

MARCONE GERALDO COSTA

**RAÇÕES COM DIFERENTES FONTES DE GORDURA
PARA VACAS EM LACTAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2008**

MARCONE GERALDO COSTA

**RAÇÕES COM DIFERENTES FONTES DE GORDURA PARA VACAS EM
LACTAÇÃO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*

APROVADA : 25 de fevereiro de 2008

Prof. Augusto César de Queiroz
(Co-Orientador)

Prof. Marcelo Teixeira Rodrigues
(Co-Orientador)

Prof. Francisco Palma Rennó

Prof. Alecssandro Regal Dutra

Prof. José Carlos Pereira
(Orientador)

A Deus.

Aos meus avós Natalino (*in memoriam*) e Maria da Luz, Francisco (*in memoriam*) e Maria da Conceição, pela minha família.

Aos meus pais, Vítor e Lia, por serem meu referencial de vida.

Às minhas irmãs Márcia e Mariana, pelo incentivo, amor e força.

À pessoa iluminada e de tantos nomes Aninha, Gabi, Gabous, Ga, Gabrita, Gabriela, que apesar do pouco tempo de convívio, deu novo sentido a minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica – CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias da UFV, pelo apoio.

À Universidade Católica de Goiás pela disponibilidade de laboratórios e funcionários e estagiários.

Ao professor José Carlos Pereira, pelo exemplo de profissional, pela orientação e sobretudo amizade.

Aos professores conselheiros Augusto César de Queiroz e Marcelo Teixeira Rodrigues pelos valiosos ensinamentos, pelo incentivo e confiança.

Aos membros da Banca Examinadora, Professor Alecssandro Regal Dutra e Professor Francisco Palma Rennó, pela atenção dispensada e críticas apresentadas.

Aos professores Rogério de Paula Lana, Giovanni Ribeiro, Aloízio Soares Ferreira, Maria Ignez Leão, Sebastião de Campos Valadares Filho, Mario Fonseca Paulino e Paulo César (UCG) pela inestimável contribuição e amizade.

Ao professor e amigo José Francisco da Silva (Juquinha), pela contribuição na minha formação e exemplo de profissionalismo.

Ao proprietário da Fazenda Estância dos Buritis Sr. Fábio Rassi por disponibilizar sua propriedade, funcionários e animais para realização deste trabalho.

A Lucas Rassi pelo inestimável apoio durante a realização do experimento.

Aos funcionários da Fazenda Estância dos Buritis: Sirley, Marinalva, Jesus, Reginaldo, Joaquim, Gelson, Zé Biá, Cleiton, Alexandre e outros que tanto ajudaram e principalmente amizade.

Aos amiguinhos da Fazenda Estância dos Buritis: Ana Paula, Lucas, Gabriel e Marcos Renan.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia da Universidade Católica de Goiás Sr. Zé e Nilva pelo apoio.

A todos os funcionários do Setor de Bovinocultura de Leite, em especial ao Joécio, Zé Antônio, Gaguinho, Zinho e Joãozinho, pela dedicação e ajuda imprescindível.

Aos funcionários da Fábrica de Ração, em especial Mauro, pela colaboração e amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Nutrição Animal, Fernando, Mário, Monteiro, Valdir, Vera e Wellington, pelo apoio e colaboração.

Ao funcionário do Departamento de Química Eduardo pelo apoio.

Aos funcionários do Departamento de Zootecnia, em especial Celeste, pela atenção.

Em especial ao estagiário “pau para toda obra” Fernando, vulgo Beiramar pela ajuda incondicional e principalmente pela construção de uma grande amizade.

Aos estagiários da UFV Gustavo, Leandro, Vítor, Mônica, Daniel Condé, Arthur, Andreza, Dayana e Wenderson.

Aos grandes amigos e irmãos Adhemar, Fernando (Rufião), Marinaldo e Sandro.

Aos amigos de Goiânia Paulo Freire, Adriana e Franscélia

Aos meus amigos Acyr, Adhemar, Adriano (Foquinha), Alberto (Betão), Alexandre (Tatu), André (Deré), André (Andrezão), Claudilene, Dalton, Daniel, Dorismar, Douglas (Mane Putêncio), Emerson, Fernanda, Francine, Idelmar (Zé Lelé), Janaína, José Antônio, José Augusto, Josué, Letícia, Marcelo, Marcinho, Roberta, Shirley, Sthifanie, Tatiana e Thiago (Taboca) pelo convívio, força e carinho.

Aos amigos e colegas de república Cássio, Cléber e Wender (Goiano).

Aos colegas Alexandre, Aloísio, Anderson, Anselmo, André, Cláudio Vítor, Claudson, Carla, Cazé, Charles, Dalton, Daniel, Edson Mauro, Eduardo, Fernando, Flávio, Francisco, Juliana, Leidimara, Lourdes, Mário,

Marli, Melo, Mônica, Pedro, Rafael, Renata, Rodrigo, Severino, Silas, Silvano, Tiago pelo companheirismo

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

MARCONE GERALDO COSTA, filho de Vítor Édis Costa e Maria José Costa, nasceu em Diamantina-MG, em 5 de junho de 1975.

Em março de 1995, iniciou na Universidade Federal de Viçosa o Curso de Graduação em Zootecnia, concluindo-o em janeiro de 2000.

Em março de 2000, iniciou o trabalho como extensionista pelo Projeto EDUCAMPO/SEBRAE-MG a produtores de leite, permanecendo até fevereiro de 2002.

Em março de 2002, ingressou no Curso de Mestrado em Zootecnia, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), concentrando seus estudos na área de Nutrição de Ruminantes, submetendo-se à defesa de dissertação no dia 18 de fevereiro de 2004, em Viçosa, MG.

Em março de 2004 ingressou no curso de doutorado em Zootecnia na mesma instituição, concentrando seus estudos na área de Nutrição de Ruminantes, submetendo-se à defesa de tese em fevereiro de 2008.

Momentos felizes, louve a Deus
Momentos difíceis, recorra a Deus
Momentos silenciosos, adore a Deus
Momentos dolorosos, confie em Deus
Cada momento, agradeça a Deus

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS	X
LISTA DE TABELAS	XI
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVIII
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
Capítulo 1 – Desempenho produtivo e cinética de nutrientes de vacas recebendo dietas contendo diferentes fontes lipídicas	33
1.1 Introdução	33
1.2 Material e Métodos	35
1.3 Resultados e Discussão.....	45
1.4 Conclusões	57
1.5 Referências Bibliográficas	58
Capítulo 2 - Perfil de ácidos graxos e ácido linoléico conjugado na gordura do leite de vacas recebendo rações com diferentes fontes lipídicas	63
2.1 Introdução	63
2.2 Material e Métodos.....	65
2.3 Resultados e Discussão	70
2.4 Conclusões.....	76
2.5 Referências Bibliográficas	77
Capítulo 3 – Parâmetros sanguíneos, estimativa de síntese microbiana e balanço de nitrogênio de vacas leiteiras recebendo dietas com diferentes fontes de gordura	79
3.1 Introdução	79

3.2 Material e Métodos	82
3.3 Resultados e Discussão	86
3.4 Conclusões	94
3.5 Referências Bibliográficas	95
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
Apêndices	99
Apêndice A	100
Apêndice B	111
Apêndice C	115

LISTA DE ABREVIATURAS

AGCC - Ácidos Graxos de Cadeia Curta
AGCM - Ácidos Graxos de Cadeia Média
AGCL - Ácidos Graxos de Cadeia Longa
AGI - Ácidos Graxos Insaturados
AGS - Ácidos Graxos Saturados
AGMI - Ácidos Graxos Monoinsaturados
AGPI - Ácidos Graxos Poliinsaturados
AGV - Ácidos Graxos Voláteis
AGNE - Ácidos Graxos não Esterificados
ATV – Ácido *trans* vaccênico
CLA – Ácido Linoleico Conjugado
CMS - Consumo de Matéria Seca
FDN - Fibra em Detergente Neutro
FDNc - Fibra em Detergente Neutro corrigido para cinzas
FDN cp - Fibra em Detergente Neutro corrigido para cinzas e proteína
FDA - Fibra em Detergente Ácido
GS - Grão de Soja
GSF - Grão de Soja moído tratado com Formaldeído
EE - Extrato Etéreo
LIG – Lignina
MS - Matéria Seca
MM - Matéria Mineral
NIDA - Nitrogênio Insolúvel em Detergente Ácido
NIDN – Nitrogênio Insolúvel em Detergente Neutro
OS - Óleo de Soja
SCAGCL – Sabão de Cálcio de Ácido Graxo de Cadeia Longa

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

1	Composição bromatológica dos ingredientes e suplementos (%MS)	36
2	Composição dos concentrados experimentais (%MS)	37
3	Composição bromatológica dos concentrados utilizados	37
4	Composição da dieta (%MS)	38
5	Composição bromatológica das dietas experimentais	38
6	Consumos médios diários de matéria seca e nutrientes obtidos para as dietas experimentais	46
7	Coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes obtidas para as dietas experimentais	50
8	Produção diária de leite (PL), produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLC) e componentes do leite obtidas para as dietas experimentais	53
9	Dinâmica de passagem de partículas obtidas para as dietas experimentais	55
10	Parâmetros de degradação da FDN dos alimentos utilizados no estudo	56

CAPÍTULO 2

1	Composição média de ácidos graxos das fontes lipídicas utilizadas nas dietas experimentais (g/100g)	69
2	Perfil de ácidos graxos do leite, separados por tamanho da cadeia e número de ligações, obtidas para as dietas experimentais	70
3	Perfil de ácidos graxos do leite obtidos para as dietas experimentais (g/100g)	74

CAPÍTULO 3

1	Consumos, excreções médias diárias e balanço dos compostos nitrogenados obtidos para as dietas experimentais	86
2	Concentrações médias de uréia sérica (US), N-uréia sérica (NUS), uréia no leite (UL), N-uréia no leite (NUL) e relação NUL/NUS obtidas para as dietas experimentais	89
3	Médias diárias das excreções de alantoína na urina (ALAU) e no leite (ALAL), ácido úrico na urina (AU), purina totais (PT), purinas absorvida (PA), e compostos nitrogenados microbianos (Nmic) obtidas para as dietas experimentais	90
4	Concentrações médias de glicose (GLI), colesterol total (CT), triacilglicerídeos (TAG), e os valores de colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), obtidos para as dietas experimentais	92

APÊNDICE A

1A	Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores referentes ao consumo de matéria seca, em kg/dia (CMS), CMS em relação ao peso vivo, em % (CMS _{PV}) e ao peso metabólico (CMS _{PM}), consumo de fibra em detergente neutro (CFDN) e de FDN em relação ao peso vivo (CFDN _{PV}) e ao peso metabólico (CFDN _{PM})	100
2A	Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores referentes aos consumos de proteína bruta (CPB), extrato etéreo (CEE), carboidratos totais (CHOT), carboidratos não fibrosos (CCNF), matéria mineral (CMM), matéria orgânica (CMO) e de nutrientes digestíveis totais (CNDT)	101
3A	Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores referentes aos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria orgânica (CDMO), da proteína bruta (CDPB), extrato etéreo (CDEE), fibra em detergente neutro (CDFDN), matéria seca (CDMS), carboidratos totais (CDCHO) e dos carboidratos não fibrosos (CDCNF)	102
4A	Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores de produção de leite (PL), produção de leite corrigida para gordura (PLC), gordura do leite (GO), proteína do leite (PB), lactose do leite (LC), e sólidos totais (SO)	103
1A	Modelo utilizado para estimativa dos parâmetros taxa de passagem (K _p) e o tempo médio de retenção no rumén-retículo (TMRR) para partículas de volumoso.	104
2A	Modelo utilizado para estimativa dos parâmetros taxa de passagem (K _p) e o tempo médio de retenção no rumén-retículo (TMRR) para partículas do farelo de soja.....	105

APÊNDICE B

1B	Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácidos graxos de cadeia média (AGCM), ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos insaturados (AGI), ácidos graxos de cadeia ímpar (AGCI), ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), ácidos graxos poliinsaturados (AGPI).....	111
----	---	-----

2B	Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores referentes, em percentual dos ácidos graxos capríco (C _{6:0}), caprílico (C _{8:0}), cáprico (C _{10:0}), láurico (C _{12:0}), tridecanóico (C _{13:0}), mirístico (C _{14:0}), miristoléico (C _{14:1}) e pentadecanóico (C _{15:0})	112
3B	Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores referentes, em percentual dos ácidos graxos palmítico (C _{16:0}), palmitoléico (C _{16:1}), heptadecanóico (C _{17:0}), heptadecanoléico (C _{17:1}), esteárico (C _{18:0}), oléico (C _{18:1}); linoléico (C _{18:2}), ácido linoléico conjugado (CLA) e outros não identificados (OUT)	113

APÊNDICE C

1C	Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores em g/dia de nitrogênio ingerido (ING), nitrogênio excretado nas fezes (NFE), urina (NUR) e leite (NLE), balanço de nitrogênio (BAL), nitrogênio endógeno basal (NEB) e nitrogênio retido (Nret)	115
2C	Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores em mg/dL de uréia sérica (US), N-uréia sérica (NUS), uréia no leite (UL), N-uréia no leite (NUL) e relação NUL/NUS	116
3C	Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores em mg/dL para glicose (GLI), colesterol total (CT), valores de colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL), triacilglicerídeos (TAG), colesterol ligado à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL)	117
4C	Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores em mmol/dia, das excreções de alantóina na urina (ALUR) e no leite (ALAL), ácido úrico na urina (AU), purina totais (PT), purinas absorvidas (PA), compostos nitrogenados microbianos (Nmic em g/dia) e eficiência de síntese microbiana (PBmic – g/100gNDT)	118

RESUMO

COSTA, Marcone Geraldo D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2008. **Rações com diferentes fontes de gordura para vacas em lactação** Orientador: José Carlos Pereira. Co-orientadores: Augusto César de Queiroz e Marcelo Teixeira Rodrigues.

O experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito da suplementação da dieta com fontes lipídicas apresentadas de diferentes formas (livre ou parcialmente protegida) sobre o desempenho produtivo, consumo e dinâmica de nutrientes, perfil de ácidos graxos e conteúdo de ácido linoléico conjugado (CLA) no leite, parâmetros sanguíneos e estimativos de síntese microbiana. Foram utilizadas 10 vacas da raça Holandesa, distribuídas em dois quadrados latinos 5 x 5 balanceados. As dietas experimentais foram constituídas de controle sem fonte adicional de lipídeo, dieta com adição de sabão de cálcio, dieta contendo óleo de soja, dieta contendo grão de soja crua moída e dieta contendo grão de soja crua moída tratada com formaldeído. O consumo de matéria seca (CMS) e o de matéria orgânica (CMO) foi menor nas dietas suplementadas com fontes lipídicas em relação controle, independente da forma de proteção da gordura, enquanto que maiores consumos de extrato etéreo (CEE) foram

observados nas dietas com fontes adicionais de lipídeos. Menor consumo de fibra em detergente neutro (CFDN) foi observado na dieta contendo sabão de cálcio. A dieta com óleo de soja apresentou os menores valores de digestibilidade aparente para matéria seca (DAMS), matéria orgânica (DAMO), carboidratos totais (DACT) e fibra em detergente neutro (DAFDN). A digestibilidade aparente da proteína foi menor na dieta com grão de soja tratado com formaldeído. A produção de leite não foi influenciada pela adição ou forma de apresentação de lipídeos em nenhuma das dietas, porém maior depressão de gordura do leite foi observado quando sabão de cálcio foi adicionada à dieta, enquanto que o menor valor de proteína do leite foi observado na dieta contendo soja grão tratada com formaldeído. Menores taxas de passagem de partículas do volumoso e do farelo de soja foram observadas quando foi utilizado óleo de soja na dieta. A degradabilidade da FDN foi menor após o tratamento do grão de soja com formaldeído. As fontes lipídicas (livres ou parcialmente protegidas) foram efetivas em promover a redução de ácidos graxos de cadeia curta e média e dos ácidos graxos saturados e aumentar os ácidos graxos de cadeia longa e insaturados no leite. Os valores de CLA foram semelhantes entre as dietas com fontes de gordura, independente da fonte e maiores de que a dieta controle. Os valores de balanço de nitrogênio foram positivos, porém os menores valores foram da dieta com grão de soja, seguido de óleo de soja. Maiores excreções de nitrogênio (N) nas fezes e maior retenção de N expressa pela menor excreção de N na urina e leite foi observado na dieta com grão de soja tratada com formaldeído. As concentrações de uréia no soro e no leite foram menores quando foi utilizado grão de soja tratado com formaldeído na dieta, indicando a influência da complexação no metabolismo da proteína no rúmen e pós-rúmen. Maior excreção de alantoína e estimativa de nitrogênio microbiano foi observado na dieta controle, entretanto a eficiência de síntese microbiana foi semelhante entre as dietas com exceção do dieta envolvendo sabão de cálcio que resultou em menor eficiência de síntese microbiana. Não houve diferença entre as dietas com relação aos níveis de glicose, estimativa de lipoproteínas de muito baixa densidade e lipoproteína de alta densidade e de triacilglicerídeos no sangue. Os níveis de colesterol total e os níveis estimados de lipoproteína de baixa densidade

foram maiores nas dietas com suplementos lipídicos em relação ao controle. Gordura suplementada livre ou parcialmente protegida de diferentes formas, no nível utilizado no presente experimento, para vacas no meio da lactação são efetivas em promover mudanças no perfil de ácidos graxos do leite, sem afetar a produção de leite, porém os componentes do leite, em especial a gordura são afetados.

ABSTRACT

COSTA, Marcone Geraldo D.Sc. Universidade Federal de Viçosa, February de 2008. **Rations with different sources of fat for lactating dairy cows.** Adviser: José Carlos Pereira. Co-advisers: Augusto César de Queiroz and Marcelo Teixeira Rodrigues.

The experiment was conducted to evaluate the effect of the dietary supplementation with lipid sources in different forms of offering (free or partially protected) on the productive performance, intake and dynamics of nutrients, fatty acids profile and content of conjugated linoleic acid (CLA) in milk, blood parameters and estimation of microbial synthesis. Ten Holstein cows were distributed in two 5 x 5 Balanced Latin Squares. The experimental diets were composed of control, without additional fat source, and diets with addition of calcium salts, soybean oil, ground whole soybean seed, ground whole soybean seed treated with formaldehyde. Intakes of dry matter (DMI) and organic matter (OMI) was lower in the diets supplemented with lipid sources as related to control, regardless of offering forms, while higher ether extract intake (EEI) were observed in the diets with additional lipids sources.

Lower neutral detergent fiber intake (NDFI) was observed in diet with calcium salts. Diet with soybean oil produced the lowest values of apparent digestibilities for dry matter (ADDM), organic matter (ADOM), total carbohydrates (ADTC) and digestibility of neutral detergent fiber (DNDF). Apparent digestibility of protein was lower in diet with ground whole soybean seed treated with formaldehyde. Milk production was not influenced by addition or offering forms of lipids in any of the diets, but higher depression of milk fat was observed when calcium salts was added to diet, while the lowest amount of milk protein was observed in diet containing ground whole soybean seed treated with formaldehyde. Lower passage rates of particles of forage and soybean meal were observed when soybean oil was used in the diet. The degradability of the NDF was lower in the diet with ground whole soybean treated with formaldehyde. Lipids sources (free or partially protected) were effective in promoting reduction of short- and medium chain fatty acid and saturated fatty acids and increase the long chain fatty acids and unsaturated in milk. Values of CLA were similar among diets with lipid sources; regardless of the source and higher than control diet. Values of nitrogen balance were positive, however lowest values were for diet with grain, soybean, followed by soybean oil. Higher nitrogen(N) excretions in feces and greater N retention expressed by the lower excretion N in urine and milk was observed in diet with ground whole soybean seed treated with formaldehyde. The concentration of urea in serum and milk were lower when ground whole soybean seed treated with formaldehyde was used in the diet, indicating the influence of complexation in the metabolism of protein in the rumen and post-rumen. Higher allantoin excretion and microbial nitrogen estimation was observed in the control diet, however the efficiency of microbial synthesis was similar among diets, except for diets with calcium salts diet that resulted in lower efficiency of microbial synthesis. There was no difference among diets with respect to levels of glucose, very low density lipoprotein and high-density lipoprotein and triacylglycerides estimates in blood. Total cholesterol levels and estimated levels of low-density lipoprotein were higher in the diet with lipid sources as related to control diet. Supplementation of lipids, free or partially protected, in different forms, in the level used in this experiment, for cows in the middle of lactation, are effective

in promoting changes in the fatty acids profile from milk, without affecting the production of milk, however milk components, particularly milk fat are affected.

1 - Introdução Geral

A cadeia produtiva do leite no Brasil vem apresentando aumentos significativos de produção e produtividade, levando a um cenário ainda não conhecido no país, que é o de exportador de leite. Maior expansão na exportação de lácteos está condicionada não só aos excedentes de produção, mas principalmente à qualidade da matéria prima que está sendo exportada. Nesse sentido, a exigência do mercado internacional por uma matéria prima com padrão de qualidade é cada vez maior, envolvendo aspectos de composição em nutrientes, no qual um valor mínimo para os componentes do leite é exigido, além da qualidade microbiológica e ausência de resíduos diversos, como antibióticos, pesticidas e outros.

Da mesma forma, cresce cada vez mais a exigência de consumidores por alimentos de qualidade e que possam de alguma forma contribuir na prevenção de qualquer tipo de distúrbio, por possuírem funções nutritivas e terapêuticas, sendo denominados nutracêuticos.

Durante o século XX, vários estudos apontaram que alimentos ricos em gordura saturada, como as gorduras de origem animal e dentre estas a gordura do leite, estariam relacionados a um grande número de desordens metabólicas dentre elas o câncer, diabetes, hipertensão arterial e em

especial doenças cardiovasculares. Entretanto, com o desenvolvimento de equipamentos e técnicas laboratoriais mais apuradas e os recentes avanços alcançados pela medicina sugerem que apesar de serem considerados ricos em gordura saturada, os alimentos de origem animal, podem trazer benefícios para a saúde dos consumidores. Esse fato cresceu de importância a partir do momento que foi descoberto que ácidos graxos insaturados, em especial um ácido graxo insaturado conjugado e seus isômeros, denominado ácido linoléico conjugado (CLA), previne o desenvolvimento das doenças acima citadas.

