produção de gordura (1,43; 1,03; 1,11; 1,32 kg/dia) no leite, para as dietas contendo sais de cálcio em relação à dieta sem adição de ácidos graxos.

FREITAS JUNIOR et al. (2010) avaliaram a inclusão de óleo de soja, sais de cálcio e grão de soja em dietas com 5,5 % de EE na matéria seca total, em vacas no terço médio de lactação e observaram que os animais que consumiram a dieta com sais de cálcio de ácidos graxos apresentaram menor teor de gordura no leite em relação à dieta grão de soja cru e integral mas não diferenciou das dietas controle e óleo de soja, e atribuiu esse resultado à formação de ácidos graxos intermediários da biohidrogenação no rúmen, já que não houve redução da digestibilidade de fibra ou alterações no padrão de fermentação no rúmen.

6.7 Parâmetros sanguíneos

De acordo com os resultados dos parâmetros sanguíneos (Tabela 10), as concentrações no soro de glicose, uréia, nitrogênio uréico do sangue, albumina e gama glutamil transferase não foram influenciados pelas dietas experimentais ($P>0,05$).

Tabela 10 – Médias ajustadas e erro padrão da média (EPM) dos metabólitos plasmáticos em função das dietas experimentais

Parâmetros	Dietas experimentais ¹				Médias	EPM	Probabilidades ²		
	C	OS	SC1	SC2			C1	C2	C3
	<i>mg/Dl</i>								
Glicose	65,18	69,50	66,00	68,25	67,23	1,10	0,111	0,188	0,278
Colesterol	175,74	193,40	200,46	218,81	197,10	5,42	0,008	0,140	0,150
C-HDL ³	40,98	46,73	45,36	47,52	45,15	1,26	0,022	0,908	0,452
Uréia	26,71	25,83	27,70	27,38	26,90	0,78	0,738	0,046	0,750
NUS ⁴	12,28	11,88	12,73	12,60	12,37	0,36	0,738	0,046	0,750
	<i>g/L</i>								
Albumina	3,52	3,43	3,26	3,22	3,36	0,06	0,130	0,200	0,820
	<i>U/L</i>								
AST ⁵	54,75	52,00	53,75	52,18	53,17	1,95	0,620	0,830	0,760
GGT ⁶	25,66	26,76	27,53	26,04	26,50	1,84	0,434	0,467	0,658

¹Controle; Oleo de soja Refinado, Sais de cálcio de ácido graxo (Megalac-E) Sais de cálcio de ácido graxo (Lactoplus); ²C1 = controle vs fontes de lipídio; C2 = óleo de soja vs lipídio protegida; C3 = Megalac-E vs Lactoplus; ³C-HDL: Colesterol – lipoproteína de alta densidade; ⁴NUS: Nitrogênio uréico no soro; ⁵AST: aspartato aminotransferase; ⁶GGT: gama glutamil transferase.

Foi observado efeito ($P < 0,05$) para a concentração de colesterol total e colesterol HDL, em que os animais que receberam as dietas com fontes de lipídios apresentaram maiores valores em relação aos animais submetidos à dieta controle. Este aumento da concentração do colesterol total e colesterol-HDL no lipidograma do soro podem ser justificado ao maior consumo de ácidos graxos nas dietas com fontes de lipídios, o que proporcionou aumento das respectivas frações relativas ao metabolismo de lipídios transportados no sangue.

Freitas Júnior et al. (2008) avaliaram as concentrações de colesterol total e HDL, glicose, uréia e nitrogênio uréico no soro e as enzimas hepáticas (AST e GGT) em vacas leiteiras alimentadas com ácidos graxos, e encontraram valores semelhantes aos encontrados no presente estudo. Barletta et al. (2010), trabalhou com sementes de oleaginosas, no níveis de inclusão de 8, 16 e 24% na MS da dieta, observaram aumento nas concentrações de colesterol total e colesterol-HDL.

A concentração de glicose plasmática não foi influenciada pelas dietas experimentais, sendo este resultado semelhante aos estudos de Drackley et al. (1992); Elliott et al. (1993) e Bremmer, Ruppert e Clark (1998), que verificaram concentração semelhante de glicose plasmática em vacas suplementadas com diferentes fontes de lipídio.