O CLA é naturalmente encontrado nos ácidos graxos de produtos originados de ruminantes como carne, leite e derivados, sendo um intermediário natural durante o processo de biohidrogenação microbiana no rúmen dos lipídeos insaturados da dieta, onde, sob condições dietéticas normais, o ácido esteárico (C_{18:0}) é o principal produto. Entretanto, em algumas condições, a biohidrogenação pode não ser completa, propiciando o aumento do fluxo da ácidos graxos insaturados para os intestinos e da sua concentração no leite, tornando-o, juntamente com seus derivados a maior fonte de CLA na dieta humana.

Atualmente o foco dos pesquisadores tem sido no sentido de elevar os níveis desses ácidos graxos na gordura de produtos de origem animal, sobretudo a do leite e comprovar de fato os efeitos benéficos do CLA sobre a saúde dos humanos e entender os mecanismos envolvidos.

Vários são os fatores que podem influenciar na composição da gordura do leite, alguns são inerentes ao animal, envolvendo aspectos genéticos e fisiológicos, e outros relacionados ao meio, ou fatores ambientais. O componente gordura pode sofrer variação em sua composição de 1 a 2 unidades percentuais, dependendo da natureza da interferência. Fatores ligados ao animal têm pouca influência quando se deseja promover mudanças na composição da gordura do leite, enquanto que fatores de meio, principalmente a nutrição podem promover respostas rápidas em termos de mudança na composição.

Em condições normais, a dieta dos ruminantes possui pequena porcentagem de lipídeos, os quais se apresentam na forma esterificada. Quanto à predominância de ácidos graxos em particular, as forrageiras

contém maior proporção de ácido linolênico, e nos grãos, predomina o ácido linoléico. Em ruminantes, devido à fermentação pré-gástrica, os ácidos graxos provenientes da dieta podem sofrer alterações através de biohidrogenação. A ação microbiana nos compartimentos fermentativos modifica a natureza dos lipídeos da dieta, transformando ácidos graxos insaturados em saturados (ácido esteárico), de modo que a composição em ácidos graxos da gordura dos produtos finais (leite e carne) é diferente dos ácidos graxos provenientes da dieta.

Entretanto, a manipulação dietética com o objetivo de elevar ácidos graxos insaturados na gordura de leite, pode influenciar nas rotas metabólicas de síntese de gordura, levando à depressão do teor de gordura no leite. Distúrbios dessa natureza podem trazer prejuízos econômicos uma vez que a gordura é o maior componente energético do leite, sendo responsável por muitas propriedades físicas, características organolépticas de qualidade do leite e seus derivados, e também por fazer parte do sistema de pagamento em muitos países. Além disso, em vários estudos tem-se comprovado a dificuldade de manipulação e incremento de alguns ácidos graxos desejáveis de maneira consistente.

Nesse sentido, várias dúvidas permanecem acerca de qual fonte de gordura levaria a efeitos positivos (perfil de ácidos graxos), níveis de inclusão e a forma como esta gordura seria suplementada à dieta, ou seja, na forma livre, parcialmente protegida ou completamente protegida da biohidrogenação ruminal, refletindo deste modo no produto final, seja leite ou carne.

Assim esse trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar os efeitos da manipulação dietética através da adição de fontes lipídicas na forma livre ou parcialmente protegidas sobre o perfil de ácidos graxos da gordura do leite, a produção de gordura, desempenho produtivo, estimativa de síntese microbiana e determinados parâmetros ligados ao metabolismo de lipídeos em vacas leiteiras de alto potencial de produção.

2. Revisão de literatura

2.1 Ácidos graxos e saúde humana

Nas últimas décadas o foco dos consumidores, principalmente aqueles de países desenvolvidos, é o de cultivar hábitos saudáveis, melhorando a qualidade e expectativa de vida. Dentre esses hábitos, a alimentação é uma das maiores preocupações em relação aos possíveis danos à saúde, ou a resíduos que possam se acumular no organismo e contribuir para o desenvolvimento de doenças. Hoje a busca não é somente por alimentos que sejam inofensivos, mas que possam de alguma forma contribuir na prevenção de qualquer tipo de distúrbio, por possuírem funções nutritivas e terapêuticas, sendo denominados nutracêuticos.

Alimentos ricos em gordura saturada, como as gorduras de origem animal, têm sido apontados como responsáveis por um grande número de desordens metabólicas dentre elas o câncer, diabetes, hipertensão arterial e em especial doenças cardiovasculares (Belury, 2002). Tais doenças ocorrem devido à deposição de gordura na camada interna da parede arterial, produzindo posteriormente obstrução parcial ou total do lúmen da artéria comprometida. A arteriosclerose é uma doença multifatorial, sendo considerada como principal fator de risco a hipercolesterolemia. Existem outros fatores envolvidos, como obesidade, tabagismo, sedentarismo, aumento de triacilgliceróis e estresse. A dieta exerce papel primordial na determinação do aparecimento desses fatores, levando a um aumento do risco de doenças cardiovasculares. Os fatores dietéticos que possuem efeitos adversos sobre o metabolismo de lipídeos são a maior ingestão de gordura saturada e colesterol e excessiva ingestão calórica, levando à obesidade (Soglia, 2003).

De uma maneira geral o efeito de determinado alimento nas taxas de colesterol provavelmente não está relacionado apenas à quantidade nele presente. Sabe-se que os níveis de lipoproteínas no sangue estão relacionados com a taxa de colesterol. A ingestão de gordura saturada tende a elevar o conteúdo de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) e LDL (lipoproteína de baixa densidade) com conseqüente aumento de colesterol

sanguíneo. Dietas ricas em lipídeos insaturados reduz o colesterol e em alguns casos aumenta o HDL (lipoproteína de alta densidade). A HDL funciona como um carreador das moléculas de colesterol se convertendo em LDL e VLDL para posteriormente serem eliminadas no fígado. Se as taxas de colesterol são elevadas, o fígado não tem capacidade de metabolizar todo o excesso de LDL e VLDL (Soglia, 2003).

As recomendações dos pesquisadores são no sentido de diminuição da gordura total, principalmente das gorduras saturadas em relação ao consumo de energia, e aumento na relação de ácidos graxos insaturados/saturados, com aumento nos consumos de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) n-3 e n-6, sendo alguns destes considerados essenciais para o homem, como o ácido eicosapentaenóico (EPA) $C_{20:5\ n-3}$. As principais fontes de EPA são os óleos de peixe, porém, é possível encontrar pequenas quantidades desses ácidos na carne de ruminantes.

Embora pareça controverso, os animais necessitam de determinados ácidos graxos para sua sobrevivência e correto funcionamento do metabolismo. Esses ácidos graxos são considerados essenciais porque o organismo dos animais não consegue produzi-los em quantidades suficientes para atender sua demanda. São considerados essenciais os ácidos $C_{18:2\ n-6}$ e $C_{18:3\ n-3}$. A partir desses ácidos o animal tem condições de produzir outros ácidos graxos importantes no metabolismo. Os ácidos graxos $C_{20:4\ n-6}$ (araquidônico) e $C_{20:5\ n-3}$ (EPA) são sintetizados a partir do $C_{18:2\ n-6}$ e $C_{18:3\ n-3}$ respectivamente, através de alongamento. Por sua vez, os ácidos araquidônico e EPA têm importante papel metabólico, sendo precursores de compostos metabólicos diversos, como prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos (Palmquist e Matos, 2006).

Além desses ácidos graxos essenciais, outros ácidos graxos insaturados, principalmente os ácidos oléico e o linoléico conjugado, não estão associados ao desencadeamento de doenças e podem prevenir o aparecimento dessas. O enfoque das pesquisas é sobre os efeitos nutracêuticos do ácido linoléico conjugado (CLA) sobre a saúde humana.

CLA refere-se ao conjunto de isômeros de posições e configurações do ácido octadecadienóico, ou seja, ácido linoléico ($C_{18:2}$), os quais apresentam duplas ligações conjugadas, sendo separadas por uma ligação

carbono-carbono. Os seus isômeros são *cis-cis*, *cis-trans* e *trans-trans* com duplas ligações nas posições 9 e 11, 10 e 12 e, 11 e 13, sendo o isômero natural predominante em humanos e animais o ácido octadecadienóico *cis-9*, *trans-11* (Parodi, 1994).

O CLA é naturalmente encontrado nos ácidos graxos de produtos originados de ruminantes como carne, leite e derivados, sendo um intermediário natural durante o processo de biohidrogenação microbiana dos lipídeos insaturados da dieta no rúmen, onde, sob condições dietéticas normais, o ácido esteárico (C_{18:0}) é o principal produto. Entretanto, em algumas condições, a biohidrogenação pode não ser completa, propiciando o aumento do seu fluxo para os intestinos e da sua concentração no leite. Portanto, o leite e seus derivados são a maior fonte de CLA na dieta humana (Bessa et al., 2000).

Recentemente foi descoberta a atividade anti-carcinogênica do CLA por meio de estudos onde se demonstrou ação inibitória sobre carcinomas epidermais, mamários e gastrintestinais. Os efeitos anticarcinogênicos são dependentes da dose, estendendo de 0,1 a 1 % da dieta (Ip et al. 1991, citado por Bessa et al., 2000).

Numerosas propriedades fisiológicas têm sido atribuídas ao CLA, com ações antiadipogênicas, antidiabetogênicas, anticarcinogênicas e antiaterosclerogênicas. Além disso, pesquisadores encontraram sinais de que o CLA está envolvido na formação óssea, sistema imune, no metabolismo de lipídeos e expressão gênica em vários tecidos (Belury, 2002, Collomb et al., 2006).

Os estudos envolvendo os efeitos do CLA sobre a deposição de gordura corporal são controversos e estão longe de chegar a conclusões sobre seu real efeito. A maioria dos trabalhos envolvendo suplementação com CLA na dieta de ratos, hamsters, suínos e humanos mostraram redução na massa lipídica corporal em condições de obesidade e em condições corporais normais ou ligeiramente obesos (Belury, 2002). Contudo, outros estudos não comprovaram este efeito. Fatores relacionados à dose diária, tempo de dieta, efeitos pós-tratamento, efeito sobre o sexo, estágio fisiológico e qual isômero é mais efetivo precisam ser mais bem esclarecidos para se ter conclusões definitivas. O mecanismo pelo qual o CLA influencia

na deposição de gordura corporal ainda não está elucidado, mas existem evidências de que estaria envolvido com as rotas de gasto de energia. Estudos com camundongos mostraram que após suplementação com CLA houve aumento do metabolismo energético, maior consumo de oxigênio gerado pela maior oxidação de lipídeos, e não de carboidratos (Ohnuck et al., 2001, citado por Belury, 2002).

Tem sido atribuído ao CLA a capacidade de prevenir diabetes. Khanal (2004) verificou diminuição dos níveis de glicose e aumento da sensibilidade à insulina e sugeriu o isômero *trans*-10, *cis*-12 como responsável. Outros estudos tiveram resultados divergentes com relação ao efeito do *trans*-10, *cis*-12 CLA. Já o isômero *cis*-9, *trans*-11 parece não obter nenhum efeito sobre a prevenção da diabetes (Belury, 2002).

O possível efeito carcinogênico do CLA tem tido grande repercussão no mundo científico e poucos avanços foram conseguidos. A maioria dos estudos são com técnicas *in vitro* ou com animais. Até o momento sabe-se que o CLA está envolvido em vários passos e nos três estágios da carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) e que os efeitos diferem dependendo do isômero de CLA, tipo e local na célula ou órgão e estágio da carcinogênese (Lee & Lee, 2005, citado por Collomb et al., 2006). Os CLA podem ser adicionados aos fosfolipídeos da membrana em substituição a outros ácidos graxos insaturados. A consequência pode ser alterações no metabolismo celular e sinais de transdução levando a interferências em vários mecanismos: regulação da proliferação celular e apoptose, regulação da expressão gênica, influência na síntese e metabolismo dos eicosanóides e nos mecanismos antioxidativos (Kraft e Jahreis, 2004, citados por Collomb et al., 2006).

Também foi demonstrado que a suplementação com CLA reduziu a concentração plasmática de lipoproteínas de baixa densidade e a inibição da aterosclerose em coelhos e hamsters (Lee et al., 1994; Nicolosi et al. 1997, citados por Bessa et al., 2000). Ainda como efeito do CLA, tem sido demonstrado o seu papel na modulação do sistema imune aumentando a blastogênese de linfócitos e sua ação em reduzir efeitos catabólicos no músculo esquelético em pássaros e ratos, além de alteração na partição de nutrientes. Esses efeitos foram demonstrados em animais e muitos estudos

têm utilizado um preparado que inclui uma mistura de isômeros do CLA. Portanto, ainda não se sabe se há um isômero específico para cada efeito (Collomb et al., 2006).

2.2 Metabolismo dos lipídeos no rúmen

Segundo Palmquist et al. (1993), a quantidade de lipídeo dietético transformado diretamente em gordura do leite é influenciada principalmente por três fatores, sendo lipólise e biohidrogenação ruminal, absorção e relação reserva/excreção de lipídeos nos tecidos adiposos.

Os lipídeos que chegam ao rúmen por via digestiva são transformados seguindo dois processos principais: inicialmente ocorre uma extensa hidrólise dos lipídeos esterificados da dieta, onde os triacilgliceróis, galactolipídeos e fosfolipídeos liberam ácidos graxos livres (AGL) e glicerol por ação de lipases de natureza extracelular produzidas pelos microrganismos ruminais. Nem todas as bactérias possuem atividade lipolítica, o mesmo acontecendo com os fungos e protozoários do rúmen. *Anaerovibrio lypolitica* parece ser o principal microrganismo envolvido no processo hidrolítico de triacilgliceróis e *Butyrivibrio fibrosolvans* no processo hidrolítico de fosfolipídeos e galactolipídeos (Harfoot & Hazlewood, 1997).

A ação microbiana nos compartimentos fermentativos modifica a natureza dos lipídeos da dieta, transformando ácidos graxos insaturados em saturados (ácido esteárico), através do processo de biohidrogenação. A biohidrogenação pode ser considerada como estratégia dos microrganismos em diminuir a concentração de ácidos graxos insaturados, os quais apresentam alta capacidade reativa com as membranas celulares, processo que normalmente, resulta em perda da sua natureza bifásica, promovendo a morte microbiana. Adicionalmente, a biohidrogenação contribui para a retirada de íons H^+ do ambiente ruminal, evitando seu acúmulo; e para a redução da produção de CH_4 pelas bactérias metanogênicas, uma vez que consome H_2 , aumentando com isso, a eficiência energética da dieta.

Uma vez que os lipídeos nos alimentos estão, em sua maioria, na forma esterificada e, as bactérias responsáveis pela hidrogenação atuam

somente sobre ácidos graxos livres, a lipólise é, portanto, um pré-requisito, liberando com isso, ácidos graxos livres e glicerol. Os ácidos graxos poliinsaturados tornam-se então, disponíveis à ação microbiana, para o processo de biohidrogenação, que se inicia pela isomerização da ligação *cis*-12 dos ácidos linoléico e linolênico à ligação *trans*-11, que resultante do ácido linoléico, forma *cis*-9, *trans*-11, ou ácido linoléico conjugado (CLA) (Figura 1). Adiante, a dupla ligação *cis*-9 é hidrogenada, produzindo C_{18:1} *trans*-11 e C_{18:2} *trans*-11, *cis*-15 para os ácidos linoléico e linolênico, respectivamente. O C_{18:2} *trans*-11, *cis*-15 sofre uma hidrogenação na dupla ligação *cis*-15, produzindo também C_{18:1} *trans*-11, o qual é também hidrogenado na C_{18:1} *trans*-11, resultando em ácido esteárico. Na Figura 1, também é ilustrada a ação específica de diferentes grupos microbianos (A e B) na hidrogenação de lipídeos no rúmen. O grupo A, hidrogena os ácidos linoléico e linolênico somente a C_{18:1} *trans*-11, já o grupo B, é capaz de hidrogenar ácidos graxos monoinsaturados a ácido esteárico. *Butyrivibrio fibrisolvens* tem sido reconhecida como a principal bactéria responsável pela biohidrogenação de ácidos graxos insaturados no rúmen (Kepler et al., 1970, citados por Parodi, 1994), e mais recentemente Kim et al., (2002) identificou que a bactéria ruminal *Megasphaera elsdenii* produz quantidades expressivas de *trans* - 10, *cis* - 12 CLA.

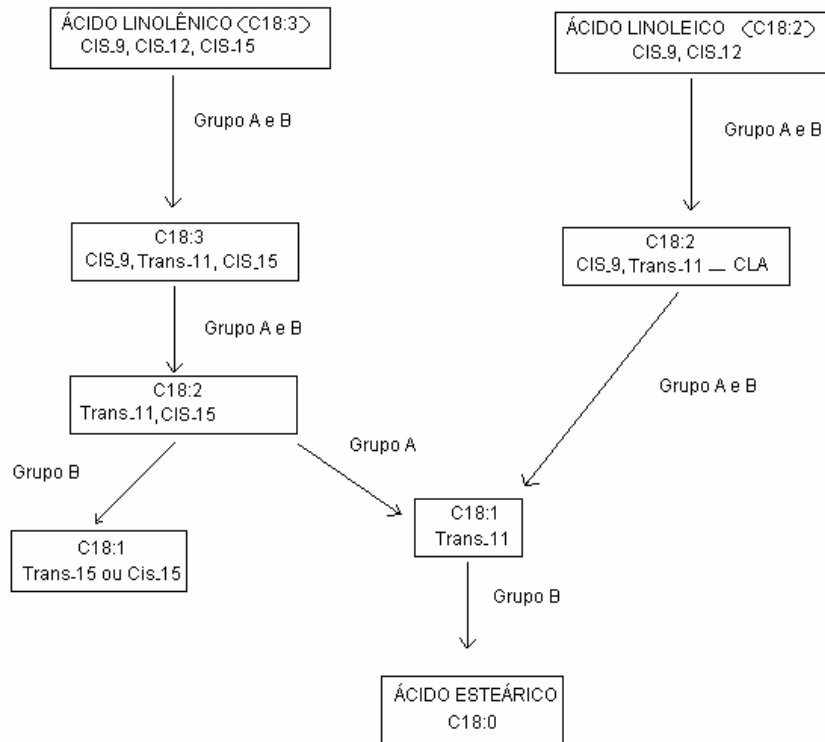


Figura 1 – Ilustração esquemática da biohidrogenação ruminal dos ácidos linoléico e linolênico, pelos grupos A e B de bactérias.

Embora o ácido esteárico seja o principal produto da biohidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados, existem algumas condições que afetam a biohidrogenação. Têm sido observado inibição do último passo da biohidrogenação levando ao acúmulo de ácidos graxos *trans* C_{18:1}, quando dietas são suplementadas com óleo de peixe (Wachira et al., 2002; Shingfield et al., 2003). Condições que contribuem para a diminuição de pH como por exemplo dietas ricas em concentrado, e utilização de ionóforos também podem levar a inibição do último passo da biohidrogenação, contudo, a inibição parece ser muito menor do que na etapa de hidrólise (Van Nevel & Demeyer, 1995). Estas condições dietéticas especiais levam direta ou indiretamente às alterações na produção e composição da gordura do leite.

2.3 Metabolismo de ácidos graxos voláteis

Os ácidos graxos de cadeia curta, especialmente os ácidos acético, propiônico e butírico, também conhecidos como ácidos graxos voláteis (AGV), são considerados as maiores fontes de energia para os ruminantes e juntamente com o metano, dióxido de carbono, amônia e material celular são os principais produtos finais formados da incompleta oxidação dos alimentos no rúmen.

O rúmen possui grande capacidade de absorção de ácidos graxos voláteis (AGV) em razão de sua grande superfície e adequado suprimento sangüíneo. Alguns destes ácidos são metabolizados durante sua passagem pela parede do rúmen. Em especial 70 a 90% do ácido butírico é convertido em β -hidroxibutirato (BHB), via β -hidroxi- β metilbutiril-CoA, e acetoacetato. Igualmente, uma parte do ácido propiônico sofre fixação de CO₂ e conseqüente formação de succinato, sendo utilizado pelo tecido.

A maior parte do propionato, entretanto, vai para o fígado onde é metabolizado a succinato por meio do ciclo de Krebs, para posterior formação de glicose, o principal precursor da lactose do leite. O acetato, em menor proporção, também é metabolizado no rúmen, dando origem provavelmente a corpos cetônicos, de forma semelhante ao butirato (Church, 1993; Teixeira & Teixeira, 2001). Acetato e em menor parte β -hidroxibutirato são os principais precursores de parte da produção da gordura do leite, através da síntese *de novo* de ácidos graxos na glândula mamária.

As proporções relativas dos principais AGV formados no rúmen de animais recebendo principalmente forragens estão entre 60 – 70% de acetato, 18 – 22% de propionato e 13 – 16% de butirato, 2 – 4% de valerato e traço de formato (Church, 1993; Teixeira & Teixeira, 2001).

2.4 Metabolismo de ácidos graxos de cadeia longa (AGCL)

Ao contrário dos ácidos graxos voláteis, os AGCL não são absorvidos em nível ruminal e sim pelas células do intestino onde são reesterificados, armazenados nos enterócitos como mono, di ou triacilgliceróis, colesterol e fosfolípídeos, que são incorporados aos quilomicrons e então absorvidos e

distribuídos pelo sistema linfático até os tecidos periféricos, incluindo a glândula mamária (Bauchart, 1995). Os ácidos graxos livres e os monoacilgliceróis são captados pelas células mamárias para a formação da gordura, em particular aquelas ricas em ácidos graxos de cadeia longa.

O tecido adiposo possui grande capacidade de sintetizar ácidos graxos. A gordura localizada no tecido adiposo ocorre quase que exclusivamente na forma de triacilgliceróis com predominância de C₁₆ e C₁₈ e pouco de C_{18:1} e C_{18:2} (Emery & Herdt, 1991). Os ácidos graxos mobilizados do tecido adiposo são inicialmente complexados com albumina e podem ser utilizados por ampla variedade de tecidos e órgãos, incluindo a glândula mamária e fígado. Os ácidos graxos no interior do fígado podem ser oxidados completa ou parcialmente e esterificados principalmente com glicerol para formar triacilgliceróis que podem ser estocados ou exportados como parte de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL). O metabolismo hepático de ácidos graxos está positivamente relacionado com a concentração de ácidos graxos no sangue, que por sua vez está negativamente relacionado ao balanço de energia (Grummer, 1991).