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

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

7 CONCLUSÃO

A utilização de 3% ácidos graxos insaturados ω -6 nas dietas experimentais de vacas em lactação alterou o consumo e digestibilidade de matéria seca e nutrientes e o desempenho produtivo.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 7, p. 1598-1630, 2000.
- ANDREWS, S. M.; TYRRELL, H. F.; REYNOLDS, C. K.; ERDMAN, R. A. Net energy for lactation of calcium salts of long-chain fatty acids for cows fed silage based diets. *Journal Dairy Science*, v. 74, p. 2588. 1991.
- BARLETTA, R. V. Grão de soja cru e integral na alimentação de vacas leiteiras. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.
- BATEMAN, H. G.; JENKINS, C. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to non lactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. *Journal of Dairy Science*, v. 81 n. 9, p. 2451-2458, 1998.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Production Science*, v. 70, p. 15-29, 2001.
- BAUMAN, D. E.; LOCK, A. L. Concepts in lipid digestion and metabolism in dairy cows. In: TRI-STATE DAIRY NUTRITION CONFERENCE, 15., 2006, West Lafayette, Cornell University, Proceedings... 2006.14 p.
- BEN SALEM, H.; KRZEMINSKI, R.; FERLAY, A.; DOREAU, M. Effect of lipid supply on in vivo digestion in cows: comparison of hay and corn-silage diets. *Canada Journal Animal Science*, v. 73, p. 547-557, 1993.
- BIGGS, H. G.; COOPER, J. M. An evaluation of four methods of measuring urinary creatinine. *Clinical Chemistry*, v. 7, p. 665-673, 1961.
- BLOCK, S. S.; BUTLER, W. R.; EHRHARDT, R. A.; BELL, A. W.; VAN AMBURGH, M. E.; BOISCLAIR, Y. R. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. *Journal Endocrinology*, v. 171, p. 339-348. 2001.
- BREMMER, D. R.; RUPPERT, L. D.; CLARK, J. H. Effects of chain length and instauration of fatty acid mixtures infused into the abomasum of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 176-188, 1998.
- BU, D. P.; WANG, J. Q.; DHIMAN, T. R.; LIU, S. J.; Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 2, p.998-1007, 2007.
- BUTLER, W. R. Efeito do balanço energético negativo na fertilidade de vacas leiteiras. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 7., 2004, Uberlândia. Anais... Uberlândia. 2004.

CANT, J. P.; PETERS, E. J.; BALDWIN, R. L. Mammary uptake of energy metabolites in dairy cows fed fat and relationship to milk protein depression. *Journal Dairy Science*, v. 76, p. 2254, 1993.

CASALI, A. O.; DETMAN, E.; VALADARES FILHO, S. C.; PEREIRA, J. C.; HENRIQUES, L. T.; FREITAS, S. G.; PAULINO, M. F. 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, n.2, p. 335-342, 2008.

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

CHALUPA, W.; VECCIARELLI, B.; ANDREW, E. E.; KRONFELD, D.S.; SKLAN, D.; PALMQUIST, D.L. Ruminant fermentation "in vitro" of long chain fatty acids. *Journal Dairy Science*, v. 69, n. 5, p. 1293-1303, 1986.

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. *International Feed Research Unit*. Bucksburnd, Aberdeen:Rowett Research Institute, 1992. 21 p.

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

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

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

CHRISTENSEN, R. A.; CAMERON, M. R.; CLARK, J. H.; DRACKLEY, J. K.; LYNCH, J. M.; BARBANO, D. M. Effects of amount of protein and ruminally protected amino acids in the diet of dairy cows fed supplemental fat. *Journal of Dairy Science*, v. 77, p. 1618-1629, 1994.

CLARK, J. H.; KLUSMEYER, T. H.; CAMERON, M. R. Microbial Protein Synthesis and Flows of Nitrogen Fractions to the Duodenum of Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 8, p. 2304-2323, 1992.

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

CÔRTEZ, C.; DA SILVA-KAZAMA, D. C.; KAZAMA, R.; GAGNON, N.; BENCHAAAR, C.; SANTOS, G. T. D.; ZEOULA, L. M.; PETIT, H. V. Milk composition, milk fatty acid

profile, digestion, and ruminal fermentation in dairy cows fed whole flaxseed and calcium salts of flaxseed oil. *Journal of Dairy Science*, v. 93, p. 3146–3157, 2010.

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

DOREAU, M.; FERLAY, A. Effect of dietary lipids on nitrogen metabolism in the lumen: a review. *Livestock Production Science*, v. 43, p. 97-110, 1995.

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

DOREAU, M.; LEGAY, F.; BAUCHART, D. Effect of source and level of supplemental fat on total and ruminal organic matter and nitrogen digestion in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 2233-2242, 1991.

DRACKLEY, J. K.; ELLIOTT, J. P. Milk composition, ruminal characteristics, and nutrient utilization in dairy cows fed partially hydrogenated tallow. *Journal Dairy Science*, v. 76, p. 183-196, 1992.

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

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

EIFERT, E. C.; LANA, R. P.; LEÃO, M. I.; ARCURI, P. B.; VALADARES FILHO, S. C.; LEOPOLDINO, W. M.; OLIVEIRA, J. S.; SAMPAIO, C. B. Efeito da combinação de óleo de soja e de monensina na dieta sobre o consumo e digestão em vacas lactantes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, n. 1, p. 297-308, 2005.

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

ELLIOTT, J. P.; DRACKLEY, J. K.; WEIGEL, D. J. Digestibility and Effects of Hydrogenated Palm Fatty Acid Distillate in Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v. 79, n. 6, p. 1031-1039, 1996.

ELLIOTT, J. P.; DRACKLEY, J. K.; FAHEY JR., G. C.; SHANKS, R.D. Utilization of supplemental fat by dairy cows fed diets varying in content of nonstructural carbohydrates. *Journal Dairy Science*, v. 78, p. 1512-1525, 1995.

FALDET, M. A.; SATTER, L. D. Feeding heat-treated full fat soybeans to cows in early lactation. *Journal Dairy Science*, v. 74, n. 8 p. 3047-54, 1991.

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

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

FIRKINS, J. L.; HRISTOV, A. N.; HALL, M. B.; VARGA, G. A.; ST-PIERRE, N. R. Integration of Ruminant Metabolism in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 89, p. E31-E51, 2006. Supplement, E.

FREITAS JUNIOR, J. E. Utilização de fontes de gordura em rações de vacas leiteiras. 2008. 95 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

FREITAS JÚNIOR, J. E.; RENNÓ, F. P.; SILVA, L. F. P.; GANDRA, J. R.; MATURANA FILHO, M.; FODITSCH, C.; VENTURILLI, B. C. Parâmetros sanguíneos de vacas leiteiras suplementadas com diferentes fontes de gordura. *Ciência Rural*, v. 40, n. 4, p. 950-956, *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, n. 4, p. 1376-1380, 2010.

FREITAS JUNIOR, J. E. Fontes de gordura na dieta de vacas em lactação. 2012. 141 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2012.

GAGLIOSTRO, G. A.; CHILLIARD, Y. Revisión bibliográfica. Utilización de lípidos protegidos en nutrición de vacas lecheras. I. Efecto sobre la producción y la composición de la leche y sobre la ingestión de materia seca y energía.. *Revista Argentina de Producción Animal*, v. 12, n. 1, p. 1-15, 1992.

GANDRA, J. R. Fontes de ácidos graxos ω 3 e ω 6 em dietas de vacas leiteiras no período de transição e início de lactação. 2012. 170 p. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

GARNSWORTHY, P. C. Fats in dairy cow diets. In: GARNSWORTHY, P. C.; WISEMAN, J. (Ed.). *In á recent advances in animal nutrition.* , Nottingham: Nottingham University Press, , 1997. p. 87-104.

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

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

GOODLING, L. E.; GRUMMER, R. R. Effects of post-ruminal protein on fatty acid digestibility in dairy cows. *Journal. Dairy Science*, v. 81, p. 1624-1629, 1998.

GRUMMER, R. R.; MASHEK, D. G.; HAYIRLI, A. H. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal. Practice*, v. 20, p. 447-470, 2004.

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

HALL, M. B. Making nutritional sense of nonstructural carbohydrate. In: ANNUAL FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 9., 1998, Gainesville, FL. Proceedings... Gainesville: Florida University Press, 1998. p. 108-121.

HARRISON, J. H.; KINCAID, R. L.; MCNAMARA, J. P. Effect os fat from whole cottonseeds and calcium salts of long chain fatty acids on performance of lactating dairy cows. *Journal Dairy Science*, v. 78, n. 1, p. 181-193, 1995.

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

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

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

HUANG, Y.; SCHOONMAKER, J. P.; BRADFORD, B. J.; BEITZ, D. C. Response of Milk Fatty Acid Composition to Dietary Supplementation of Soy Oil, Conjugated Linoleic Acid, or Both. *Journal of Dairy Science*, v. 91, n. 1, p. 260-270, 2008.

JENKINS, T. C. Butylsoyamide protects soybean oil from ruminal biohydrogenation: effects of butylsoyamide on plasma fatty acids and nutrient digestion in sheep. *Journal Animal Science*, v. 73, p. 818-823, 1995.