2.5 Origem dos ácidos graxos e síntese de gordura do leite

Espécies de mamíferos apresentam extensas diferenças na composição da gordura do leite. A composição da gordura láctea de ruminantes, bem como a síntese dos ácidos graxos que a compõem, difere consideravelmente do que ocorre em monogástricos, por não ser influenciada pela composição dos ácidos graxos dietéticos, pois no rúmen alguns processos importantes levam à modificação da natureza dos ácidos graxos dietéticos. Os ácidos graxos da gordura do leite vêm basicamente da síntese *de novo* dentro das células do epitélio mamário e da absorção de ácidos graxos de cadeia longa pré-formados. Ácidos graxos de cadeia curta (C₄ a C₈) e média (C₁₀ a C₁₄) vêm basicamente da síntese *de novo* (acetato e em menor parte do β-hidroxibutirato). Ácidos graxos de cadeia longa (> C₁₆) são derivados da absorção de lipídeos circulantes (da dieta ou da mobilização das reservas corporais). Os ácidos graxos de 16 carbonos são originados de ambos os processos.

Em ruminantes, cerca de metade dos ácidos graxos do leite vem do processo de síntese *de novo*. Assim como a glicose é utilizada para síntese *de novo* em não-ruminantes, ruminantes utilizam o acetato originado da fermentação ruminal como a maior fonte de carbono. Além disso, o β -hidroxibutirato, produzido pelo epitélio ruminal da absorção do butirato, fornece cerca de metade dos primeiros quatro carbonos para a síntese *de novo* de ácidos graxos em ruminantes. Há também diferenças na rota bioquímica que fornece equivalentes redutores (NADPH) para sustentar a síntese *de novo* entre ruminantes (ciclo das pentoses-fosfato e ciclo do isocitrato) e não-ruminantes (ciclo das pentoses-fosfato e ciclo da trans hidrogenização do malato).

Os ácidos graxos pré-formados que entram na glândula mamária para serem utilizados na síntese de gordura são derivados de lipoproteínas circulantes e ácidos graxos não esterificados (AGNE) que foram originados respectivamente da absorção de lipídeos do trato digestivo e da mobilização de gordura das reservas corporais (Bauman e Davis, 1974; Barber et al., 1997). Em ruminantes, os ácidos graxos da gordura do leite que vêm da circulação são originados predominantemente da absorção intestinal de lipídeos dietéticos e microbianos. Em geral, lipólise e mobilização das reservas correspondem por $< 10\%$ dos ácidos graxos da gordura láctea.

Porém, quando vacas estão em balanço energético negativo, a contribuição de ácidos graxos oriundos da mobilização aumenta em proporção direta com a severidade do déficit energético. Nesses casos ocorre grande influxo de ácidos graxos livres na corrente sanguínea provenientes da mobilização da gordura corporal, que são captados pelo fígado. Como o tecido hepático de ruminantes tem capacidade limitada de exportar triacilglicerol na forma de lipoproteína de baixa densidade (VLDL), os ácidos graxos acabam sendo depositados na forma de triacilglicerol no fígado. Esse período de aumento na concentração hepática de triacilglicerol e de lipídeos totais caracterizam a esteatose hepática e pode preceder a cetose hepática quando o excesso de triacilglicerol não for completamente oxidado, levando à formação de corpos cetônicos ou cetogênese (Santos , 2006).

2.6 Fatores responsáveis por alterações na composição da gordura do leite

Gordura é o componente do leite mais variável em ruminantes. Triacilgliceróis (TAG) representam cerca de 95% do conteúdo de lipídeos do leite e dentre os TAG, a maioria é de ácidos graxos variando de C₄ a C₁₈. Os 5% restantes representam as outras classes de lipídeos como os fosfolipídeos, colesterol, diacilglicerol, monoacilglicerol e ácidos graxos livres.

Vários são os fatores que podem influenciar na composição e produção da gordura do leite, alguns são inerentes ao animal, envolvendo aspectos genéticos e fisiológicos e outros estão relacionados ao meio, ou fatores ambientais. O componente gordura pode sofrer variação em sua composição de 1 a 2 unidades percentuais, dependendo da natureza da interferência. Fatores ligados à vaca têm pouca influência a curto prazo quando se deseja promover mudanças na composição da gordura do leite, enquanto que fatores de meio, principalmente a nutrição, podem promover respostas rápidas em termos de alteração na composição.

Os ruminantes, durante sua evolução, adaptaram-se para utilização eficiente de alimentos fibrosos, capacitando estes animais a não competir com outras espécies pela alimentação. Entretanto, o melhoramento genético imposto pelo homem permitiu a estes animais atingirem índices de produtividade extremamente elevados. Desta forma, por melhor que seja a qualidade do volumoso, este impõe certos limites de produtividade, tornando necessária a utilização de grãos.

Porém, a utilização de grãos em quantidades elevadas na dieta, suficiente para suprir níveis adequados de nutrientes para que o animal possa atingir todo o seu potencial produtivo, cria um ambiente ruminal diferente daquele cujo animal adaptou-se. A presença de amido favorece o desenvolvimento de bactérias amilolíticas, as quais apresentam padrão de fermentação diferente daquelas que utilizam carboidratos fibrosos e, adicionalmente, a elevada velocidade de fermentação do amido, acima da capacidade de remoção dos produtos da fermentação, leva ao acúmulo de ácidos orgânicos, o que pode resultar em abaixamento do pH, que é condição considerada como sendo anormal e indesejável (Santos, 2006).

A utilização de grandes quantidades de concentrados na dieta, principalmente aqueles ricos em amido, levam à queda do teor de gordura do leite e mudança no perfil de ácidos graxos. Nestas circunstâncias, ácidos graxos de cadeia curta são sintetizados em menor quantidade e o conteúdo de ácido graxo com 18 carbonos aumenta, principalmente os *trans*- C_{18:1}. Algumas teorias tem sido propostas na tentativa de explicar a causa desse fenômeno (Bauman & Griinari, 2001).

A diminuição da síntese *de novo* dos ácidos graxos de cadeia curta poderia ser explicada pela diminuição no suprimento de acetato para a glândula mamária em razão das mudanças no padrão de AGV ruminal em dietas ricas em concentrado e pobre em fibra. Especificamente nestas condições dietéticas, a relação molar de acetato:propionato diminui consideravelmente no líquido ruminal e em vários trabalhos foi estabelecida clara relação entre as mudanças no padrão de AGV e a redução na produção de gordura do leite. Mudanças nas proporções de AGV são bem evidentes em dietas com baixa relação volumoso:concentrado ou em dietas com fibras de baixa efetividade (Palmquist & Matos, 2006).

Variações no padrão de AGV ruminal são de pequena magnitude e menos consistentes para dietas suplementadas com óleos vegetais ou de peixe e freqüentemente há redução no teor de gordura do leite em vacas submetidas a estas dietas sem, contudo haver mudanças no padrão de AGV. Para dietas ricas em concentrado, a redução nas proporções molares de acetato ocorre principalmente devido ao aumento na concentração de propionato mais do que a redução na concentração de acetato, portanto, a deficiência de acetato não seria suficientemente forte para sustentar esta hipótese (Bauman & Griinari, 2001).

Outra possível explicação seria a diminuição do suprimento de acetato para a glândula mamária devido à insulina. Esta teoria sugere que elevados níveis de propionato produzidos no rúmen de animais submetidos a dietas ricas em concentrado estimulariam a secreção de insulina pelo pâncreas. Propionato e glicose estimulam a secreção de insulina e a elevação dos níveis de insulina levaria ao aumento da absorção de precursores lipogênicos (acetato e β -hidroxibutirato) no tecido adiposo e diminuição da liberação de ácidos graxos. Como a glândula mamária não é

responsiva às mudanças de insulina circulante, o resultado seria uma mudança de destino dos precursores da síntese de lipídeos da glândula mamária para os tecidos sensíveis à insulina do corpo (Bauman & Griinari, 2001).

Contudo, têm-se verificado respostas inconsistentes na produção de gordura do leite em estudos envolvendo infusão exógena de propionato e glicose. Além disso, outros estudos têm mostrado que elevações crônicas nos níveis de insulina circulante (4 vezes mais que o normal) não influenciaram a síntese de gordura no leite durante o período estudado. Outro fato a considerar é que em situação de depressão na gordura do leite induzida pela dieta, todos os ácidos graxos de cadeia longa estão em menores concentrações, porém os ácidos graxos de cadeia curta e média estão drasticamente reduzidos (Bauman & Griinari, 2001).

Uma terceira explicação para a alteração na gordura do leite causada por mudanças na relação volumoso:concentrado seria a diminuição na síntese *de novo* de ácidos graxos de cadeia curta não pela deficiência de precursores, mas pela inibição da síntese em algum ponto por ácidos graxos insaturados de configuração *trans*. Tais ácidos seriam originados do incompleto processo de biohidrogenação ruminal.

O processo de biohidrogenação de ácidos graxos insaturados no rúmen, a formação dos produtos e o seu fluxo para os intestinos, é dependente do ambiente ruminal e sua população predominante. Tem sido sugerido que a redução do pH ruminal, pela ingestão de elevada quantidade de grãos, possa interferir com as vias de biohidrogenação de ácidos graxos insaturados, no qual o produto final é a conversão do ácido graxo C_{18:1} *trans*-11 a ácido esteárico (Storry & Rock, 1965; Griinari et al., 1995; citados por Bauman & Griinari, 2001).

Kalscheur et al. (1997), detectaram redução da biohidrogenação de ácidos graxos no rúmen e conseqüente aumento do fluxo duodenal de C_{18:1} *trans*-11 em vacas de leite alimentadas com dieta de baixo teor de forragem sem a adição de tamponantes. Entretanto, quando se adicionou tamponantes à mesma dieta, houve aumento do pH ruminal, alterações na proporção de AGVs e, provavelmente, mudanças nas espécies de microrganismos e suas taxas de crescimento, o que aumentou o processo

de biohidrogenação, tornando o fluxo de $C_{18:1}$ *trans*-11 no duodeno semelhante ao dos animais submetidos à dieta com elevado teor de forragem.

Desta forma, dietas com elevado teor de grãos não somente fornecem ácidos graxos poliinsaturados necessários para a produção do ácido graxo $C_{18:1}$ *trans*-11, mas também, alteram o ambiente ruminal, o qual pode favorecer a incompleta biohidrogenação e formação de $C_{18:1}$ *trans*-11. A redução do pH ruminal parece afetar negativamente os últimos passos da biohidrogenação, principalmente a conversão de $C_{18:1}$ *trans*-11 à ácido esteárico, por inibição da enzima microbiana redutase.

Vale ressaltar que além da relação volumoso:concentrado, outros aspectos como a efetividade da fibra do volumoso e o tipo de concentrado ou tratamento a que foi submetido, uso de aditivos, tamponantes e suplementação da dieta com lipídeos podem influenciar diretamente o padrão de fermentação ruminal e indiretamente a composição da gordura do leite.

Fibra fisicamente efetiva é aquela capaz de estimular a ruminação e conseqüentemente a salivação, que por sua vez atua no tamponamento do pH ruminal. Um mínimo de fibra efetiva é requerido para manter a processo de ruminação e geralmente está relacionada ao tamanho das partículas do volumoso. Volumosos finamente moídos são menos eficazes em promover ruminação em relação àqueles em que pelo menos parte das partículas é moída grosseiramente (em geral 20% das partículas com tamanho mínimo de 4 cm).

Da mesma forma, concentrados ricos em amido, bem como alimentos que passaram por processamento são mais facilmente digeridos no rúmen levando a modificação do padrão de fermentação, queda de pH e como discutido anteriormente, diminuição da produção de gordura do leite, em especial dos ácidos graxos de cadeia curta.

2.7 Utilização e limitações de fontes lipídicas para vacas leiteiras

A adição de lipídeos à dieta de vacas leiteiras tem sido uma estratégia importante para aumentar a concentração energética da dieta, sem que

ocorram riscos de distúrbios nutricionais, decorrentes do aumento da proporção de concentrados. Adicionalmente, a utilização de lipídeos tem sido bem vista pelo fato de aumentar a eficiência energética da dieta, pela redução da metanogênese e do incremento calórico. Entretanto, por interferir negativamente na digestão da fibra, a adição de lipídeos tem sido limitada a aproximadamente 5% ou menos da matéria seca total da dieta (Palmquist & Jenkins, 1980). O aporte de ácidos graxos poliinsaturados ou ricos em ácidos graxos do tipo *trans* (óleos vegetais e óleo de peixe) na dieta tem efeito direto sobre a fermentação ruminal, provocando a modificação na ingestão por efeito de saciedade do animal e pela modificação do padrão de fermentação ruminal com mudanças da população celulolítica e diminuição da digestibilidade da fibra.

Além disso, a suplementação lipídica, dependendo da quantidade e da natureza da fonte, pode interferir de forma marcante na composição e produção de gordura do leite. O fornecimento de lipídeos na dieta tende a deprimir os teores de gordura do leite. A magnitude desse efeito depressor está em função principalmente da quantidade e do tipo de lipídeo utilizado.

A redução da gordura do leite pode ocorrer devido a determinados ácidos graxos *trans*. A inibição direta da síntese de gordura do leite pelo ácido graxo *trans* foi primeiro proposto por Davis & Brown (1970). Ácidos graxos *trans* são formados como intermediários no processo de biohidrogenação de ácidos graxos insaturados pelas bactérias ruminais. *Trans* 11 C_{18:1} é o isômero *trans* predominante na rota de biohidrogenação do ácido linoléico.

Recentemente foi estabelecido que o perfil dos isômeros de ácidos graxos é a questão chave na depressão da gordura do leite muito mais do que o total desses ácidos. Neste sentido, em recentes pesquisas foi demonstrado que o decréscimo na produção de gordura do leite está associado com o aumento específico do *trans* 10 C_{18:1} e não ao total de isômeros *trans* C_{18:1} (Griinari et al., 1998).

O isômero *trans*-10 C_{18:1} é formado na rota de biohidrogenação do ácido linoléico. A reação inicial é a isomerização da dupla ligação *cis*-9 para formar o *trans*-10, *cis*-12 CLA seguido de uma redução da dupla ligação *cis*-12 sobrando, portanto, o *trans*-10 C_{18:1}. Posteriormente, estudos avaliando a

participação do *trans*-10, *cis*-12 CLA mostraram relação linear entre *trans*-10 C_{18:1} e *trans*-10, *cis*-12 CLA na gordura do leite. Também foi observada relação curvilínea entre a redução na produção de gordura do leite e a quantidade de *trans*-10, *cis*-12 CLA em vacas alimentadas com dietas ricas em óleo de girassol. Apesar da quantidade desse ácido graxo ser muito pequena em comparação ao total de ácidos graxos (<0,06%) e em relação ao *cis*-9, *trans*-11 CLA (< 2%), que é o isômero CLA predominante, o *trans*-10, *cis* 12 CLA foi considerado um potente inibidor da síntese de gordura do leite (Bauman & Griinari, 2003).

O isômero *trans*-10, *cis*-12 CLA é também incorporado na gordura do leite e os estudos envolvendo infusão abomasal do isômero puro estabeleceram relação curvilínea entre o aumento da quantidade do isômero no conteúdo da gordura do leite e a redução na síntese desta gordura (Peterson et al., 2002). Assim como o *trans*-10 C_{18:1}, o conteúdo do *trans*-10, *cis*-12 CLA na gordura do leite também aumenta quando dietas pobres em fibra são fornecidas.

A utilização de gorduras com maior proporção de ácidos graxos insaturados e que passaram por processo de proteção, a fim de evitar biohidrogenação ruminal dos seus ácidos graxos insaturados, podem ser boas fontes lipídicas de suplementação. O possível efeito benéfico está no fato da diminuição na interferência com a atividade microbiana no rúmen, e desta forma, contribuir para o aumento de alguns ácidos graxos desejáveis na gordura do leite, como o ácido linoléico conjugado (CLA), diminuir alguns ácidos graxos considerados indesejáveis, como o ácido láurico, mirístico e palmítico sem, contudo, diminuir o teor de gordura do leite.

De acordo com Palmquist (1989), as fontes de lipídeos comerciais destinados à suplementação de vacas leiteiras podem ser divididas basicamente em três categorias: sementes inteiras de oleaginosas (soja, girassol, algodão, canola, etc.) óleos e gorduras livres (óleos vegetais, sebo e misturas de gordura animal e vegetal) e gorduras especiais “protegidas” (sais de cálcio de ácidos graxos).

No Brasil, várias fontes de lipídeos foram ou estão sendo objeto de estudos que são relatados nos diversos trabalhos de pesquisa encontrados (Meirelles, 1992; Delgado, 1994; Malafaia, 1995; Santos, 1999; Pinto, 1997;

Medeiros, 2002; Eifert, 2004), dentre elas pode-se citar: óleo de soja, caroço de algodão, semente de soja crua ou extrusada, semente de linhaça e complexo ácido graxo cálcio (Megalac®, Magnapac®, sais de cálcio de CLA).

As sementes de oleaginosas se destacam por apresentar alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados. O ácido linoléico predomina nas fontes mais comuns, sendo que a soja apresenta maiores concentrações de ácido linolênico. Esses ácidos graxos são os principais precursores do ácido linoléico conjugado (CLA) na glândula mamária. O fornecimento de sementes de soja e algodão, apesar de conterem alto teor de ácidos graxos insaturados, apresenta poucos riscos à microbiota ruminal se respeitados os limites de uso (Dhiman et al., 2005).

Os grãos ricos em óleos podem oferecer alguma proteção contra a completa biohidrogenação ruminal quando fornecidos intactos ao animal. Porém, esta proteção parece ser limitada e os resultados práticos variáveis. Dhiman et al. (2005) sugeriram que sementes de oleaginosas inteiras são menos efetivas em promover aumento do conteúdo do CLA na gordura do leite do que óleos livres e atribuiu ao fato de que os ácidos graxos insaturados do óleo estão mais disponíveis para biohidrogenação do que nas sementes. Parece também que o excesso de C_{18:2} inibe o passo final da biohidrogenação, podendo levar ao acúmulo do ácido *trans* 11 C_{18:1}, sendo este precursor de CLA na glândula mamária, pela ação da enzima Δ^9 desaturase presente nas células da glândula mamária (Griinari & Bauman, 1999, citados por Dhiman et al., 2005). Estes mesmos autores sugerem também que o processamento de grãos de sementes de oleaginosas pode levar ao aumento do conteúdo de CLA na gordura do leite em comparação a grãos não processados. Já Demeyer & Doreau (1999) relatam limitada capacidade de proteção dos grãos, com e sem processamento e pouco eficientes em promover proteção contra biohidrogenação.

Algumas restrições quanto ao uso dessas sementes tem sido observada em virtude da presença de fatores antinutricionais, inibidores de enzimas ou substâncias de efeitos tóxicos quando fornecidas cruas. A soja possui um fator antitripsínico, que inibe a ação da enzima tripsina, além da lipase, que pode contribuir para a rancificação de seu óleo e também da

urease que, em contato com a uréia, a converte em amônia, liberando um odor característico. No entanto, o processamento dos grãos praticamente elimina esses problemas. No caso da soja, o tratamento térmico destrói a urease e inativa a lipase, o que prolonga o tempo de estocagem dos grãos, além de aumentar consideravelmente seu teor de proteína “by pass”, e que pode se tornar um diferencial positivo deste produto, especialmente quando se trata de animais de alto potencial de produção. Porém, a utilização de soja grão em condições de campo pode não ser viável pela dificuldade de obtenção de tratamento térmico adequado e padronizado.

Os métodos químicos ou físicos têm sido bastante utilizados para proteção de alimentos contra alterações ruminais, como por exemplo, a biohidrogenação. O tratamento de proteína dietética com aldeído fórmico foi durante muito tempo a técnica mais utilizada para diminuição da degradação protéica, o que indiretamente impedia a biohidrogenação dos ácidos graxos dessas fontes protéicas.

O formaldeído reage com os aminoácidos em pH neutro, com formação de “grupos metil” nos grupos “aminoterminais” das cadeias de proteína, seguida de condensação e formação de pontes metilênicas intra e inter molecular (Ferguson, 1975). Sob as condições neutras do rúmen este complexo é estável. Ao atingir o abomaso, onde o meio é ácido, as ligações químicas são desfeitas, liberando a proteína para ser digerida e absorvida (Ackerson et al., 1976).

Esta técnica, porém não vem sendo muito utilizada por ser de alto custo, pelo fato do aldeído fórmico não ser bem aceito em vários países, produzir resultados inconsistentes e na maioria das vezes não ser interessante para a indústria, principalmente de lácteos, onde o produto final pode apresentar baixa estabilidade oxidativa em virtude dos elevados teores de ácido linoléico no leite, dependendo da fonte suplementar de gordura na dieta.

Por outro lado, se bem empregada, a técnica pode trazer bons resultados em termos de manipulação de gordura em ruminantes, principalmente no leite. Geralmente a utilização desta técnica tem por objetivo proteger o óleo de colza, rico em ácido oléico ($C_{18:1\ n-9}$), para elevar

seus teores na gordura o leite, com a diminuição dos teores de ácido láurico (C_{12:0}), mirístico (C_{14:0}) e palmítico (C_{16:0}) (Palmquist & Mattos, 2006).

Os sais de cálcio de ácidos graxos vêm sendo bastante utilizados como forma de diminuir a biohidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados. O princípio dessa técnica consiste em reduzir a biohidrogenação por diminuição de grupos carboxílicos livres dos ácidos graxos. O processo de biohidrogenação só ocorre em ácidos graxos insaturados na sua forma livre, ou seja, o grupamento carboxílico do ácido graxo insaturado deve estar em sua forma livre para que as enzimas bacterianas possam iniciar o processo de biohidrogenação.

Esses sais se associam aos grupamentos carboxílicos dos ácidos graxos insaturados, impedindo o início da biohidrogenação. Os sais de cálcio de ácidos graxos são conhecidos como gorduras protegidas, entretanto, esse termo é incorreto, pois eles se misturam ao conteúdo ruminal e parte dos ácidos graxos insaturados acaba sofrendo biohidrogenação, mesmo não afetando o metabolismo microbiano no rúmen. Maior ou menor extensão de biohidrogenação nestas circunstâncias está ligada possivelmente ao fato de maior participação de ácidos graxos insaturados na composição desses sais. Sabe-se que a insaturação pode influenciar no pKa dos sabões e conseqüentemente o pH ruminal pode interferir na dissociação desses sais. A utilização de sais de cálcio ricos em ácidos graxos poliinsaturados levaria a uma dissociação desses ácidos no ambiente ruminal, mesmo em condições de pH consideradas normais, justamente pelo maior poder de dissociação desses ácidos (Palmquist & Matos, 2006).

Diversos autores ressaltam algumas limitações no uso de lipídeos na dieta de vacas em lactação, nos níveis indicados para máxima eficiência da produção animal. Palmquist & Weiss (1994) sugerem que a eficiência energética máxima para produção de leite é conseguida quando cerca de 15 a 20% da energia metabolizável dietética for fornecida na forma de lipídeos (aproximadamente 8% da dieta).

Church (1993) ressalva que a inclusão de lipídeos na dieta de ruminantes como forma de permitir alto consumo de energia nem sempre é um método eficiente, uma vez que altos níveis podem reduzir a digestão da matéria seca no rúmen e resultar em menor disponibilidade de energia,

causando distúrbios na fermentação ruminal e aumentando as perdas de energia nas fezes. De acordo com Palmquist (1989), isto ocorre pelo efeito inibitório dos ácidos graxos insaturados sobre os microrganismos do rúmen, particularmente sobre as bactérias celulolíticas, o que reduz a digestibilidade da fibra da dieta. Esta redução também pode ocorrer quando os lipídeos em níveis mais elevados promovem barreira física, formando uma película sobre as partículas da dieta, impedindo a ação das enzimas microbianas sobre a degradação dos alimentos. No entanto, acredita-se que geralmente a liberação do óleo de sementes oleaginosas ocorra lentamente, resultando em efeitos mínimos sobre microrganismos celulolíticos. Quando a quantidade de fibra consumida é maior parece também reduzir os efeitos negativos de lipídeos sobre a digestão da fibra.

O fornecimento de lipídeos na dieta, de maneira geral, tende a deprimir os teores de gordura do leite. A magnitude desse efeito depressor está em função principalmente da quantidade e do tipo de lipídeo utilizado. Os lipídeos poliinsaturados ou ricos em ácidos graxos do tipo *trans* (óleos vegetais e óleo de peixe) são os que têm maior efeito depressor no teor de gordura do leite.

Essa redução da gordura do leite também ocorre por outras razões além do perfil dos ácidos graxos voláteis no rúmen. A inibição direta da síntese de gordura do leite pelo ácido graxo *trans* foi primeiro proposto por Davis e Brown (1970). Ácidos graxos *trans* são formados como intermediários no processo de biohidrogenação de ácidos graxos insaturados pelas bactérias ruminais. *Trans* 11 C_{18:1} é o isômero *trans* predominante na rota de biohidrogenação do ácido linoléico. As técnicas analíticas utilizadas não têm sido eficientes em identificar e separar isômeros *trans* específicos, mas técnicas mais avançadas estão sendo capazes de demonstrar a presença de variados tipos de isômeros com ligações *trans* no carbono quatro até C₁₆ no conteúdo ruminal e também na gordura do leite.

O envolvimento dos ácidos graxos *trans* no desenvolvimento da síndrome do baixo teor de gordura (SBTG) do leite tem sido freqüentemente considerado em dietas contendo óleos vegetais e de peixe. Tem sido observado em vários estudos evidências de que a redução na gordura do leite está relacionada com o aumento nas quantidades de *trans* C_{18:1} da

gordura do leite para uma série de dietas utilizadas. Para reforçar esta evidência, estudos usando cânula duodenal têm demonstrado que o fluxo de *trans* C_{18:1} foi várias vezes maior em dietas que causam SBTG (Wonsil et al., 1994; Kalscheur et al., 1997).

O envolvimento de ácidos graxos *trans* na redução da síntese de gordura do leite tem sido avaliado principalmente em dietas contendo óleos vegetais parcialmente hidrogenados como fonte de *trans* C_{18:1}.

O isômero *trans*-10 C_{18:1} é considerado potente inibidor da síntese de gordura do leite, sendo formado na rota de biohidrogenação do ácido linoléico. Posteriormente, estudos avaliando a participação do *trans*-10, *cis*-12 CLA mostraram que este ácido graxo é um potente inibidor da síntese de gordura do leite. Isto foi demonstrado em um estudo em que doses de 3,5 g/dia de *trans*-10, *cis*-12 CLA foram suficientes para reduzir a produção de gordura do leite em torno de 25% (Baumgard et al., 2000). Neste mesmo estudo não foi observado efeito depressor na gordura do leite pelo isômero *cis*-9, *trans*-11 CLA. Embora não fosse evidenciado, os autores sugeriram que o *trans*-10, *cis*-12 CLA interfere no aparato enzimático responsável pela síntese de novo ácidos graxos da gordura do leite.

A adição de lipídeos à dieta do animal normalmente diminui a porcentagem de proteína no leite em 0,1 a 0,3 unidades percentuais ou cerca de 0,07% para cada 450g de lipídeo adicionado. Segundo Palmquist & Weiss (1994), uma explicação para tal fato é que os microrganismos do rúmen não são hábeis em utilizar lipídeo como fonte de energia para seu crescimento, afetando a síntese de proteína microbiana e conseqüentemente o fornecimento de aminoácidos para a composição de proteína do leite. Neste caso, os autores sugerem como estratégia, a suplementação da dieta com boas fontes de proteína não degradável no rúmen.

2.8 Efeito da suplementação das dietas com lipídeos no teor de CLA do leite

O CLA é um termo usado para denominar a mistura de isômeros de posição e geometria do ácido linoleico (ácido octadecanóico *cis* 9 *cis* 12) que

contém duplas ligações conjugadas. O isômero predominante é o *cis*-9 *trans*-11, que representa 80 a 90% dos CLA encontrados na gordura do leite. Por ser derivado do processo de biohidrogenação ruminal, e pelo fato de ser encontrado em maior concentração em produtos de ruminantes, este isômero tem sido denominado com o nome comum de ácido rumênico (Ip et al., 1994; Palmquist, 2001). Além do caminho clássico da biohidrogenação incompleta do ácido linoléico e linolênico, os CLA podem ser sintetizados também a partir do *trans*-11 C_{18:1} através da ação da delta-9 dessaturase presente na glândula mamária. De acordo com Griinari et al. (2000), a significância quantitativa da síntese endógena de CLA é maior que a via da biohidrogenação. Essa informação passa a ser importante para entendimento do mecanismo de biossíntese de CLA, permitindo montar estratégias alimentares no sentido de aumentar a concentração de CLA na gordura de leite.

O CLA tem recebido atenção nos últimos anos por causa de suas propriedades biológicas relacionadas à saúde, incluindo, entre outras, sua atividade anticarcinogênica, redução na gordura corporal, efeito antidiabético, redução no desenvolvimento de arteriosclerose e modulador do sistema imune.

O conteúdo médio de CLA no leite varia entre 0,3 a 0,6% do total de ácidos graxos. O consumo de CLA pelos humanos é baixo em relação às doses que são recomendadas como efetiva na redução de tumores em experimentos com animais. A ingestão de CLA poderia ser aumentada pelo incremento no consumo de alimentos originados de ruminantes ou pelo incremento do conteúdo de CLA nesses próprios alimentos (Dhiman et al., 2000).

Medeiros (2002), citando Bognoux et al. (2001) afirma que apesar de bem estabelecido para modelos animais e culturas de células e tecidos, ainda faltam trabalhos mostrando efeito anticarcinogênico do CLA em humanos. Entretanto, inferências têm sido feitas à diminuição da incidência de câncer de mama em populações que apresentam maiores consumos de leite.

Algumas colocações feitas por Medeiros (2002) sobre dados de Knekt et al. (1996) demonstram que a redução do risco de câncer de mama deve

ocorrer com ingestão de cerca de 350 mg de CLA por dia e que seriam necessários o consumo de 2 litros de leite diários, considerando o teor médio de 5 mg de CLA/g de gordura do leite. Assim, aumentar o teor de CLA no leite seria importante saída do ponto de vista de saúde de quem o consome. O aumento do teor de ácidos graxos insaturados na dieta de vacas em lactação pode aumentar de forma natural o teor de CLA no leite e seus derivados e desta forma atender a exigência cada vez maior do consumidor em relação aos alimentos, quanto a sua qualidade e praticidade.

Lawless et al. (1998) indicaram que a suplementação em dietas de vacas com quantidades similares de óleo derivado de grãos de soja tostado produziram mais CLA no leite (27%) quando comparadas a vacas sob dieta controle isenta de suplementação lipídica. Este incremento chegou a 60% quando se utilizou óleo derivado de grãos de canola.

Dhiman et al. (2000) utilizando grãos de soja crus ou tostados, óleos de soja e de linhaça, encontraram que a adição de 2% de óleo de soja aumentou o conteúdo de CLA em 237% e que o teor de CLA pode ser aumentado pela utilização de fontes de ácidos linolêicos e linolênicos na forma de óleo ou de sementes de oleaginosas na ração, desde que este óleo esteja acessível aos microrganismos do rúmen para biohidrogenação.

Santos (1999) observou que a dieta suplementada com óleo de soja aumentou significativamente o percentual de CLA do leite de vacas multíparas 7/8 holandês-zebu em início de lactação, comparada com a soja integral. O autor concluiu que os lipídeos do óleo de soja podem ser utilizados para aumentar o nível de CLA no leite de vacas. Segundo o autor, o resultado não expressivo dos grãos de soja, pode ser devido ao fato de que estes grãos possuem os lipídeos presos à matriz protéica, ficando indisponível para biohidrogenação.

Alguns estudos (Lor & Herbein, 1998; Dhiman et al., 2000; Medeiros, 2002) tem demonstrado que a suplementação da dieta de vacas com CLA produzidos sinteticamente reduziram acentuadamente a concentração e quantidade de gordura no leite. Parte desses autores concluíram, a partir de infusões abomasais, que os isômeros contendo dupla ligação na posição 10 (*cis*-8, *trans*-10 e *trans*-10, *cis*-12) parece ter efeito inibitório sobre a síntese de gordura do leite.

De acordo com Chouirnard et al. (1999), o aumento da produção de CLA contendo isômeros ativos (*cis*-8, *trans*-10 e *trans*-10, *cis*-12) pode permitir seu uso para reduzir o teor de gordura do leite em rebanhos leiteiros. Esta seria uma estratégia interessante como ferramenta para melhorar o balanço energético de vacas no início da lactação.

Parece possível via manipulação da dieta de vacas leiteiras aumentarem a produção de CLA, que traria inúmeros benefícios para a saúde humana, porém as pesquisas ainda não chegaram à conclusão de quais seriam as melhores fontes lipídicas para aumentar a concentração de CLA no leite, qual seria a magnitude de resposta, os possíveis efeitos contraditórios entre aumento de CLA e diminuição de gordura do leite, principalmente onde a gordura ainda tem considerável valor econômico.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERSON, B.A. JOHNSON, R.R.; HENDRICKSON, R.L. Effects of treatment of whole fat soybeans or soy flour with formaldehyde to protect the polyunsaturated fatty acid from biohydrogenation in the rumen. **Journal of Nutrition**, v. 106, 1383-1390, 1976.
- BARBER, M.C.; CLEGG, R.A.; TRAVERS, M.T.; VERGNON, R.G. Lipid metabolism in the lacting mammary gland. **Biochimistry Biophysiology Acta** 1347: 101-106, 1997.
- BAUCHART, D. Lipid absorption and transport in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 6, n. 5, p. 281-289, 1995.
- BAUMGARD, L.H., CORL, B.A., DWYER, D.A., SAEBO, A., BAUMAN, D.E., Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **Animal Journal of Physiology**. 278, p. 178-184, 2000.
- BAUMAN, D.E.; DAVIS, C.L. **Biosynthesis of milk fat**. In **Lactation: A Comprehensive Treatise**, ed. BL Larson, VR, 1974.
- BAUMAN, D. E., GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v. 70:15–29, 2001.
- BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J.M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review Nutrition**. v. 23:203-227, 2003.
- BELURY, M.A. Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. **Annual Review Nutrition**, v. 22, p. 505 -531, 2002.
- BESSA, R.J.B., SANTOS-SILVA, J., RIBEIRO, J.M.R., PORTUGAL, A.V. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. **Livestock Production Science**., 63:201-211, 2000.
- CHURCH, C.D. **Fermentación ruminal**. In: El Ruminante: fisiología y nutrición. Zaragoza: Acribia, cap. 8, p. 159-189, 1993.
- CHOUINARD, P.Y.; CORNEAU, L.; BARBANO, D.M. et al. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. **Journal of Nutrition**, v. 129, 1579-1584, 1999.
- COLLOMB, M., SCHMID, A., SIEBER, R. et al. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. Review. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1347-1361, 2006.
- DAVIS, C.L.; BROWN, R.E., **Low-fat milk syndrome**. In: isomers on fat synthesis during growth and lactation. In: Phillipson, A.T. (Ed.),

Physiology of Digestion and Metabo-Proceedings of Cornell Nutrition Conference, pp. 180-190. lism in the Ruminant. Oriel Press, Newcastle upon Tyne, UK, 1970.

- DELGADO, E.F. **Caroço de algodão e milho-grão, em diferentes formas física na alimentação de vacas em lactação**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras-MG, 89 p., 1994.
- DEMEYER, D.; DOREAU M. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. **Proceedings of the Nutrition Society**. v.58, p 593-607. 1999.
- DHIMAN, T.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W. et al. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 5, p. 1016-1027, 2000.
- DHIMAN, T.R., NAM, S.H., URE, A.L. Factors affecting conjugated linoléico acid content in milk and meat. **Critical Reviews in Feed Science and Nutrition**. v. 45, pp 463 – 482, 2005.
- EIFERT, E.C. **Fontes de carboidratos, óleo de soja e monensina para vacas em lactantes: desempenho, digestibilidade, parâmetros ruminais e perfil de ácidos graxos do leite**. Tese (Doutorado em Zootecnia) Viçosa:UFV, 2004.
- EMERY, R.S.; HERDT, T. H. **Lipid nutrition**. The Veterinary Clinics of North America, v. 7, n. 2, p. 341-352, 1991.
- FERGUNSON, K.A. The protection of dietary proteins and aminoacids against microbial fermentation in the rumen. In: Mcdonald, I.W.; Warner, A.C.I. ed., Sidney. **Proceedings of the IV International Symposium on Ruminant Physiology**. Sidney, University of New England. Publishing Unit, 448 p., 1975.
- GRIINARI, J. M., DWYER, D. A.; McGUIRE, M. A.; et al. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression. **Journal of Dairy Science**. v. 81:1251–1261, 1998.
- GRIINARI, J.M.; CORL, B.A.; LACY, S.H. et al. Conjugated linoleico acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ desaturase. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 130, n. 9, 2285-2291, 2000.
- GRUMMER, R.R. Effect of feed on the composition of milk fat. **Journal of Dairy Science**., v. 74, n. 9, p. 3244-3257, 1991.
- IP, C.; THOMPSON, M.; SINCH, M.E. et al. Conjugated linoleico acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. **Cancer Reseach**, v. 54, n. 5, p. 1212-1215, 1994.

- HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. Hobson e Stewart, editores. Glasgow: Blackie Academic & Professional. p.382-426. 1997.
- KALSCHEUR, K.F., TETER, B.B., PIPEROVA, L.S., ERDMAN, R.A., Effect of dietary forage concentration and buffer addition on linoleic acid and its incorporation into meat and milk in dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 80, 2104–2114, 1997.
- KHANAL, R.C. Potential health benefits of conjugated linoleic acid (CLA): A review. **Asian - Australasian Journal of Animal Science**, 17, 1315 – 1328, 2004.
- KIM, Y. J.; LIU, R.H.; RYCHLIK, J. L. et al. The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. **Journal Applications Microbiology**. 92:976-982, 2002.
- LAWLESS, F.; MURPHY, J.J.; HARRINGTON, D. et al. Elevation of conjugated cis-9, trans-11-octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation. **Journal of Dairy Science**., v. 81, n. 12, 3259-3267, 1998.
- LOOR, J.J.; HERBEIN, J.H. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting of new fatty acid synthesis. **Journal of Nutrition**, v. 128, n. 12, p. 2411-2419, 1998.
- MALAFIA, P.A.M. **Consumo e digestão de nutrientes, eficiência microbiana, produção e composição do leite em vacas alimentadas com rações contendo sebo bovino**. Viçosa: UFV, Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal), 95 p., 1995.
- MEDEIROS, S.R. **Ácido linoleico conjugado: teores nos alimentos e seu uso no aumento da produção de leite com maior proteína e perfil de ácidos graxos modificado**. Tese (Doutorado em Ciência Animal e Pastagens) – Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Quieróz”, Piracicaba, SP, 98p., 2002.
- MEIRELLES, P.R.L. **Avaliação nutricional e cinética ruminal de caroço de algodão para vacas da raça holandesa em lactação**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras-MG, 61 p., 1992.
- PALMQUIST, D.L.; JENKINS, T.C. Fat in lactation rations: Review. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 1, p. 1, 1980.
- PALMQUIST, D.L.; Suplementação de lipídeos para vacas em lactação. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE RUMINANTES, 6, Piracicaba, **Anais...**, Piracicaba:FEALQ, p. 11-25, 1989.

- PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, A.D.; BARBANO, D.M. Feed and animal factors influencing milk fat composition. **Journal of Dairy Science**, v. 76, 1753-1771, 1993.
- PALMQUIST, D.L.; WEISS, W.P. Blood and hydrolyzed feather meals as source of undergradable protein in high fat diets for cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 6, 1630-1651, 1994.
- PALMQUIST, D.L. Ruminal and endogenous synthesis of CLA in cows **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 2, p. 134-137, 2001.
- PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. **Metabolismo de lipídeos**. In: Nutrição de Ruminantes, Telma Teresinha Berchielli, Alexandre Vaz Pires, Simone Gisele de Oliveira (Ed.) – Jaboticabal: Funep, 583 p., 2006.
- PARODI, P.W. Cow's milk fat components as potential anticarcinogenic agent. **Journal of Nutrition**, v.127, p. 1055-1060, 1994.
- PETERSON, D.G., KELSEY, J.A., BAUMAN, D.E. Analysis of variation in cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, pp. 2164 – 2172, 2002.
- PINTO, S.M. **Produção e composição química do leite de vacas holandesas no início de lactação alimentadas com diferentes fontes de lipídeos**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola Superior de Agricultura de Lavras, Lavras-MG, 94 p., 1997.
- SANTOS, J. E. P. **Distúrbios metabólicos** In: Nutrição de Ruminantes, Telma Teresinha Berchielli, Alexandre Vaz Pires, Simone Gisele de Oliveira (Ed.) – Jaboticabal: Funep, 583 p., 2006.
- SANTOS, F.L. **Efeito da suplementação de lipídeos na ração para produção de ácido linoléico conjugado (CLA) em leite de vacas**. Viçosa: UFV, 59p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), 1999.
- SHINGFIELD, K. J.; AHVENJARVI, S.; TOIVONEN, V. et al. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. **Animal Science**, v. 77:165-179, 2003.
- SOGLIA, S.L.O. **Perfil de ácidos graxos e concentração de ácido graxo conjugado (CLA) na gordura do leite de vacas alimentadas com diferentes fontes de lipídeos**. Lavras – UFLA, 75 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), 2003.
- TEIXEIRA, J.C.; TEIXEIRA, L.F.A.C. **Princípios de nutrição de bovinos leiteiros**, textos acadêmicos. Lavras: UFLA/FAEP, 2001. 245p.
- VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Lipolysis and biohydrogenation of soybean oil in the rumen in vitro: Inhibition by antimicrobials. **Journal of Dairy Science**, v. 78:2797-2806, 1995.

- WACHIRA, A. M.; SINCLAIR, L.A.; WILKINSON, R.G. et al. Effects of dietary fat source and breed on the carcass composition, n-3 polyunsaturated fatty acid and conjugated linoleic acid content of sheep meat and adipose tissue. **British Journal of Nutrition.**, v. 88:697–709, 2002.
- WONSIL, B.J., HERBEIN, J.H., WATKINS, B.A., Dietary and Cornell University Press, Ithaca, NY. ruminally derived trans-18:1 fatty acids alter bovine milk lipids. **Journal of Nutrition.** 124, 556–565, 1994.

Capítulo 1

Desempenho produtivo e cinética de nutrientes de vacas recebendo dietas contendo diferentes fontes lipídicas

1.1 Introdução

Dietas de ruminantes geralmente possuem baixos teores de lipídeos, variando entre 2,5 e 3,0%, dependendo do tipo de volumoso utilizado. Ruminantes, assim como todos os vertebrados necessitam de ácidos graxos essenciais para manutenção de funções biológicas vitais e bom desempenho. Essa exigência é alcançada quando eles correspondem a 1,0% e 2,0% da energia digestível para animais adultos e jovens, respectivamente (Palmquist & Matos 2006).

A suplementação lipídica torna-se uma estratégia interessante para categorias mais exigentes, como vacas em lactação devido às vantagens proporcionadas pela gordura frente aos cuidados que uma fêmea em lactação exige para expressar todo seu potencial produtivo. Fornecer gorduras para vacas de alta produção pode trazer inúmeras vantagens além do fornecimento de ácidos graxos essenciais, podendo aumentar a concentração energética da dieta e com isso, aumentar a eficiência líquida do uso de energia em decorrência do menor incremento calórico; aumentar parcialmente a eficiência de produção de leite pela incorporação direta da gordura da dieta à gordura do leite; otimização de consumo de forragem e padrão normal de fermentação ruminal pela substituição parcial de carboidratos prontamente fermentáveis por lipídeos permitindo maior flexibilidade na formulação da dieta; e por último, possibilidade manipulação da composição da gordura do leite com o objetivo de aumentar a aceitação pelo consumidor, o que é possível, dentro de certos limites, ser realizada pela suplementação lipídica (Palmquist & Matos, 2006).

Por outro lado, o uso de lipídeos para ruminantes, em especial para animais em lactação, pode trazer problemas se não for utilizado de forma adequada. Em vários estudos tem sido comprovado que o nível de inclusão de lipídeos acima de determinados limites pode provocar resultados

adversos tanto no desempenho, como no metabolismo do animal. A suplementação lipídica acima de 5% da matéria seca compromete o consumo ou por mecanismos regulatórios que controlam a ingestão de alimentos ou pela capacidade limitada dos ruminantes em oxidar ácidos graxos (Palmquist & Mattos, 2006).