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

KARNATI, S. K. R.; SYLVESTER, J. T.; RIBEIRO, C. V. D. M.; GILIGAN, L. E.; FIRKINS, J.L. Investigating unsaturated fat, monensin, or bromoethanesulfonate in continuous cultures ruminal protozoa. I. Fermentation, biohydrogenation, and microbial protein synthesis. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 8, p. 3849-3860 2009.

KIN, Y.K.; SCHINCOETHE, D.J.; CASPER, D.P.; LUDENS, F. C. Supplemental dietary fat from extruded soybeans and calcium soaps of fatty acids for lactating dairy cows. *Journal Dairy Science*, V. 76, n. 1, p. 197-204, 1993.

KLUSMEYER, T. H.; LYNCH, G. L.; CLARK, J. H.; NELSON, D. R. Effects of calcium salts of fatty acids and proportion of forage in diet on ruminal fermentation and nutrient flow to duodenum of cows. *Journal Dairy Science*, v. 74, p. 2220-2232, 1991b.

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

KOZLOSKI, G. V. *Bioquímica dos ruminantes*. 3. ed. Santa Maria: Ed. Da UFMS, 2011.

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

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

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

LUNDY, F. P.; BLOCK, E.; BRIDGES JÚNIOR, W. C.; BERTRAND, J. A.; JENKINS, T. C. Ruminal Biohydrogenation in Holstein Cows Fed Soybean Fatty Acids as Amides or Calcium Salts. *Journal of Dairy Science*, v. 87, n. 4, p. 1038-1046, 2004.

MAIGA, H. A.; SCHINGOETHE, D. J. Optimizing the utilization os animal fat and ruminal bypass proteins in the diets of lactating dairy cows. *Journal Dairy Science*, v. 808, n. 2, p. 343-352, 1997.

MALAFAIA, P. A. M.; VALADARES FILHO, S. C.; COELHO DA SILVA, J. F.; LEÃO, M. I.; PEREIRA, J. C.; VIEIRA, R. A. M.; MATOS, F. N. Sebo bovino em rações para vacas em lactação. 1. Consumo dos nutrientes, produção e composição do leite. *R evista Brasileira Zootecnia*, v. 25, n. 1, p. 153-163, 1996.

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

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

NAVES, A. B. Utilização de grão de soja integral e processado em rações de vacas em lactação., 2010. 73 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, SP, 2010.

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

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

NÖRNBERG, J. L.; LÓPEZ, J.; STUMPF JÚNIOR, W.; COSTA, B. P.; SCHAFHAÜSER JÚNIOR, J. Desempenho de vacas Jersey suplementadas com diferentes fontes lipídicas na fase inicial da lactação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n. 4, p. 1431-1438, 2006.

NÖRNBERG, J. L.; STUMPF JR., W.; LÓPEZ, J.; COSTA, P. B. Valor do farelo de arroz integral como fonte de gordura na dieta de vacas Jersey na fase inicial da lactação: digestibilidade aparente de nutrientes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n. 6, p. 2412-2421, 2004.

NRC. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7. ed. Washinton, D.C.: National Academic Press, 2001. 381 p.

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

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

ONETTI, S. G.; SHAVER, R. D.; MCGUIRE, M. A.; GRUMMER, R. R. Effect of type and level of dietary fat on rumen fermentation and performance of dairy cows fed corn silage based diets. *Journal of Dairy Science*, v. 84, p. 2751-2759 2001.

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

PALMQUIST, D. L. Suplementação de lipídios para vacas em lactação. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 6., 1989, Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ, 1989. p. 11-25.

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

PALMQUIST, D. L. The role of dietary fats in efficiency of ruminants. *Journal Nutrition*, v. 124, p. 1377S, 1994.

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

PALMQUIST, D. L. Influence of source and amount of dietary fat on digestibility in lactating cows. *Journal Dairy Science*, v. 74, n. 4, p. 1354-1360, 1991.

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

PEIXOTO, F. A. M.; COELHO DA SILVA, J. F.; ROSADO, M.; VALADARES FILHO, S. C.; CASTRO, A. C. G. Complexo ácido graxo-cálcio na dieta de vacas em lactação alimentadas com silagem de milho, individualmente ou em grupo. *Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia*, v. 23, n. 5, p. 763-772, 1994.

PINTO, S. M. Produção e composição química do leite de vacas holandesas no início da lactação alimentadas com diferentes fontes de lipídeos. 1997. 74 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 1997.

RABIEE, A. R.; BREINHILD, K.; SCOTT, W.; GOLDBERGER, 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, n. 6, p. 3325-3247, 2012.

RELLING, A. E.; REYNOLDS, C. K. Feeding rumen-inert fats differing in their degree of saturation decreases intake and increases plasma concentrations of gut peptides in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 3, p. 1506-1515, 2007.