A quantidade de lipídeos a ser utilizada pode variar em função da natureza e forma de apresentação da fonte lipídica. A recomendação geral é que a adição de lipídeos não ultrapasse 6 a 8% na dieta, sendo este o limite para evitar os efeitos negativos dos lipídios. Dhiman & Zaman (2001) recomendam não exceder o limite de 7% de gordura em dietas para vacas leiteiras e relatam que em geral tem-se recomendado a adição de 5% de gordura, sendo de 2% no caso de óleos livres.

Excesso de lipídeos dietéticos pode interferir sobre a fermentação ruminal, especialmente na redução da digestibilidade da fração não lipídica da dieta, acompanhada por biohidrogenação, além de alteração na relação acetato:propionato. A adição de lipídeos dietéticos também pode modificar o metabolismo protéico no rúmen, diminuindo a digestão da proteína e a concentração de nitrogênio amoniacal (Jenkins, 1993; Harfoot & Hazlewood, 1997).

A avaliação dos alimentos visa predizer suas características físicas, químicas e morfológicas, bem como seu comportamento no trato digestível do animal, caracterizando o quanto podem influenciar na degradação e na taxa de passagem da digesta. Orskov e McDonald (1979) constataram que a taxa de remoção da digesta ruminal influencia a extensão da degradação dos alimentos, conseqüentemente, a digestibilidade da dieta e a síntese de proteína microbiana.

O uso elevado de lipídeos, a natureza desses lipídeos e a forma como são fornecidos ao animal, seja na forma livre ou parcialmente protegidos, podem influenciar na taxa de remoção da digesta, levando a todas as alterações acima mencionadas. Deste modo, objetivou-se com este trabalho avaliar a produção e a composição do leite, consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes e cinética de degradação e de trânsito de partículas em vacas recebendo dietas com fontes lipídicas fornecidas de diferentes formas.

1.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Estância dos Buritís, município de Hidrolândia-GO, durante o período de novembro de 2005 a março de 2006.

Foram utilizadas 10 vacas da raça Holandesa, puras e mestiças, com 86 ± 22 dias de lactação, produção de leite média de $29,5 \pm 4,4$ kg e peso médio de 556 ± 55 kg, distribuídas em dois quadrados latino balanceados 5 X 5.

O experimento foi constituído de cinco períodos com duração de 21 dias cada, sendo os quatorze primeiros dias para adaptação às dietas e os demais para coleta de amostras e de dados, onde foram avaliados consumo e digestibilidade aparente da matéria seca e nutrientes, produção de leite e sua composição (sólidos totais, proteína, gordura, lactose e uréia).

Cinco dietas compuseram o experimento, sendo uma dieta controle e mais quatro contendo os mesmos alimentos da dieta controle, porém suplementadas com fontes lipídicas em diferentes formas, ou seja, na forma considerada inerte, com o sabão de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa (¹SCAGCL); na forma livre, com o óleo de soja OS; na forma parcialmente protegida, com o grão de soja cru moído (GS) e na forma protegida, com o grão de soja moído tratado com formaldeído (GSF). O tratamento do grão de soja com formaldeído foi em proporção de 4 mL de formaldeído a 37%/100 g de matéria seca de grão de soja moído. Após a moagem do grão, o formaldeído foi pulverizado sobre uma camada fina de soja moída. Em seguida procedeu-se a mistura do material com auxílio de uma pá e posterior acomodação em tambor, vedado hermeticamente por 24 horas para assegurar proteção. Após este tempo, o material foi retirado e seco ao sol estando então pronto para utilização.

¹ Megalac[®]-E (Church & Dwight, Co.)

As dietas foram formuladas conforme as exigências recomendadas no NRC (2001). Os cálculos foram feitos de modo que as dietas fossem isoprotéicas e apresentassem 5,0% de extrato etéreo nas dietas suplementadas com fontes de lipídeos. Na Tabela 1 é apresentado a composição bromatológica dos ingredientes e suplementos utilizados no experimento. Nas Tabelas 2 e 3 são apresentadas as proporções dos ingredientes utilizados na formulação dos concentrados e a composição bromatológica estimada dos concentrados, respectivamente. Nas Tabelas 4 e 5 são apresentadas as proporções dos ingredientes utilizados nas dietas e a composição bromatológica média das dietas, respectivamente.

Tabela 1 – Composição bromatológica dos ingredientes e suplementos (%MS)

Item	Ingrediente					
	Silagem de Milho	Fubá de milho	Farelo de Soja	Grão de soja	Óleo de Soja	Sais de Cálcio
MS (%)	32,70	88,56	89,23	92,06	100,00	95,00
MO ¹	93,64	98,35	93,65	92,52	100,00	
PB ¹	7,04	11,09	48,96	40,25		
EE ¹	3,02	3,87	1,62	20,17	99,17	85,3
CHOT ¹	83,57	84,56	41,82	32,09		
CNF ¹	30,33	71,63	30,52	17,77		
FDN ¹	56,07	14,34	14,02	21,26		
FDN _c ¹	54,38	13,87	13,42	20,81		
FDN _{cp} ¹	53,24	12,93	11,30	14,32		
FDA ¹	35,82	4,83	8,25	12,51		
NIDN	17,31	9,34	4,39	16,47		
NIDA	12,58	8,47	2,26	7,46		
LDA ¹	5,01	1,83	1,57	2,40		
MM ¹	6,36	1,71	6,52	7,48		14,7
Valor Estimado da Energia						
NDT (%)	56,2	84,92	79,35	98,83	220,88	189,67
EM (Mcal/kg)	2,07	3,33	3,08	3,95	9,39	7,99
EMF (Mcal/kg)	1,74	2,99	2,75	1,69	0,0	0,0
EL (Mcal/kg)	1,39	2,14	1,99	2,51	5,87	5,04

Matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidratos totais (CHOT), carboidratos não-fibrosos (CNF), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas (FDN_c), fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (FDN_{cp}), fibra em detergente ácido (FDA), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), lignina em detergente ácido (LDA) e matéria mineral (MM), nutrientes digestíveis totais (NDT), energia metabolizável (EM), energia metabolizável fermentada (EMF), energia líquida (EL);

¹ % na matéria seca

² % do nitrogênio total

Tabela 2 - Composição dos concentrados experimentais (%MS)

Ingrediente	Concentrado				
	C	SC	OS	GS	GSF
Fubá de milho	63,03	55,53	55,86	58,00	58,00
Farelo de soja	30,08	32,20	31,86	7,50	7,50
Óleo de soja	0,00	0,00	5,24	0,00	0,00
Sais de cálcio	0,00	6,21	0,00	0,00	0,00
Grão de soja	0,00	0,00	0,00	27,24	0,00
Grão de soja + formaldeído	0,00	0,00	0,00	0,00	27,24
Uréia/Sulf. de amônio (9:1)	2,25	2,33	2,30	2,30	2,30
Bicarb. de sódio/Óx. De Mg (2:1)	1,11	1,15	1,14	1,14	1,14
Mistura mineral ¹	3,53	2,58	3,59	3,82	3,82

C= Controle; SC = Sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS = óleo de soja; GS = Grão de soja cru moído, GSF = Grão de Soja moído tratado com formaldeído;

¹ Composição (%): fosfato bicálcico (41,00), calcário (29,00), sal comum (24,70), flor de enxofre (2,54), sulfato de magnésio (1,85), sulfato de cobre (0,037), sulfato de zinco (0,45), outros micronutrientes (0,423)

Tabela 3 – Composição bromatológica dos concentrados utilizados

	Concentrado				
	C	SC	OS	GS	GSF
MS (%)	86,49	87,05	87,34	88,04	88,04
MO ¹	90,07	89,98	89,93	89,22	89,22
PB ¹	27,92	28,44	28,22	27,17	27,17
EE ¹	2,56	7,64	7,54	7,57	7,57
CHO ¹	65,88	60,43	60,56	60,93	60,93
CNF ¹	54,33	49,60	49,73	48,67	48,67
FDN ¹	14,49	14,57	13,81	15,13	15,13
FDN _c ¹	12,78	12,02	12,02	14,72	14,72
FDN _{cp} ¹	11,55	10,82	10,83	12,25	12,25
FDA ¹	5,53	5,34	5,33	6,83	6,83
NIDN ²	7,21	6,60	6,62	10,23	10,23
NIDA ²	6,02	5,43	5,45	7,12	7,12
LIG ¹	1,63	1,52	1,52	1,83	1,83
MM ¹	9,93	9,11	10,06	10,78	10,78
Valor Estimado da Energia					
NDT ¹	77,39	84,48	84,29	82,12	82,12
EM (Mcal/kg)	3,03	3,34	3,34	3,24	3,24
EMF (Mcal/kg)	2,72	2,55	2,55	2,41	2,41
EL (Mcal/kg)	1,95	2,14	2,14	1,76	1,76

C= Controle; SC = Sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS = óleo de soja; GS = Grão de soja cru moído, GSF = Grão de Soja moído tratado com formaldeído;

Matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), carboidratos totais (CHOT), carboidratos não-fibrosos (CNF), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente neutro corrigida para cinzas (FDN_c), fibra em detergente neutro corrigido para cinzas e proteína (FDN_{cp}), fibra em detergente ácido (FDA), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), lignina em detergente ácido (LDA) e matéria mineral (MM), nutrientes digestíveis totais (NDT); , energia metabolizável (EM), energia metabolizável fermentada (EMF), energia líquida (EL);

¹ % na matéria seca

² % do nitrogênio total

Tabela 4 – Composição da dieta (%MS),

Ingrediente	Dieta				
	C	SC	OS	GS	GSF
Silagem de milho	53,40	55,00	55,00	55,00	55,00
Fubá de milho	29,69	25,34	25,27	26,74	26,74
Farelo de soja	13,82	14,33	14,34	3,37	3,37
Óleo de soja	0,00	0,00	2,30	0,00	0,00
Sais de cálcio	0,00	2,70	0,00	0,00	0,00
Grão de soja	0,00	0,00	0,00	11,70	0,00
Grão de soja + formaldeído	0,00	0,00	0,00	0,00	11,70
Uréia/Sulf. de amônio (9:1)	1,01	1,01	1,01	1,01	1,01
Bicarb. de sódio/Óx. De Mg (2:1)	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Mistura mineral ¹	1,58	1,12	1,58	1,68	1,68

C= Controle; SC = Sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS = óleo de soja; GS = Grão de soja cru moído, GSF = Grão de Soja moído tratado com formaldeído;

¹ Composição (%): fosfato bicálcico (41,00), calcário (29,00), sal comum (24,70), flor de enxofre (2,54), sulfato de magnésio (1,85), sulfato de cobre (0,037), sulfato de zinco (0,45), outros micronutrientes (0,423)

Tabela 5 – Composição bromatológica das dietas experimentais

Itens	Dieta				
	C	SC	OS	GS	GSF
MS (%)	57,77	58,03	58,16	58,49	58,49
MO ¹	91,98	91,93	91,91	91,58	91,58
PB ¹	16,77	17,01	16,91	16,42	16,42
EE ¹	2,81	5,17	5,13	5,14	5,14
CHO ¹	75,33	72,79	72,85	73,02	73,02
CNF ¹	41,51	39,31	39,37	38,88	38,88
FDN ¹	36,12	35,76	35,76	37,01	37,01
FDN _c ¹	35,00	34,64	34,64	35,90	35,90
FDN _{cp} ¹	33,82	33,48	33,48	34,14	34,14
FDA ¹	21,71	21,62	21,61	22,31	22,31
NIDN ²	12,60	12,32	12,33	14,01	14,01
NIDA ²	9,53	9,25	9,26	10,04	10,04
LIG ¹	3,44	3,39	3,39	3,53	3,53
MM ¹	8,02	7,64	8,08	8,42	8,42
NDT ¹	66,35	69,66	69,57	68,56	68,56
Valor Estimado da Energia					
NDT ¹	66,35	69,66	69,57	68,56	68,56
EM (Mcal/kg)	2,52	2,66	2,66	2,62	2,62
EMF (Mcal/kg)	2,20	2,12	2,12	2,05	2,05
EL (Mcal/kg)	1,65	1,74	1,74	1,56	1,56
EMF: PB	0,131	0,124	0,125	0,125	0,125

C= Controle; SC = Sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS = óleo de soja; GS = Grão de soja cru moído, GSF = Grão de Soja moído tratado com formaldeído;

Matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), detergente insolúvel em detergente ácido (NIDA), extrato etéreo (EE), carboidratos totais (CHO), fibra em detergente neutro (FDN), carboidratos não-fibrosos (CNF), fibra em detergente ácido (FDA), lignina (LIG), matéria mineral (MM), nutrientes digestíveis totais (NDT), energia metabolizável (EM), energia metabolizável fermentada (EMF), energia líquida (EL);

¹ % na matéria seca

² % do nitrogênio total

Os carboidratos totais (CHOT) foram calculados segundo Sniffen et al. (1992) e Van Soest et al. (1991), respectivamente:

$$\text{CHOT} = 100 - (\% \text{ PB} + \% \text{ EE} + \% \text{ Cinzas})$$

$$\text{CNF} = (100 - (\% \text{ PB} + \% \text{ EE} + \% \text{ Cinzas} + \% \text{ FDNcp})),$$

Os valores de energia dos ingredientes das dietas foram estimados pelas equações propostas pelo NRC (2001). No cálculo do NDT, considerou-se o nível de alimentação (L) de 1x (nível de manutenção), sendo estimado pela equação:

$$\text{NDT} = (\text{PB}_D + \text{CNF}_D + \text{FDN}_D + \text{AG}_D \times 2,25) - 7, \text{ em que:}$$

$$\text{PB}_D = \text{PB} \times \text{Exp}[-1,2 \times \text{PIDA}/\text{PB}] - \text{para volumosos};$$

$$\text{PB}_D = [1 - (0,4 \times \text{PIDA}/\text{PB})] \times \text{PB} - \text{para concentrados};$$

$$\text{CNF}_D = 0,98 \times \text{CNF};$$

$\text{FDN}_D = 0,75 \times (\text{FDNcp} - \text{LDA}) \times [1 - (\text{LDA}/\text{FDNcp})^{0,667}]$; 0,75 = constante de proporcionalidade

$$\text{AG}_D = \text{EE} - 1; \text{ e } 7 \text{ refere-se ao NDT metabólico fecal};$$

Em que PB_D (PB verdadeiramente digestível); CNF_D (CNF verdadeiramente digestível); FDN_D (FDN verdadeiramente digestível); AG_D (AG verdadeiramente digestíveis); LDA (lignina em detergente ácido)

Para o cálculo do valor em NDT dos sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa (Megalac[®] – E) e dos demais suplementos lipídicos, foram utilizados equações específicas do NRC (2001), considerando-se a presença ou ausência de glicerol.

$$\text{NDT} = (\text{EE} \times 0,1) + [(\text{ácido graxo digestível}) \times (\text{EE} \times 0,9) \times 2,25]$$

$$\text{NDT} = (\text{EE} \times \text{DVAG}) \times 2,25$$

Os valores de NDT foram convertidos em energia digestível (ED) e energia metabolizável (EM) utilizando-se as equações sugeridas pelo NRC (2001):

$$\text{ED (Mcal/kg)} = 0,04409 \times \text{NDT}(\%)$$

$$\text{EM (Mcal/kg)} = 1,01 \times \text{ED (Mcal/kg)} - 0,45;$$

A conversão do NDT em energia líquida foi feita pela equação de Moe et al. (1972), que corresponde a energia líquida ao nível de manutenção:

$$\text{EL}_m \text{ (Mcal/kg)} = 0,0266 \times \text{NDT}(\%) - 0,12$$

Para o cálculo da energia metabolizável fermentável (EMF), foi deduzido da EM o valor de 1,4 (MJ/kg) ou 0,3346 (Mcal/kg), de acordo com o AFRC (1993). A estimativa da EMF é necessária, pois os lipídeos não são fontes de energia para os microrganismos. Portanto, para os suplementos lipídeos OS e SCAGCL, o valor de EMF foi considerado zero. Para o cálculo da EMF do grão de soja, o NDT foi estimado considerando-se o grão com 0% de EE.

Para a quantificação da energia das dietas, foram utilizados os valores da digestibilidade aparente obtidos no experimento, segundo Weiss (1999):

$NDT (\%) = PBd + FDNd + CNFd + (EEd * 2,25)$, em que “d” representa a digestibilidade aparente dos componentes.

Devido à utilização de uréia nas dietas, os teores de carboidratos não-fibrosos (CNF), foram estimados segundo Hall (2000):

$$CNF = 100 - [(\%PB - \%PB_{uréia} + \%uréia) + \%EE + \%MM + \%FDN]$$

Os animais foram manejados em baias individuais onde receberam alimentação fornecida duas vezes ao dia, às 7:00 e às 17 horas. A dieta era fornecida em mistura completa, misturando-se manualmente o concentrado ao volumoso. Diariamente foram feitas pesagens das quantidades das dietas fornecidas e das sobras de cada tratamento para estimativa do consumo. Foi feito monitoramento diário do consumo individual a fim de manter as sobras dos alimentos em torno de 10% (MS). No momento da alimentação, durante o período experimental, foram feitas amostragens das dietas e sobras que foram acondicionadas em sacos plásticos e congeladas para posteriores análises.

O preparo das amostras compostas do alimento fornecido e das sobras diárias de cada animal e período experimental e as análises de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), matéria mineral (MM), compostos nitrogenados (N), extrato etéreo (EE) seguiram as especificações descritas por Silva & Queiroz (2002). Fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), segundo Van Soest et al. (1991). Nos alimentos

procedeu-se também as análises de nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA), de acordo com técnicas descritas por Licitra et al. (1996), e de lignina em ácido sulfúrico (LDA), conforme descrito por Pereira & Rossi Jr. (1995).

A quantidade total de matéria fecal excretada, utilizada na determinação da digestibilidade aparente dos alimentos, foi estimada pelas concentrações da fibra em detergente ácido indigestível (FDAi), obtidas após incubação ruminal dos alimentos, sobras e fezes por 240 horas, conforme metodologia descrita por Craig et al. (1984). Foram coletadas cerca de 200 g de fezes por coleta diretamente no reto, no 16 ° e 20 ° dias de cada período experimental, sempre antes das ordenhas da manhã e tarde, sendo as amostras acondicionadas em sacos plásticos devidamente etiquetados e armazenadas em freezer a -15°C. No final do período de coleta, foi feita amostra composta de cada animal com base no peso seco ao ar.

Para a determinação do indicador foi utilizada aproximadamente 1,0 g das amostras dos alimentos, sobras e fezes, moídas em peneiras de 1 mm, as quais foram incubadas em sacos do tipo Ankon[®] no rúmen, ao final de todo o experimento, por um período de 240 horas, segundo adaptação da técnica descrita por Cochran et al. (1986). Após a incubação o material remanescente considerado indigestível, foi submetido à análise de fibra em detergente ácido para utilização desse indicador na estimativa da excreção fecal e, por conseguinte, a digestibilidade aparente dos nutrientes.

As vacas foram ordenhadas mecanicamente, duas vezes ao dia, fazendo-se o registro da produção de leite. Foi coletada amostra de leite, no 17 ° dia, na ordenha da manhã e da tarde, fazendo-se a amostra composta, proporcional à produção de cada ordenha de aproximadamente 300 mL para fins de análise de composição do leite e uréia.

As análises laboratoriais para determinação dos componentes de leite e nitrogênio uréico do leite foram realizadas pelo Laboratório de Análises e Qualidade do Leite da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ-USP), Piracicaba – SP.

A produção de leite corrigida (PLC) para 3,5% de gordura, foi estimada segundo Sklan et al. (1992), pela seguinte equação:

PLC = (0,432 + 0,1625 x % gordura do leite) x produção de leite em kg/dia.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e testes de médias, utilizando-se o procedimento GLM do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 1999), aplicando-se o teste de Tukey para comparação entre as médias e utilizando nível de 5% de significância.

As variáveis foram analisadas segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + Q_i + T_j + (P/Q)_{ik} + (V/Q)_{il} + Q \times T_{ij} + e_{ijkl}$$

Sendo Y_{ijkl} = observação na vaca l , no período k , submetida ao tratamento j , no quadrado latino i ; μ = efeito geral da média; Q_i = efeito do quadrado latino i , sendo $i = 1,2$; T_j = efeito do tratamento j , sendo $j = 1,2,3,4,5$; $(P/Q)_{ik}$ = efeito do período k , dentro do quadrado latino i , sendo $k = 1,2,3,4,5$; $(V/Q)_{il}$ = efeito da vaca l , dentro do quadrado latino i , sendo $l = 1,2,3,4,5$; $Q \times T_{ij}$ = efeito da interação entre o quadrado latino i x tratamento j ; e_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação $ijkl$; $e_{ijkl} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

A taxa de passagem de partículas do concentrado foi estimada utilizando itérbio como marcador, fixado ao farelo de soja (Ellis & Beever, 1984, citados por Pereira, 1992), com algumas modificações. Para a marcação do farelo de soja, procedeu-se à extração dos componentes solúveis, fervendo-se 500 g do alimento por 1 hora em recipiente com capacidade para 15 L, utilizando-se detergente neutro comum, com componente neutro ativo, alquil benzeno sulfonato de sódio na proporção de 100 g do farelo para 20 mL de detergente e para 1,5 L de água. O material resultante foi colocado em saco de tecido de algodão e lavado em água corrente, para remoção dos materiais solúveis e a seguir, seco em bandeja de plástico, em estufa com circulação forçada de ar, a $60 \pm 5^\circ\text{C}$ por 48 horas. A fixação do indicador foi realizada mediante a imersão do farelo de soja por 24 horas em solução acidificada com ácido sulfúrico (pH = 2,5), na proporção de 100 g de MS por litro de solução. A concentração do indicador na solução foi de 20 mg/g de amostra seca a marcar. Logo após, o material foi transferido para saco de tecido de náilon com 100 μm de abertura de poro e lavado em água corrente. Para eliminação do indicador debilmente fixado, a bolsa de tecido de náilon contendo o material foi imersa, por 1 hora, em solução de ácido cítrico, acidificado com ácido sulfúrico (pH = 2,5), que

possui ação quelatante, na base de 0,0136 g/g de alimento a ser marcado com o cloreto de itérbio, em volume de água idêntico ao utilizado na marcação. O excesso do indicador quelatado pelo ácido cítrico foi eliminado por lavagem da bolsa com o material em água corrente, até o clareamento da água. A seguir, procedeu-se à secagem final do alimento marcado em bandeja de plástico, em estufa com circulação forçada de ar, a $60 \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

A taxa de passagem do volumoso foi estimada utilizando Cr-mordante como marcador, fixado à parede celular da silagem de milho, conforme Udén et al. (1980).

Inicialmente, amostras de silagem foram secas em estufa de ventilação forçada a $60 \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 72 horas. A seguir, procedeu-se à fervura, por 1 hora, desse material individualmente, em vasilha metálica (por exemplo, latas de 18 litros), junto com detergente neutro, na proporção de 100 g de amostra seca para 100 mL de detergente e 1 litro de água. Em seqüência a esse procedimento, o material foi filtrado em saco de tecido de algodão e lavado com água corrente de torneira, para remoção dos componentes solúveis e seco a $60 \pm 5^{\circ}\text{C}$, durante 72 horas. A essa fibra, adicionou-se solução de dicromato de sódio ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), contendo quantidade de cromo equivalente a 13% do peso da fibra a ser marcada. Posteriormente, diluiu-se a fibra e o dicromato de sódio em um recipiente de vidro com 5 litros de capacidade, com abertura ampla, contendo água suficiente para que o reagente perfundisse toda a fibra. O recipiente foi coberto com papel laminado e colocado em estufa de ventilação forçada, regulada para 100°C por 24 horas. Em seguida, lavou-se o material em água corrente, para remover o excesso de dicromato, e adicionou-se ácido ascórbico comercial, na quantidade correspondente à metade do peso da fibra, deixando-a em repouso por 1 hora. Finalmente, o material foi envolvido com um saco de pano e lavado repetidas vezes até o completo clareamento da água e seco em estufa de ventilação forçada a $60 \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 72 horas.

As amostras marcadas foram fornecidas às vacas logo após o término do experimento em quadrado latino. As vacas permaneceram nos mesmos tratamentos que estavam no quinto período experimental, perfazendo duas vacas por tratamento, nas quais foram fornecidos 15 minutos antes da

alimentação, via oral, em dose única de 80 e 50 g de fibra marcada com cromo e farelo marcado com itérbio, respectivamente.

A dosagem do cromo e do itérbio foi realizada nas fezes, a partir de amostras coletadas nos tempos zero (imediatamente antes da administração do indicador), 4, 8, 12, 16, 24, 30, 36, 48, 72, 96 e 120 horas após à administração do alimento marcado.

As amostras de fezes relativas aos procedimentos para quantificação de parâmetros da cinética de trânsito foram analisadas quanto aos teores de MS (Silva & Queiroz, 2002) e cromo (Williams et al., 1962). A análise foi feita em espectrofotômetro de absorção atômica, chama de óxido nitroso/acetileno, com comprimento de onda $\lambda = 398,8$ nm e abertura de fenda de 0,2 nm (Huhtanen & Kukkonen, 1995).

Os parâmetros de cinética de trânsito foram estimados por intermédio do ajustamento à curva de excreção fecal do indicador do modelo gama 2 tempo-dependente descrito por Ellis et al. (1994) e analisados segundo delineamento inteiramente casualizado com comparação através do teste de médias.

O tempo médio de retenção rúmen-retículo (TMRR) foi estimado a parti da seguinte equação:

$$\text{TMRR} = N/\text{Lambda} + 1/k_p$$

Em que N é a ordem de dependência do tempo, lambda é o período de latência e K_p é a taxa fracional de degradação média relativa ao fluxo de passagem de partículas pelo rúmen.

As análises de degradabilidade da FDN foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal (DZO/UFV). Foram analisados os alimentos silagem de milho, fubá de milho, farelo de soja, grão de soja moído e grão de soja moído tratado com formaldeído. Alíquotas do alimento (345 mg) foram acondicionados em frascos de vidro de 50 mL de volume total. Em seguida foram adicionados 28 mL de solução tampão de McDougall (MacDougall, 1949), com pH ajustado para 6,8 por intermédio de aspersão com CO_2 . Os frascos foram mantidos em sala climatizada com temperatura constante de 39 °C para prévia hidratação das amostras.

Durante o processo de hidratação foi coletado líquido ruminal de uma vaca recebendo dieta a base de silagem de milho e concentrado e levado

imediatamente para sala climatizada, onde foi devidamente filtrado. Após filtração do líquido ruminal, 7mL foram pipetados em cada frasco, que foram então lacrados. A relação final foi de 100 g de MS/10mL de solução final e 1 mL de inoculo ruminal/4mL de solução tampão. Os frascos foram mantidos a 39°C, sob agitação orbital (40 rpm). Procedeu-se a cada três horas, retiradas dos gases provenientes da fermentação com auxílio de agulhas.

Foram avaliados os tempos 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 72 e 96 horas, sendo três repetições de cada alimento em cada tempo. Ao final de cada tempo de incubação, os frascos foram retirados da sala climatizada e submetidas à filtração em cadinho filtrante sob vácuo. Os cadinhos foram então acondicionados em frascos de polietileno, aos quais adicionou-se 50 mL de solução de detergente neutro (Mertens, 2002). Após serem vedados, os frascos foram autoclavados (105°C/1 hora) de forma a extraírem todos os componentes solúveis em detergente neutro. Após este processo, procedeu-se novamente a filtração sob vácuo e lavagem seqüencial do resíduo com água quente e acetona. A FDN residual foi obtida após secagem em estufa a 105°C com posterior pesagem. Os valores encontrados foram multiplicados por 1000 para que os resultados fossem expressos em g/kg de FDN.

Para estimativa da degradabilidade da FDN, foi feito o ajuste do seguinte modelo (Mertens e Loften, 1980):

$$Y = b + I, 0 \leq t \leq L \text{ e}$$

$$Y = b \cdot e^{-c(t-L)} + I, t > L$$

em que I = fração indegradável; L = duração da fase de latência.

1.3 Resultados e Discussão

O consumo de matéria seca (CMS) e o de matéria orgânica (CMO) foi menor para as dietas suplementadas com fontes lipídicas em relação à dieta controle, independente da natureza da fonte lipídica (Tabela 5). Comportamento semelhante foi observado para os consumos de carboidratos totais (CHO), carboidratos não fibrosos (CNF) e nutrientes digestíveis totais (NDT). Por outro lado, maiores ($P < 0,05$) consumos de extrato etéreo (CEE) foram observados em dietas suplementadas com lipídeos em relação a dieta controle devido à maior porcentagem de extrato

etéreo nestas dietas. O consumo de FDN foi próximo ao valor de 1,2% de FDN em relação ao peso corporal preconizado por Mertens (1994) para que vacas lactantes apresentem consumo ótimo de matéria seca. A dieta contendo sabão de cálcio propiciou o menor ($P < 0,05$) consumo de FDN, provavelmente relacionado ao menor CMS.

Tabela 6 - Consumos médios diários de matéria seca e nutrientes obtidos para as dietas experimentais

Itens	Dietas					CV (%)
	C	SC	OS	GS	GSF	
MS (kg/dia)	17,55 ^a	16,09 ^b	16,24 ^b	16,19 ^b	16,39 ^b	3,37
MS (%PV)	3,21 ^a	2,92 ^b	2,96 ^b	2,97 ^b	3,01 ^b	4,27
MS (g/kg ^{0,75})	155,09 ^a	141,52 ^b	143,16 ^b	143,35 ^b	145,58 ^b	3,93
MO (kg/dia)	15,94 ^a	14,56 ^b	14,70 ^b	14,62 ^b	14,80 ^b	3,38
PB (kg/dia)	2,64 ^a	2,57 ^a	2,40 ^b	2,34 ^b	2,42 ^b	3,67
EE (kg/dia)	0,50 ^b	0,83 ^a	0,80 ^a	0,81 ^a	0,82 ^a	3,73
CHO (kg/dia)	12,88 ^a	11,24 ^b	11,59 ^b	11,56 ^b	11,65 ^b	3,43
FDN (kg/dia)	6,41 ^a	5,97 ^c	6,04 ^{bc}	6,33 ^{ab}	6,12 ^{bc}	3,60
FDN (%PV)	1,17 ^a	1,09 ^c	1,10 ^{bc}	1,16 ^{ab}	1,13 ^{bc}	4,68
CNF (kg/dia)	6,52 ^a	5,31 ^b	5,60 ^b	5,28 ^b	5,58 ^b	4,99
NDT (kg/dia)	12,05 ^a	11,21 ^b	10,60 ^b	10,93 ^b	10,95 ^b	4,23

C= Controle; SC = Sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS = óleo de soja; GS = Grão de soja cru moído, GSF = Grão de Soja moído tratado com formaldeído;

MS (matéria seca); MO (matéria orgânica); PB (proteína bruta); EE (extrato etéreo); CHO (carboidratos totais); FDN (fibra em detergente neutro); CNF (carboidratos não-fibrosos) e NDT (nutrientes digestíveis totais);

Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem ($P > 0,05$) pelo teste Tukey

CV = coeficiente de variação (%)

Allen (2000) afirma que os mecanismos pelo qual a suplementação de gordura na dieta afeta o CMS ainda não está devidamente elucidado, mas há fortes evidências de que o seu efeito 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.

Block et al. (2005) discutem sobre o modelo descritivo para adição de gorduras em dietas para vacas leiteiras, desenvolvido por (Jenkins & Chandler, 1998). No modelo a adição de gordura pode ser dividida em três fases. Na primeira fase, poder-se-ia adicionar qualquer fonte de gordura, mesmo as ruminalmente ativas e obter respostas produtivas positivas sem afetar o consumo à medida que aumenta o nível de energia extra, desde que as fontes de gordura não apresentem baixa digestibilidade. Em algum ponto

a quantidade de ácidos graxos livres atingirá o limite em que a flora ruminal suporta e qualquer adição extra de gordura pode reduzir a funcionalidade microbiana e fermentação ruminal, caracterizando a segunda fase. Nesta fase a gordura adicional leva ao aumento da energia da dieta, mas pode deprimir o consumo de matéria seca pela inibição da digestão da fibra e ou inibição pela estimulação da colescistoquinina (Choi & Palmquist, 1996) e com isso não aumentar a resposta produtiva. A continuação de acréscimos de gordura à dieta levará a terceira fase caracterizada por redução evidente na funcionalidade ruminal e consumo de matéria seca, levando também a queda de produtividade.

Vários autores relatam que o início da depressão no CMS ocorre em níveis de inclusão acima de 5% de lipídeos na dieta. A quantidade a ser suplementada vai depender em parte da natureza da fonte lipídica, ou seja, tamanho da cadeia, grau de insaturação e isomerização das duplas ligações dos ácidos graxos e o grau de proteção desses ácidos graxos em relação ao ataque de microrganismos no rúmen. Dhiman e Zaman (2001) sugerem que por ser rico em ácidos graxos poliinsaturados, óleos vegetais como é o caso do óleo de soja não deve exceder o limite de 2% de inclusão na matéria seca da dieta e no máximo 15% no caso de grãos ricos em óleos. Palmquist e Matos (2006) sugerem os sabões de cálcio como boa alternativa de suplementação lipídica, porém ressaltam que a quantidade e eficácia de utilização desses sabões vai depender do tipo de ácidos graxos que entram na sua composição.

Neste estudo foi observado redução ($P < 0,05$) no CMS de 8,32% em relação à dieta controle com a inclusão de 2,7% de SCAGCL na matéria seca total. Este resultado está de acordo com as estimativas desenvolvidas por Allen (2000) a partir de um levantamento de 24 estudos em que o autor observou queda de aproximadamente 2,5% no CMS para cada 1% de inclusão de sabão de cálcio. Entretanto, Silva et al. (2007), trabalhando com o mesmo produto comercial, não verificaram diferenças no CMS em relação ao controle para um nível de inclusão de 5,05% (6,5% de extrato etéreo) em dietas para cabras em lactação.

Sabões de cálcio contêm lipídeos considerados inertes e embora possam se dissociar no rúmen, geralmente não se observa aumento na

concentração de ácidos graxos livres a ponto de ocasionar efeito deletério sobre o metabolismo microbiano. A maioria dos sabões de cálcio é fabricada a partir do óleo de palma (*Elaeis guineensis*) e este produto parece ter boa aceitação, uma vez que a maior proporção do ácido graxo saturado palmítico (C_{16:0}) nesses sabões não interfere de forma significativa no padrão de fermentação ruminal. Contudo, o sabão de cálcio utilizado neste estudo apresenta elevada participação de ácidos graxos insaturados (Capítulo 2, Tabela 1), que por ser mais dissociáveis, podem interferir no padrão de fermentação ruminal, diminuindo a digestão da fibra levando indiretamente a queda de consumo. Entretanto, a explicação mais adequada para o fenômeno seja provavelmente a regulação fisiológica em resposta à elevada concentração energética da dieta.

Semelhante ao que ocorreu na dieta contendo sabão de cálcio, o nível de inclusão de óleo de soja foi de 2,3% o que acarretou em redução de 7,5% no consumo em relação à dieta controle. Eifert et al. (2006) observaram redução de 13,8% no CMS em dietas suplementadas com 3,93% de óleo de soja. Leite (2006) observou diminuição de consumo nos tratamentos com inclusão de óleo de peixe em relação às dietas contendo óleo de soja, ambos na mesma proporção de 2% de inclusão, discutindo o maior efeito depressor do óleo de peixe em relação ao óleo de soja sobre o consumo, contudo o autor não comparou os CMS das fontes lipídicas em relação a dieta sem inclusão de lipídeos. Silva et al. (2007) também verificaram redução de 14,9% no CMS de cabras suplementadas com 4,5% de óleo de soja na dieta. Os principais efeitos da adição de óleo sobre o consumo estão ligados à alteração da fermentação ruminal (Palmquist, 1994). A redução da digestibilidade da fibra no rúmen acarreta em aumento da massa fibrosa no rumén podendo exercer efeito sobre consumo.

Sementes de oleaginosas têm sido utilizadas com o objetivo de fornecer energia sem, contudo interferir na fermentação ruminal, uma vez que os ácidos graxos são liberados lentamente da matriz do grão permitindo uma biohidrogenação quase completa. O nível de inclusão de soja grão e soja grão tratada com formaldeído foi de 11,7% na matéria seca estando abaixo do valor preconizado por Dhiman & Zaman (2001) de inclusão em até 15%.

Mesmo assim o CMS foi inferior ($P < 0,05$) à dieta controle para os dois tratamentos. Possivelmente a forma física de apresentação da soja grão seja a explicação mais razoável para redução de consumo, uma vez que os grãos de soja foram finamente moídos antes do fornecimento aos animais, expondo os lipídeos da semente ao ambiente ruminal. Soma-se a isto a diminuição parcial de carboidratos disponíveis para fermentação microbiana devido à substituição parcial de carboidratos por lipídeos, conforme valores estimados de EMF (Tabela 5). Tice et al., (1993), Kennelly, (1999) relatam que a fração lipídica das sementes oleaginosas como o grão de soja apresenta altos teores de ácidos graxos insaturados e que o processamento destas sementes, como quebra, esmagamento e moagem aumenta a disponibilidade dos lipídios no rúmen, de tal forma que seus efeitos sobre a fermentação microbiana e composição de ácidos graxos do leite podem ser alterados, contudo os resultados da literatura são controversos.

Faldet e Satter (1991), trabalhando com vacas de alta produção em início de lactação (2ª semana pós-parto até a 17ª semana) não verificaram alteração no consumo de MS para os animais que consumiram dietas contendo 13% de grão de soja. Rabelo et al. (1996) utilizando GS em até 45% da matéria natural (MN) da ração concentrada de vacas em lactação (21,4 kg/dia) não detectaram diferenças para consumo de MS, MO, FDN e respectivos coeficientes de digestibilidade. Entretanto, ao incluírem 30% de GS, na MS da ração concentrada, de vacas em lactação, em substituição parcial do fubá de milho e do farelo de soja, Pereira et al. (1998) constataram que o consumo de MS (13,38 kg/dia) para os animais que receberam GS foi menor que o obtido com as vacas que receberam ração controle. Vargas et. al (2002) trabalhando com vacas em lactação observaram redução de 20% no CMS para um nível de inclusão de 23,7% de grão de soja moído (7% de lipídeos). Resultados semelhantes foram observados por Silva et. al (2007) em cabras em lactação.

O tratamento do GS com formaldeído não evitou a redução de consumo. A principal função do tratamento é a diminuição da degradação da proteína dietética no rúmen, o que indiretamente protege os ácidos graxos da biohidrogenação. Segundo Allen (2000), a proteção de ácidos graxos à biohidrogenação ruminal pode afetar o consumo por meio de maior acesso

ao duodeno de ácidos graxos insaturados, que seriam absorvidos e metabolizados mais rapidamente no fígado, estimulando a liberação de colecistoquinina e de equivalentes redutores, do que ácidos graxos saturados resultantes da biohidrogenação ruminal. Estudos relacionando a utilização de formaldeído na complexação da fonte protéica e consumo são escassos. O foco principal desta técnica tem sido o de elevar indiretamente o teor de alguns ácidos graxos insaturados na gordura do leite (Palmquist e Matos, 2006). Partindo-se do pressuposto que esta técnica é eficiente em proteger os ácidos graxos insaturados da biohidrogenação ruminal via complexação da proteína, pode-se inferir que a queda de consumo esteja mais relacionada à densidade energética da dieta e aos mecanismos fisiológicos de controle de ingestão do que alterações no padrão de fermentação ruminal causados por excesso de ácidos graxos insaturados.

Os resultados de digestibilidade aparente dos nutrientes estão contidos na Tabela 6. Pode-se observar que a dieta com óleo de soja, apresentou o menor ($P < 0,05$) valor de digestibilidade aparente para matéria seca, matéria orgânica, carboidratos totais e fibra em detergente neutro, tanto em relação ao tratamento sem nenhuma fonte adicional de lipídeos, como para as demais fontes lipídicas. A digestibilidade aparente da proteína foi menor ($P < 0,05$) no tratamento contendo GS tratado com formaldeído. Em relação à digestibilidade aparente do extrato etéreo o menor valor foi observado na dieta controle e valores semelhantes entre as fontes suplementares de lipídeos, independente da fonte.

Tabela 7 – Coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes obtidas para as dietas experimentais

Itens	Dietas					CV (%)
	C	SC	OS	GS	GSF	
MS	71,45 ^a	70,29 ^{ab}	66,24 ^c	69,26 ^{ab}	68,80 ^b	12,47
MO	72,64 ^a	70,90 ^{ab}	67,23 ^c	69,91 ^b	69,27 ^{bc}	12,41
PB	67,86 ^{ab}	69,25 ^a	63,69 ^{bc}	67,06 ^{ab}	61,28 ^c	15,28
EE	69,73 ^c	82,34 ^a	75,64 ^b	73,66 ^{bc}	72,97 ^{bc}	15,20
CHO	73,70 ^a	70,52 ^b	67,44 ^c	70,24 ^b	70,70 ^b	12,68
FDN	58,42 ^a	56,13 ^{ab}	47,82 ^c	55,21 ^{ab}	52,45 ^b	15,70
CNF	88,81	86,41	88,82	88,07	90,88	13,76

C= Controle; SC = Sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS = óleo de soja; GS = Grão de soja cru moído, GSF = Grão de Soja moído tratado com formaldeído;

MS (matéria seca); MO (matéria orgânica); PB (proteína bruta); EE (extrato etéreo); CHO (carboidratos totais); FDN (fibra em detergente neutro) e CNF (carboidratos não-fibrosos);

Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem ($P > 0,05$) pelo teste Tukey

CV = coeficiente de variação (%)

Segundo Jenkins & Jenny (1989), a adição de suplementos lipídicos diminui ou tem pequeno efeito na digestibilidade da matéria seca. Bateman & Jenkins (1998) não constataram efeitos da inclusão de até 8% de óleo de soja sobre a digestibilidade aparente da MS, MO, PB e FDN e concluíram que grandes quantidades podem ser suplementadas sem efeito deletério sobre a digestibilidade, mesmo sendo lipídeos não protegidos. Em trabalhos mais recentes também não foram observadas diferenças na digestibilidade aparente da matéria seca quando diferentes fontes de lipídeos foram suplementadas (Eifert et al., 2005; Leite 2006; Silva et. al, 2007).

No entanto, em vários estudos têm sido observado redução na digestibilidade da fibra quando dietas são suplementadas com fontes lipídicas, e que a magnitude de redução está relacionada não só à quantidade, mas principalmente ao tipo de ácido graxo presente no suplemento, sendo que lipídeos ricos em ácidos graxos insaturados tendem a provocar maior depressão na digestibilidade (Doreau & Chilliard, 1997). Os lipídeos da dieta diminuem a digestibilidade da fibra, ou por formar uma película que recobre a partícula de alimento, impedindo a adesão microbiana, ou por efeito tóxico direto sobre as bactérias celulolíticas (Jenkins, 1993). No presente estudo, o menor valor de digestibilidade aparente da MS, MO e FDN para as dietas em que o óleo de soja foi utilizado reforçam o que foi discutido, visto que o óleo de soja apresenta elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), como também o SC, porém no caso do OS, estes se encontram na forma completamente livre. Das demais fontes lipídicas, a dieta contendo GSF, embora apresentando maior coeficiente de digestibilidade da MS e FDN em relação a dieta com óleo de soja, foi menor do que a dieta controle (52,45 X 58,42), o que não ocorreu com a dieta contendo GS. Esperava-se valores semelhantes de digestibilidade aparente da MS e FDN entre as duas dietas (GS e GSF) e destas em relação ao controle devido a presença de fibra na semente, considerada de mais fácil digestão do que a fibra das forrageiras.

O menor valor de digestibilidade aparente da fibra na dieta GSF em relação à dieta controle pode estar relacionado ao menor valor de digestibilidade da proteína desta dieta em relação às demais. Neste caso, além do possível efeito dos lipídeos sobre os microrganismos, pode ter

havido limitação de nitrogênio para crescimento microbiano em função da complexação do formaldeído com a proteína dietética. Enjalbert et al. (1998), afirmaram que, independente da forma de suplementação lipídica, os ácidos graxos parecem não influenciar na digestibilidade aparente da proteína. Silva et al. (2007) observaram redução nos coeficientes de digestibilidade aparente da proteína com inclusão de fontes lipídicas em dietas de cabras em lactação e postularam que a inclusão de óleo propicia um maior escape de proteína dietética, pelo efeito inibitório do óleo sobre a população de protozoários, diminuindo o teor de amônia, aumentando o fluxo de bactérias para o intestino, e desta forma promovendo maior participação de nitrogênio alimentar no material fecal, reduzindo o coeficiente de digestibilidade aparente da proteína.