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

RICHARDSON, L. F.; RAUN, A. P.; POTTER, E. L.; COOLEY, C. O.; RATHMACHER, R. P. Effect of monensin on ruminal fermentation in vitro. *Journal of Animal Science*, v. 43, p. 657-664, 1976.

SANTOS, A. D. F. C.; TORRES, A. A.; RENNÓ, F. P.; DRUMOND, M. R. S.; FREITAS JÚNIOR, J. E. Utilização de óleo de soja em rações para vacas leiteiras no período de transição: consumo, produção e composição do leite. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 38, n. 7, p. 1363-1371, 2009.

SANTOS, F. L.; SILVA, M. T. C.; LANA, R. P.; BRANDÃO, S. C. C.; VARGAS, L. H.; ABREU, L. R. Efeito da Suplementação de Lipídios na Ração sobre a Produção de Ácido Linoléico Conjugado (CLA) e a Composição da Gordura do Leite de Vacas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 30, n. 6, p. 1931-1938, 2001b.

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

SAS. INSTITUTE, INC. System user's guide online. Versão 9.2. Cary: NC, 2010.

SCHAUFF, D. J.; CLARK, J. H. Effects of Feeding Diets Containing Calcium Salts of Long-Chain Fatty Acids to lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, v. 75, n. 11, p. 2990-3002, 1992.

SCOTT, T.A.; SHAVER, R.D.; ZEPEDA, L.; YANDELL, B.; SMITH, T.R. Effects of rumen inert fat on lactation, reproduction, and health of high producing Holstein herds. *Journal of*

Dairy Science, v. 78, n. 11, p. 2435- 2451, 1995.

SILVA, C. M. A. P. Produção e composição do leite, variação de peso corporal e digestibilidade em vacas alimentadas com ração contendo grão de soja moída no concentrado. 1997. 72 p. Tese (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1997.

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

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

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

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

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

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

VAN SOEST, P. J.; MASON, V. C. The influence of maillard reaction upon the nutritive value of fibrous feeds. Animal Feed Science and Technology, v. 32, n. 1, p. 45-53, 1991.

VARGAS, L. H.; LANA, R. P.; JHAM, G. N.; SANTOS, F. L.; QUEIROZ, A. C.; MANCIO, A. B. Adição de lipídios na ração de vacas leiteiras: parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do leite. Revista Brasileira Zootecnia, v. 31, n. 1, p. 522-529, 2002.

VASCONCELOS, A. M.; LEÃO, M. I.; VALADARES FILHO, S. C.; VALADARES, R. F. D.; DIAS, M.; MORAIS, D. A. E. F. Parâmetros ruminais, balanço de compostos nitrogenados e produção microbiana de vacas leiteiras alimentadas com soja e seus subprodutos. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 39, n. 2, p. 425-433, 2010.

VENTURELLI, B. C. Grão de soja cru e integral na alimentação de vacas leiteiras no terço final de lactação. 2011. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

WANG, Y. M.; WANG, J.H.; WANG, C.; CHEN, B.; LIU, J. X.; CAO, H.; GUO, F. C.; VAZQUEZ-AÑÓN, M. Effect of different rumen-inert fatty acids supplemented with a dietary antioxidant on performance and antioxidative status of early-lactation cows. Journal of Dairy Science, v. 93, n. 8, p. 3738-3745, 2010.

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

WEISS, W. P. Estimating the available energy content of feeds for dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 81, p. 830-839, 1998.

WEISS, W. P.; PINOS-RODRIGUEZ, J. M.; WYATT D. J. The value of different fat supplements as sources of digestible energy for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 94, n. 2. P. 931-939, 2011.

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

WEST, J. W.; HILL, G. M. Effect of a protected fat product on productivity of lactating Holstein and Jersey cows. *Journal. Dairy Science*, v. 73, p. 3200, 1990.

WU, Z.; HUBER, J. T.; CHAN, S. C.; SIMAS, J. M.; CHEN, K. H.; VARELA, J. G.; SANTOS, C.; FONTES JR.; C.; YU, P. Effect of source and amount of supplemental fat on lactation and digestion in cows. *Journal of Dairy Science*, v. 77, p. 1644-1651, 1994.

WU, Z.; OHAJURUKA, O. A.; PALMQUIST, D. L. Ruminant synthesis, biohydrogenation, and digestibility of fatty acids by dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 74, p. 3025-3034, 1991.

WU, Z.; HUBER, J.T. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: a review. *Livestock Production Science*, v. 39, n. 2, p. 141-155. 1994.