O coeficiente de digestibilidade aparente do extrato etéreo foi maior ($P < 0,05$) para a dieta com sabão de cálcio (SC) e menor para os tratamentos GS, GSF e controle. Embora a técnica de estimativa de ácidos graxos pela extração em éter seja imprecisa, por haver contaminação de outras substâncias solúveis em éter, como ceras e pigmentos (Van Soest, 1994), a maior digestibilidade verificada na dieta com SC pode ser atribuída ao efeito de diluição destas substâncias e à maior digestibilidade intestinal dos ácidos graxos que compõem o sabão de cálcio. Especificamente este SC apresenta maior proporção de ácidos graxos insaturados em relação a outros sabões. Apesar de ser rico em ácidos graxos poliinsaturados, a dieta com óleo de soja apresentou menor valor de digestibilidade de EE em relação à dieta com sabão de cálcio, teoricamente, por sofrer maior biohidrogenação ruminal, elevando o teor de ácidos graxos saturados que chegam ao intestino.

As respostas em produção e composição do leite são apresentadas na Tabela 8. Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre as dietas em relação à produção de leite e ao teor de lactose. Porém, quando foi feita a correção para o teor de gordura do leite, as dietas controle e com SG não diferiram e foram maiores ($P < 0,05$) às dietas com OS, SC e GSF.

Tabela 8 – Produção diária de leite (PL), produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLC) e componentes do leite obtidas para as dietas experimentais

Parâmetros	Dietas					CV
	C	SC	OS	GS	GSF	
PL (kg/vaca)	23,40	22,40	22,96	22,14	21,78	6,32
PLC (kg/vaca)	21,59 ^a	18,41 ^b	19,70 ^b	20,21 ^{ab}	19,45 ^b	8,06
G (%)	3,08 ^a	2,49 ^c	2,68 ^{bc}	3,06 ^a	2,93 ^{ab}	9,74
PROT (%)	3,14 ^a	3,13 ^a	3,13 ^a	3,07 ^{ab}	2,98 ^b	2,98
LAC (%)	4,42	4,37	4,26	4,38	4,35	2,65
ST (%)	11,61 ^a	10,83 ^b	10,93 ^b	11,35 ^{ab}	11,08 ^{ab}	3,96
G (kg)	0,71 ^a	0,55 ^c	0,61 ^{bc}	0,67 ^{ab}	0,63 ^{ab}	9,70

C= Controle; SC = Sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS = óleo de soja; GS = Grão de soja cru moído, GSF = Grão de Soja moído tratado com formaldeído;

G (gordura do leite), PROT (proteína do leite), LAC (lactose do leite) e ST (sólidos totais do leite);

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

Somente as dietas controle e com GS apresentaram teor de gordura acima do limite mínimo de 3% estabelecido na Instrução Normativa nº 51 (Brasil, 2002). Outro ponto que chama a atenção é a inversão na relação gordura/proteína em algumas dietas. Estes fatos podem estar associados à elevada temperatura na região, que apesar de não ter sido mensurada durante o estudo, era sentido o desconforto térmico. Elevadas temperaturas estão associadas à depressão de gordura do leite, além da inversão na relação gordura/proteína. Menores teores de gordura foram observados nas dietas contendo OS e SC.

Eifert et al. (2005), trabalhando com nível de inclusão de 4% de OS, também verificaram efeito depressor no teor de gordura do leite (2,89% vs 3,57 do controle).

As respostas positivas sobre a produção de leite são obtidas geralmente com a utilização de gorduras inertes à função ruminal, sobretudo as saturadas, que também apresentam pouca influência sobre o consumo. Quando óleos vegetais são fornecidos, há freqüente redução no consumo (Allen, 2000). O não efeito da suplementação lipídica sobre a produção de leite pode estar ligado ao estágio de lactação das vacas uma vez que de modo geral tem-se observado em diversos trabalhos, resultados mais significativos em vacas no início da lactação e em balanço energético negativo. O menor consumo das dietas com suplementação lipídica não afetou a produção de leite e isto pode ter ocorrido pela maior concentração

energética destas dietas, o que compensou a queda de consumo. Outro ponto relevante é que no caso do presente trabalho a participação do concentrado foi elevada, o que pode influenciar na resposta à suplementação lipídica.

Houve maiores depressões nos teores de gordura nas dietas com óleo de soja, fonte rica em poliinsaturados e o sabão de cálcio, que no caso específico desse produto apresenta maior concentração de ácidos graxos insaturados do que os sabões de cálcio tradicionais. O fornecimento de lipídeo na dieta, de maneira geral tende a deprimir os teores de gordura do leite. A magnitude desse efeito depressor está em função principalmente da quantidade e do tipo de lipídeo utilizado. Os lipídeos poliinsaturados ou ricos em ácidos graxos do tipo *trans* (óleos vegetais e óleo de peixe) são os que tem maior efeito depressor no teor de gordura do leite. O aporte desses lipídeos na dieta tem um efeito direto sobre a fermentação ruminal, com mudanças da flora celulolítica, diminuindo a digestibilidade da fibra. Em resposta ocorre redução na produção de ácidos graxos voláteis em particular o acetato em relação ao propionato. Ao mesmo tempo, essas mudanças podem gerar intermediários da biohidrogenação, como o C_{18:1} *trans*-10 e o CLA *trans*-10, *cis*-12 que comprovadamente inibem enzimas chave envolvidas na síntese *de novo* de ácidos graxos de cadeia curta e média na glândula mamária (Baumgard et al., 2002).

Com relação ao teor de proteína do leite observou-se menor valor (P<0,05) para a dieta com GSF. A adição de lipídeos à dieta do animal normalmente diminui a porcentagem de proteína no leite em 0,1 a 0,3 unidades percentuais ou cerca de 0,07% para cada 450g de lipídeo adicionado. Segundo Palmquist & Weiss (1994), uma explicação para tal fato é que os microrganismos do rúmen não são hábeis em utilizar lipídeo como fonte de energia para seu crescimento, afetando a síntese de proteína microbiana, e conseqüentemente, o fornecimento de aminoácidos para a composição da proteína do leite. Garnsworthy (2002) comenta que entre algumas teorias, a deficiência de glicose seria mais plausível explicação para depressão da proteína do leite em dietas suplementadas com fontes lipídicas e recomenda que em situações de suplementação lipídica nas dietas para vacas leiteiras, as exigências em proteína metabolizável sejam

aumentadas para evitar depressão no teor de proteína no leite. No presente estudo, como não houve diferenças entre os teores de proteína para as demais dietas suplementadas com fontes lipídicas, pode-se inferir que o menor teor de proteína no leite de vacas alimentadas com GSF seja devido à baixa disponibilidade de aminoácidos que chegam à glândula mamária para síntese de proteína do leite. A redução da disponibilidade desses aminoácidos pode ser em função da diminuição da síntese de proteína microbiana no rúmen ou principalmente à complexação do formaldeído com a proteína dietética para diminuir a degradação ruminal, mas que pode ter indisponibilizado parte desta proteína também para o animal, esta hipótese é reforçada pelo menor valor de digestibilidade encontrado para este tratamento.

Os valores estimados para taxa de passagem (Kp) e o tempo médio de retenção no rumén-retículo (TMRR) tanto para partículas de volumoso quanto para partículas de farelo de soja podem ser observadas na Tabela 9. Os valores de Kp e TMRR foram semelhantes ($P>0,05$) entre as dietas para as partículas do volumoso e de farelo de soja.

Tabela 9 - Dinâmica de passagem de partículas obtidas para as dietas experimentais

Parâmetro	Dieta					CV (%)
	C	SC	OS	GS	GSF	
Dinâmica de passagem de partículas do volumoso						
Kp (h^{-1})	0,0544	0,0595	0,0370	0,0524	0,0550	20,41
TMRR	34,26	36,72	46,45	40,53	35,43	11,33
Dinâmica de passagem de partículas do Farelo de soja						
Kp (h^{-1})	0,0795	0,0591	0,0516	0,0561	0,0758	17,50
TMRR	22,70	24,79	26,11	29,34	23,54	8,31

C= Controle; SC = Sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS = óleo de soja; GS = Grão de soja cru moído, GSF = Grão de Soja moído tratado com formaldeído;

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância

A taxa fracional de degradação média relativa ao fluxo de passagem de partículas pelo rúmen foi de 0,05 e 0,06 h^{-1} , para o volumoso e para o farelo de soja, respectivamente, com exceção da dieta com óleo de soja, que deprimiu o Kp (0,0370) do volumoso. Embora não significativo, o menor valor

numérico da Kp aliado ao maior TMRR para a dieta com óleo de soja, leva a inferir que o óleo, rico em ácidos graxos poliinsaturados, sem nenhuma proteção pode ter inibido a ação dos microrganismos que degradam fibra, tanto pelo efeito tóxico, quanto pela barreira física que o lipídeo provoca ao envolver a fibra (Palmquist e Matos, 2006). Deste modo, maior tempo a digesta permanecerá no rúmen e tendem a deprimir o consumo pelo enchimento ruminal.

Silva et al. (2007) observaram menor valor de Kp quando utilizaram grão de soja em relação ao óleo de soja e sabão de cálcio para cabras leiteiras e atribuíram o resultado ao teor de fibra contido na casca do grão. Chalupa et al. (1986) relacionaram consumo de matéria seca, taxa de passagem e matéria seca no rúmen e observaram aumento de matéria seca ruminal com a inclusão de ácidos graxos de cadeia longa, porém não observaram efeito sobre a taxa de passagem.

Na Tabela 10 encontram-se os valores médios estimados da porção indegradável (I), o período de latência (L) e a taxa de degradação da FDN (K) para os alimentos utilizados no presente estudo. Maior tempo de latência foi observado para silagem de milho devido ao maior tempo de colonização da microbiota ruminal na fração fibrosa.

Tabela 10 – Parâmetros de degradação da FDN dos alimentos utilizados no estudo

Alimento	Parâmetro		
	I	L	K
SM	61,5 ± 5,8	10,4 ± 0,8	0,0336 ± 0,0041
FM	4,5	6,7 ± 0,8	0,0538 ± 0,0062
FS	2,5	1,5 ± 0,3	0,0743 ± 0,0035
GS	28 ± 2,1	-----	0,1952 ± 0,0166
GSF	15,3 ± 2,1	3,6 ± 0,2	0,0981 ± 0,0038

SM = silagem de milho, FM = fubá de milho, FS = farelo de soja, GS = grão de soja, GSF = Grão de soja complexado com formaldeído; I = porção indegradável (g /kg de FDN), L = Tempo de latência (horas), K = taxa de degradação (h⁻¹),

Vale ressaltar a elevada velocidade de degradação da fibra do grão de soja e em função disto, elevadas quantidades de energia no rúmen provenientes de lipídeos podem acarretar em desincronização da liberação entre proteína e energia, pois a rápida liberação de nitrogênio não seria

acompanhada pela obtenção de energia proveniente de carboidratos de fácil fermentação, levando a perdas de nitrogênio.

Outro ponto importante a destacar é que o tratamento do grão de soja com formaldeído resultou em diminuição acentuada da taxa de degradação. A soja grão crua foi rapidamente degradada, de modo que não houve período de latência. Não foi possível neste ensaio estimar a taxa de degradação da proteína, mas pelo resultado da taxa de degradação da FDN é possível inferir que a complexação do formaldeído com a matriz protéica do grão foi efetiva em oferecer proteção contra degradação por microrganismos. Stern et al. (1985) em teste comparando a degradabilidade *in situ* da fração protéica do farelo de soja, do grão de soja crua (GS) e do grão de soja extrusado (GSE) a 132 ou a 149°C observou que a PB do GS nas primeiras horas mostrou ser degradada mais rápida que a PB do farelo de soja, com essa diferença desaparecendo no decorrer do tempo. Ao final de 24 h de incubação ruminal a PB do GSE foi a mais resistente a degradação microbiana, concluindo que o tratamento do grão de soja é efetivo em evitar degradação.

1.4 Conclusões

A suplementação das dietas com gordura no nível de 5% deprime o consumo de matéria seca e de nutrientes, mas não influencia a produção de leite das vacas de alta produção no terço médio da lactação, independente se suplementada na forma livre ou com variado grau de proteção. Fontes de lipídeos ricas em ácidos graxos poliinsaturados na forma livre, como o óleo de soja afetam a produção de gordura do leite. Sabões de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa não foram efetivos em manter teores adequados de gordura do leite, levando a inferir que ocorra dissociação em nível ruminal.

1.5 Referências Bibliográficas

- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. AFRC **Energy and Protein Requirements of Ruminants**. Wallingford, UK: CAB international, 159 p., 1993.
- ALLEN, M.S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 83, p. 1598 – 1624, 2000.
- BAUMGARD, L.H., CORL, B.A., DWYER, D.A., SAEBO, A., BAUMAN, D.E., Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **Animal Journal Physiology**. 278, p. 178-184, 2002.
- BLOCK, E., CHALUPA, W., EVANS, E. et al. Calcium salts are highly digestible. **Feedstuffs**, v. 77, nº 30, p 1 – 7, 2005.
- BRASIL, Leis, decretos, etc. Instrução Normativa Nº 51 de 18 de setembro de 2002 da Secretaria de defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial** (República Federativa do Brasil) Brasília, p. 7-12, Jun/2002.
- CHALUPA, W., VECCHIARELLI, B., ELSER, A.E. et al. Ruminant fermentation in vivo as influenced by long chain fatty acids. **Journal of Dairy Science**, v.69, p. 1293 – 1301, 1986.
- COCHRAN, R.C., ADAMS, D.C., WALLACE, J.D. et al. Predicting digestibility of different diets with internal markers: evaluation of four potential markers. **Journal of Animal Science**, v. 63, p. 1476 – 1483, 1986.
- CRAIG, W. M., HONG, B. J., BRODERICK, G. A et al. In vitro inoculum enriched with particle associated microorganisms for determining rates of fiber digestion and protein degradation. **Journal of Dairy Science**, v. 50, n. 4, p. 523-526, 1984.
- DHIMAN, T.R., ZAMAN, M.S. Manipulação das dietas de vacas em lactação com o objetivo de agregar valor ao leite. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO DE GADO DE LEITE. **Anais...**, Belo Horizonte-MG, 2001.
- DOREAU, M., CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, v. 78, suppl 1, p. 15 – 35, 1997.
- EIFERT, E.C., LANNA, R.P., LEÃO, M.I., et al. Efeito da combinação de óleo de soja e monensina na dieta sobre o consumo de matéria seca e a digestão de vacas lactantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 297 – 308, 2005.

- EIFERT, E.C., LANA, R.P., LANNA, D.P.D. et al. Consumo, produção e composição do leite de vacas alimentadas com óleo de soja e diferentes fontes de carboidratos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n.1, p. 211 – 218, 2006
- ELLIS, W.C., MATIS, J.H., HILL, T.M. et al. Methodology for estimating digestion and passage kinetics of forages. In: **FAHEY JR, G.C. (ED) Forage quality, evaluation and utilization**. Wisconsin: American Society of Agronomy, p. 682 – 756, 1994.
- ENJALBERT, F., NICOT, M.C., BAYOURTHE, C. et al. Effects of dietary calcium soaps of unsaturated fatty acids on digestion, milk composition and physical properties of butter. **Journal of Dairy Research**, v. 64, p. 181 – 195, 1997.
- FALDET, M.A., SATTER, L.D. Feeding heat-treated full fat soybeans to cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**. 74(9):3047-3054, 1991.
- GARNSWORTHY, P.C. **Fat in dairy cow diets**. In: Recent Developments in Ruminant Nutrition 4, J. Wiseman, PC Garnsworthy, Nottingham University Press, 600p, 2002.
- HALL, M. B. Neutral detergent-soluble carbohydrates: nutritional relevance and analysis. **A laboratory manual**. University of Florida Cooperative Extension Bulletin 339, 2000.
- HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. Hobson e Stewart, editores. Glasgow: Blackie Academic & Professional. p.382-426. 1997.
- HUHTANEN, P., KUKKONEN, U. Comparison of methods, markers, sampling sites and models for estimating digesta passage kinetics in cattle fed at two levels of intake. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v.52, n.1/2, p.141-158, 1995.
- JENKINS, T. C.; JENNY, B. F. Effect of hydrogenated fat on feed intake, nutrient digestion, and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p.2316-2324, 1989.
- JENKINS, T.C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science** v.76 , n.12, p.3851- 3863. 1993.
- KENNELLY, J.J. The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. **Animal Feed Science and Technology**. v. 60, p.137-152, 1999.
- LEITE, L.C. **Perfil dos ácidos graxos do leite e metabolismo de lipídios no rúmen de vacas recebendo dietas com alto ou baixo teor de concentrado e óleo de soja ou de peixe**. Piracicaba – ESALQ, (Tese de doutorado), 97p., 2006.

- LICITRA, G.; HERNANDEZ, T. M.; VAN SOEST, P. J. Standardization of procedures for nitrogen fractionation of ruminants feeds. **Animal Feed Science and Technology**, v.57, p. 347 – 358, 1996.
- McDOUGALL, E.I. Studies on ruminal saliva. I. The composition and output of sheep's saliva. **Biochemistry Journal**, v. 43, p. 99 –109, 1949.
- MERTENS, D.R., LOFTEN, J.R. The effect of starch on forage fiber digestion kinetics in vitro. **Journal of Dairy Science**, 63:1437-1446, 1980.
- MERTENS, D.R. Regulation of forage intake. In: FAHEY JR, G.C. (Ed.) **Forage quality, evaluation and utilization**. Wisconsin: American Society of Agronomy, p.450-493, 1994.
- 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.
- MOE, P. W.; FLATT, W. P.; TYRREL, H. F. Net energy value of feeds for lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 55, p. 945, 1972.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Nutrient of requirements of dairy cattle**. 7. ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 362p., 2001.
- ORSKOV, E.R., McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal Agriculture Science**, Cambridge, v.92, n.2, p.499-503, 1979.
- PALMQUIST, D.L.; WEISS, W.P. Blood and hydrolyzed feather meals as source of undergradable protein in high fat diets for cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**. v. 77, n. 6, p. 1630-1651, 1994.
- PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. **Metabolismo de lipídeos**. In: Nutrição de Ruminantes, Telma Teresinha Berchielli, Alexandre Vaz Pires, Simone Gisele de Oliveira (Ed.) – Jaboticabal: Funep, 583 p., 2006.
- PEREIRA, J.C. **Degradación ruminal de diversos subproductos agroindustriales**. Madrid: UPM, 1992. 223p. Tesis (Doctorado en Producción Animal) – Universidad Politécnica de Madrid, 1992.
- PEREIRA, J. R. A; ROSSI JR., P. **Manual práctico de avaliação de alimentos**. Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiróz, 25 p., 1995.
- PEREIRA, C.M.A., COELHO DA SILVA, J.F., VALADARES FILHO, S.C., et al. Grão de soja moído na ração de vacas em lactação. 1. Consumo e digestibilidade dos nutrientes. **Revista Brasileira de Zootec.** 27(6):1218-1224, 1998.

- RABELLO, T.G. **Grão de soja moído na alimentação de vacas em lactação**. Viçosa, MG:UFV, 1995. 114p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A C. **Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos**. 3ª ed. Viçosa- MG: UFV, 235 p., 2002.
- SILVA, M.M.C., RODRIGUES, M.T., BRANCO, R.H. et al. Suplementação de lipídios em dietas para cabra em lactação: consumo e eficiência de utilização de nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.1, p. 257 –267, 2007.
- SKLAN, D., ASHKENAZI, R., BRAUN, A et al. Fatty acids, calcium soaps of fatty acids and cottonseeds fed to high yielding cows. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 9, p. 2463-2472, 1992.
- SNIFEN, C. J.; O'CONNOR, J. D.; VAN SOEST, P. J. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate end protein availability. **Journal of Animal Science**, v.70, p. 3562-3577, 1992.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS. **User's Guide: Statistics**. Version 8.0. NC: SAS INSTITUTE, 1999.
- STERN, D.M., SANTOS, K.A., SATTER, L.D. Protein degradation in rumen and amino acid absorption in small intestine of lactating dairy cattle fed heat-treated whole soybeans. **Journal of Dairy Science**. 68(1):45-56, 1985.
- UDÉN, P., COLUCCI, P.E., VAN SOEST, P.J. Investigation of chromium, cerium and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. **Journal of Science Food and Agricultural**, v.31, n.7, p.625-632, 1980.
- TICE, E.M., EASTRIDGE, M.L., FIRKINS, J.L. Raw soybeans and roasted soybeans of different particle sizes. 1. Digestibility and utilization by lactating cows. **Journal of Dairy Science** 76(1):224-235, 1993.
- VAN SOEST, P. J.; ROBERTSON, J. B.; LEWIS, B. A. Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 3583 – 3597, 1991.
- VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell, 476p., 1994.
- VARGAS, L.H.; LANA, R.P., JHAM, G.N. et al. Adição de lipídeos na ração de vacas leiteiras: Parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 522 – 529, 2002.

WEISS, W. P. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURERS, 61, 1999, **Proceedings**, Ithaca: Cornell University, p. 176-185, 1999.

WILLIAMS, C.H., DAVID, D.J., IISMAA, O. The determination of chromic oxide in faeces samples by atomic absorption spectrophotometry. **Journal Agriculture Science**, Cambridge, v.59, n.3, p.381-385, 1962.

Capítulo 2

Perfil de ácidos graxos e ácido linoléico conjugado na gordura do leite de vacas recebendo rações com diferentes fontes lipídicas

2.1 Introdução

Tem-se buscado aumentar a concentração energética da dieta de vacas em lactação através da suplementação lipídica, sem interferir no padrão de fermentação ruminal e ao mesmo tempo aumentar a participação de ácidos graxos insaturados, especialmente o ácido linoléico conjugado (CLA) em produtos como o leite e derivados, devido aos possíveis efeitos benéficos na saúde humana. A implicação imediata passa pelo fato de que para os ácidos graxos insaturados serem incorporados na gordura do leite ou carne, eles têm que escapar parcial ou totalmente do processo de biohidrogenação. Assim atenção está sendo dada à proteção dos lipídeos contra a completa biohidrogenação ruminal.

Bauman & Lock (2006) discutiram sobre três fatores que podem contribuir para elevar os teores de CLA no leite, sendo eles o aumento de ácidos graxos poliinsaturados de C₁₈ (ácido linoléico e linolênico); manutenção do processo de biohidrogenação, porém com inibição do último passo do processo, resultando na produção de ácido vaccênico como intermediário e aumento na atividade da enzima Δ^9 dessaturase na glândula mamária.

Entretanto, quando se busca o aumento da concentração de CLA no leite através da adição de fontes de gordura poliinsaturadas, juntamente com elevadas proporções de concentrado na dieta de vacas leiteiras, geralmente tem levado a resultados negativos no teor de gordura do leite. A depressão da gordura do leite está relacionada à diminuição da síntese de lipídeos na glândula mamária e alteração no perfil de ácidos graxos do leite, com redução de ácidos graxos de cadeia curta e aumento do C18:1 *trans*-10 (Griinari et al., 1998). Posteriormente foi comprovado que o CLA *trans*-10,

cis-12 é o maior responsável pela redução do teor de gordura do leite nestas condições (Baumgard et al., 2002).

Palmquist & Matos (2006), ao discutirem sobre sabões de cálcio de ácidos graxos, relatam que erroneamente esses sabões são chamados de gordura protegida. Eles afirmam que não são nem gorduras protegidas e nem *by pass*, uma vez que se misturam ao conteúdo ruminal e seus ácidos graxos são biohidrogenados. Eles recomendam que os sabões de cálcio sejam apropriadamente chamados de “inertes”, por não interferirem com a atividade microbiana no rúmen. Os sabões de cálcio mais comuns são originados de óleo de palma, apresentando maior proporção de ácido palmítico. Embora estes sais de cálcio se dissociem no rúmen, não se observa aumento na concentração de ácidos graxos não-esterificados em nível suficiente para interferir no metabolismo microbiano. Sabões de cálcio ricos em ácidos graxos de cadeia longa e insaturados são mais dissociáveis e biohidrogenados mais intensamente que os sabões derivados do óleo de palma, e existem controvérsias quanto à sua eficácia como suplemento (Palmquist & Matos, 2006).

Óleos vegetais, animais ou mistura de ambos têm sido testado intensamente com o objetivo de aumentar ácidos graxos insaturados na gordura de ruminantes. Entretanto, as respostas são variadas em função da composição dos ácidos graxos do suplemento, da quantidade fornecida ao animal, e da extensão de biohidrogenação, uma vez que esses ácidos graxos não contam com nenhum tipo de proteção. Ácidos graxos insaturados podem escapar parcial ou totalmente da biohidrogenação por um possível excesso desses ácidos, por inibição do crescimento microbiano ou das enzimas envolvidas na biohidrogenação.

Os grãos ricos em óleos podem oferecer alguma proteção contra biohidrogenação ruminal quando fornecidos intactos ao animal. Porém, esta proteção parece ser limitada e os resultados práticos variáveis. Dhiman et al. (2005) sugeriram que sementes de oleaginosas inteiras são menos efetivas em promover aumento do conteúdo do CLA na gordura do leite do que óleos livres e atribuiu ao fato de que os ácidos graxos insaturados do óleo estão mais disponíveis para biohidrogenação do que nas sementes. Já Demeyer e Doreau (1999) relatam limitada capacidade de proteção dos grãos,

processados ou não e pouco eficientes em promover proteção contra biohidrogenação.

Os métodos químicos ou físicos têm sido bastante utilizados para proteção de alimentos contra alterações ruminais, como por exemplo, a biohidrogenação. O tratamento de proteína dietética com aldeído fórmico foi durante muito tempo a técnica mais utilizada para diminuição da degradação protéica, o que indiretamente impedia a biohidrogenação dos ácidos graxos dessas fontes protéicas. Essa técnica, porém não vem sendo muito utilizada pelo fato de ser de alto custo, pelo fato do aldeído fórmico ter restrição de uso em vários países, produzir resultados inconsistentes e na maioria das vezes não ser interessante para a indústria, principalmente de lácteos, onde o produto final pode apresentar baixa estabilidade oxidativa em virtude dos elevados teores de ácido linoléico no leite, dependendo da fonte suplementar de gordura na dieta. Por outro lado, se bem empregada, esta técnica pode trazer bons resultados em termos de manipulação de gordura em ruminantes, principalmente no leite (Palmquist e Mattos 2006).

Embora seja possível manipular a gordura do leite no sentido de produzir leite com uma proporção mais alta de ácidos graxos saudáveis e com isso agregar valor ao produto, existe muita variação de resposta ao uso de fontes lipídicas na dieta e, portanto, muito ainda deve ser feito em pesquisa para obtermos resultados consistentes. Assim, objetivou-se com este experimento avaliar o perfil de ácidos graxos e o teor de ácido linoléico conjugado na gordura do leite de vacas recebendo dietas suplementadas com fontes lipídicas na forma livre, inerte, parcialmente protegida ou protegida.

2.2 Material e Métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Estância dos Buritís, município de Hidrolândia-GO, durante o período de novembro de 2005 a março de 2006.

Foram utilizadas 10 vacas da raça Holandesa, puras e mestiças, com 86 ± 22 dias de lactação, produção média diária de $29,5 \pm 4,4$ kg e peso

médio de 556 ± 55 kg, distribuídas em dois quadrados latino balanceados 5 X 5.

O experimento foi constituído de cinco períodos com duração de 21 dias cada, sendo os quatorze primeiros dias para adaptação e os demais para coleta de dados.

Cinco dietas compuseram o experimento, sendo uma dieta controle e mais quatro contendo os mesmos alimentos da dieta controle, porém suplementadas com fontes lipídicas em diferentes formas, ou seja, na forma considerada inerte, com o sabão de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa (¹SCAGCL); na forma livre, com o óleo de soja OS; na forma parcialmente protegida, com o grão de soja cru moído (GS) e na forma protegida, com o grão de soja moído tratado com formaldeído (GSF). Os procedimentos relacionados ao balanceamento das dietas experimentais e do manejo alimentar estão descritos no Capítulo 1.

As vacas foram ordenhadas mecanicamente, duas vezes ao dia, fazendo-se o registro da produção de leite. No 18º dia do período experimental, uma alíquota de 2% da produção de leite foi retirada e congelada para posterior extração da gordura do leite para análise do perfil de ácidos graxos segundo metodologia descrita por Feng et al. (2004). Alíquotas de 30 mL foram centrifugadas a $17.800 \times G$ por 20 minutos a $4^\circ C$ (HIMAC-CR21) formando um creme de leite sobrenadante (*fat cake*), o qual foi retirado ainda congelado com auxílio de palhetas plásticas. Aproximadamente 1 g de *fat cake* foi transferido para tubos tipo “*ependorfs*” de 1,5 mL e centrifugados a $17.500 \times G$ por 20 minutos em temperatura ambiente (centrífuga Force 14 – Denver Instrument Company) Após a centrifugação, a fração lipídica permaneceu na parte superior do tubo onde foi retirada através de micropipetas e acondicionadas em *ependorfs* de 1 mL, que foram congelados a $-10^\circ C$ até a etapa de preparação dos ésteres metílicos.

¹ Megalac®-E (Church & Dwight, Co.)

A preparação dos ésteres metílicos foi realizada por meio da modificação do método proposto por Hartman e Lago (1986). Alíquotas de 40 µL da gordura foram transferidas para tubos de ensaio com tampa rosqueada. Os lipídeos foram hidrolisados com adição de 2,5 mL de solução de NaOH a 0,5 N em metanol sob aquecimento de 70°C por 15 minutos para completa saponificação da amostra e obtenção dos ácidos graxos livres. Após o resfriamento foram adicionados 7,5 mL de reagente de esterificação (HCL 0,5 N em metanol), aquecendo-se a 70°C por 10 minutos para obtenção dos ésteres metílicos. Após o resfriamento, foi acrescentado 2 mL de solução de NaOH 20% e 2 mL de Hexano (grau HPLC). O tubo foi agitado em vortex e aproximadamente 1 mL da fase superior contendo os ésteres metílicos foi coletado. Mais 1 mL de Hexano (grau HPLC) foi adicionado ao tubo de onde extraiu-se novamente em torno de 1 mL de da fase superior. Os ésteres metílicos foram estocados em frascos de vidro cor âmbar e congelados a -18°C para posterior análise.

Na amostra do óleo de soja utilizado na dieta, os ésteres metílicos foram preparados conforme procedimento descrito acima somente a partir da saponificação. Considerando-se que o SCAGCL é saponificado com cálcio, apenas o processo de esterificação foi realizado para o sabão de cálcio.

As análises dos ésteres metílicos de ácidos graxos da gordura do leite foram realizadas em cromatógrafo a gás (GCMS QP 5000 – Gás Chromatography Mass Spectrometer - Shimadzu®) no Departamento de Química da UFV. Os componentes dos ésteres metílicos foram separados em uma coluna Carbowax (30 m x 0,25 mm).

Condições da Cromatografia:

Temperatura do injetor:	220°C
Temperatura da interface:	240°C
Fluxo de gás na coluna:	1,3 mL/minuto
Pressão na coluna:	67,7 kpa
Velocidade linear na coluna:	40,6 cm/segundo
Vazão de abertura:	3
Volume injetado:	1 µL
Gás de arraste	Hélio (gás inerte)

Programação da coluna:

Rampa	Temperatura	Tempo de parada
-----	40°C	10 minutos
3°C	240°C	6 minutos

Condições de massa:

Iniciar	Finalizar
40 (m/z)	300 (m/z)

Tempo total de corrida: 82,67 minutos.

A identificação dos picos dos ácidos graxos foi realizada por comparação com os tempos de retenção de uma mistura de padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (SupelcoTM 37FAME Mix). A identificação do pico do CLA foi realizada por diferença comparando-se os tempos de retenção dos metil-ésteres da mistura dos ácidos graxos conjugados *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 de um padrão comercial puro (05632 – SIGMA).

Na Tabela 1 são apresentados os perfis médios de ácidos graxos das fontes utilizadas.

Tabela 1 – Composição média de ácidos graxos das fontes lipídicas utilizadas nas dietas experimentais (g/100g)

Item	Fontes lipídicas		
	SC	OS	GS
C 12:0	0,89	Nd	3,65
C 14:0	Nd	0,11	4,06
C 14:1	Nd	Nd	0,78
C 15:0	Nd	Nd	Nd
C 16:0	13,85	11,73	23,39
C 16:1	Nd	0,09	1,92
C 17:0	Nd	0,10	Nd
C 17:1	Nd	0,03	Nd
C 18:0	4,01	4,03	15,86
C 18:1	21,10	22,32	23,67
C 18:2	49,09	53,34	43,3
C 18:3	4,39	6,19	8,1
C 20:0	0,84	Nd	1,15
C 20:1	0,60	Nd	0,15
C 20:4	Nd	0,41	Nd
C _{21:0}	1,80	Nd	Nd
C _{22:0}	0,69	Nd	Nd
Não identificados	2,75	3,78	1,74

SC = sabão de cálcio de ácido graxo de cadeia longa; OS= óleo de soja; GS = Grão de soja crua
Nd = não determinado

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e testes de médias, utilizando-se o procedimento GLM do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 1999), aplicando-se o teste de Tukey para comparação entre as médias e utilizando um nível de 5% de significância.

As variáveis foram analisadas segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + Q_i + T_j + (P/Q)_{ik} + (V/Q)_{il} + Q \times T_{ij} + e_{ijkl}$$

Sendo Y_{ijkl} = observação na vaca l , no período k , submetida ao tratamento j , no quadrado latino i ; μ = efeito geral da média; Q_i = efeito do quadrado latino i , sendo $i = 1,2$; T_j = efeito da dieta j , sendo $j = 1,2,3,4,5$; $(P/Q)_{ik}$ = efeito do período k , dentro do quadrado latino i , sendo $k = 1,2,3,4,5$; $(V/Q)_{il}$ = efeito da vaca l , dentro do quadrado latino i , sendo $l = 1,2,3,4,5$; $Q \times T_{ij}$ = efeito da interação entre o quadrado latino i x dieta j ; e_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação $ijkl$; $e_{ijkl} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

2.3 Resultados e Discussão

Com relação ao perfil de ácidos graxos da gordura do leite, houve diferença entre as dietas com fontes lipídicas para o grupo de ácidos graxos de cadeia curta ($C_4 - C_8 = \text{AGCC}$), (Tabela 2). Porém, os valores foram menores ($P < 0,05$) para as dietas contendo sabão de cálcio e GS em relação à dieta controle. Houve redução ($P < 0,05$) na proporção dos ácidos graxos de cadeia média ($C_{10} - C_{12} = \text{AGCM}$) e aumento de ácidos graxos de cadeia longa ($> C_{16} = \text{AGCL}$) para as dietas contendo SC, OS e GS em relação ao controle. Da mesma forma, foi observada redução ($P < 0,05$) nos valores de ácidos graxos saturados (AGS) e aumento nos teores de ácidos graxos insaturados (AGI) para as dietas com SC, OS e GS. Para os demais grupos de ácidos graxos, tanto os separados por cadeia, quanto os separados por número de ligações, não houve diferenças ($P > 0,05$) entre as dietas avaliadas. Santos et al. (2001) observaram redução de 17,36% e 26,95% no teor de AGCC do leite de vacas suplementadas com GS e OS, respectivamente. Eifert et al. (2006) observaram redução da participação de AGCC e AGCM quando foi adicionado óleo de soja à dieta.

Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos do leite, separados por tamanho da cadeia e número de ligações, obtidas para as dietas experimentais

Item (%)	Dieta					CV (%)
	C	SC	OS	GS	GSF	
AGCC	5,57 ^a	4,96 ^b	5,24 ^{ab}	4,99 ^b	5,26 ^{ab}	20,78
AGCM	45,96 ^a	39,70 ^b	40,02 ^b	39,76 ^b	42,34 ^{ab}	16,63
AGCL	46,56 ^b	51,52 ^a	52,75 ^a	53,05 ^a	48,83 ^{ab}	15,88
AGCI	1,34	1,36	1,34	1,30	1,38	15,33
AGS	62,74 ^a	54,91 ^b	55,67 ^b	55,38 ^b	58,12 ^{ab}	8,36
AGI	32,36 ^b	39,29 ^a	39,35 ^a	39,42 ^a	35,30 ^a	14,53
AGMI	33,59	34,10	35,07	35,53	34,12	14,11
AGPI	3,77	4,19	4,28	3,89	3,30	32,46

C= Controle; SC = Sabão de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS= óleo de soja; GS = Grão de Soja cru moído, GSF= Grão de soja tratada com formaldeído;

AGCC (Ácidos graxos de cadeia curta); AGCM (Ácidos graxos de cadeia média); AGCL (Ácidos graxos de cadeia longa); AGCI (Ácidos graxos de cadeia ímpar); AGS (Ácidos graxos saturados); AGI (Ácidos graxos insaturados); AGMI (Ácidos graxos monoinsaturados) e AGPI (Ácidos graxos polinsaturados);

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem ($P > 0,05$) pelo teste Tukey

CV = coeficiente de variação (%)

Soglia (2003), estudando a forma de processamento do grão de soja sobre o perfil de ácidos graxos do leite, não verificou diferenças entre grão

de soja inteiro ou finamente moído, porém o autor chama atenção que houve tendência a uma menor proporção de AGCC no tratamento de grão de soja moído e atribui à maior biohidrogenação ruminal e conseqüente maior conteúdo de C_{18:1} no leite. Os ácidos graxos da gordura do leite vêm basicamente da síntese *de novo* dentro das células do epitélio mamário e da absorção de ácidos graxos de cadeia longa pré-formados. Ácidos graxos de cadeia curta (C₄ a C₈) e média (C₁₀ a C₁₄) vêm basicamente da síntese *de novo* (acetato e em menor parte do β-hidroxibutirato). Ácidos graxos de cadeia longa (> C₁₆) são derivados da absorção de lipídeos circulantes (da dieta ou da mobilização das reservas corporais). Os ácidos graxos de 16 carbonos são originados de ambos os processos (Chilliard et al., 2000). Vários estudos (Grummer, 1991; Palmquist & Weiss, 1994; Chouinard et al. 1997; Bauman & Griinari, 2003) tem demonstrado que as proporções de ácidos graxos de cadeia curta e média sintetizados pela síntese *de novo* decrescem linearmente quando lipídeos suplementares são fornecidos à vacas em lactação e que a maior parte dessa inibição é devido a efeitos específicos sobre a glândula mamária mediados pelo incremento da ingestão de ácidos graxos de cadeia longa.

Estas alterações no conteúdo de AGCC são causadas pela inibição direta da atividade da acetil-CoA carboxilase e da ácido graxo sintetase da glândula mamária por alguns ácidos graxos provenientes da incompleta biohidrogenação no rúmen. Diversos autores (Griinari et al., 1998; Piperova et al., 1998; Chouinard et al. 2001; Abughazaleh & Jacobson, 2006) têm demonstrado que estes ácidos graxos são os *trans* C_{18:1}, originados da biohidrogenação parcial de ácidos graxos poliinsaturados no rúmen e que sua presença causaria redução na síntese *de novo*.

Seguindo esta lógica esperava-se redução mais acentuada de AGCC no tratamento contendo OS devido ao fato de ser rico em ácidos graxos poliinsaturados e também pela depressão no total de gordura do leite, seguido do tratamento contendo sabão de cálcio. Entretanto, apesar de semelhantes entre os demais tratamentos, numericamente não foi o menor. Os valores de AGCC obtidos neste estudo foram inferiores a de outros envolvendo fontes lipídicas semelhantes às utilizadas neste trabalho, o que pode ser atribuído à uma possível recuperação incompleta desses ácidos

graxos, principalmente o C_{4:0}, em função da coluna cromatográfica utilizada, mascarando os resultados obtidos e impedindo uma conclusão definitiva, uma vez que houve redução significativa do teor de gordura do leite.

Cerca de metade dos AGCM utilizados na síntese de triacilgliceróis da gordura do leite são originados da síntese *de novo* na glândula mamária e o restante derivado dos lipídeos do sangue, sendo estes originados na sua maioria da dieta ou mobilizados dos tecidos corpóreos. A maior redução na proporção de AGCM nas dietas com SC, OS e GS pode estar mais relacionado à inibição da síntese *de novo* na glândula mamária, do que à influência dietética, uma vez que estas fontes são ricas em ácidos graxos poliinsaturados, inclusive o tratamento envolvendo sabão de cálcio, já que esta fonte comercial tem maior proporção desses ácidos, diferentemente de outros sabões de cálcio, que são ricos em ácidos graxos de cadeia média (principalmente o ácido palmítico). A dieta GSF apresentou valor semelhante ao controle e como o perfil de ácidos graxos é igual ao do tratamento envolvendo somente GS, pode-se inferir que a rota de biohidrogenação seja diferente do padrão envolvendo GS devido à proteção com formaldeído. Logo, menor quantidade (AGCL), ou outros ácidos que não o *trans* C_{18:1} estariam chegando à glândula mamária e deste modo causando menor inibição sobre a síntese *de novo*.

Os ácidos graxos de cadeia longa que compõe a gordura do leite são derivados da corrente sanguínea que passam pela glândula mamária. O conteúdo desses ácidos graxos, portanto, é bastante influenciado pelo perfil das fontes lipídicas provenientes da dieta (Soglia, 2003). No presente trabalho as fontes lipídicas foram efetivas em aumentar a proporção dos AGCL, devido à elevada participação de ácidos graxos de cadeia longa nos suplementos utilizados, principalmente os ácidos linoléico e linolênico. A dieta GSF apresentou resultado semelhante ao controle sobre o teor de AGCL no leite. Mais uma vez, a proteção obtida pelo tratamento com formaldeído poderia ser apontada como a causa do resultado alcançado. Neste caso, a proteção poderia estar influenciando na absorção dos ácidos graxos, reforçado pelo valor de digestibilidade aparente do extrato etéreo encontrado para esta dieta (Tabela 7 – capítulo 1).

A gordura do leite contém normalmente altos níveis de lipídeos saturados (60 a 70%) e este perfil tende a manter independência em relação ao lipídeo suplementar devido às transformações ocorridas no rúmen (Oliveira, 2002). Como o consumo dos produtos lácteos tem sofrido restrições em grande parte por estar associado ao aumento do colesterol sanguíneo e sua implicação na incidência de doenças cardiovasculares, o foco tem sido a manipulação da dieta de vacas, buscando uma redução nos níveis de ácidos graxos saturados e incrementos nos ácidos graxos poliinsaturados. Houve redução na proporção de ácidos graxos saturados (AGS) e aumento de ácidos graxos insaturados (AGI) em todas as dietas com lipídeos, o que pode ser atribuído, pelo menos em parte ao escape de ácidos graxos insaturados da completa biohidrogenação em função da rápida passagem dos lipídeos da dieta, principalmente quando não protegidos, como o óleo de soja e o grão de soja moído. Pode ter havido dissociação de parte dos sabões de cálcio permitindo a ocorrência de biohidrogenação, e no caso da dieta com GSF, o maior escape ruminal de AGI, devido à proteção conferida pela complexação proteína-formaldeído pode ter contribuído para este resultado.

Na Tabela 3 está contido o perfil de ácidos graxos da gordura do leite. Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) entre as dietas para a maioria dos ácidos graxos. Porém, os lipídeos adicionados às dietas foram efetivos em promover redução ($P<0,05$) dos ácidos graxos mirístico ($C_{14:0}$) e palmítico ($C_{16:0}$) e aumentar a participação dos ácidos graxos esteárico ($C_{18:0}$) e oléico ($C_{18:1}$), além de promover aumento nos teores de CLA em relação ao controle, porém não foi observado diferença ($P>0,05$) nos teores deste ácido graxo dentre as fontes de suplementação.

Tabela 3 – Perfil de ácidos graxos do leite obtidos para as dietas experimentais (g/100g)

Item	Dieta					CV (%)
	C	SC	OS	GS	GSF	
C _{6:0}	1,93 ^a	1,57 ^b	1,69 ^b	1,61 ^b	1,64 ^b	22,86
C _{8:0}	1,08	1,06	1,07	1,06	1,06	34,54
C _{10:0}	2,57	2,33	2,48	2,32	2,55	22,75
C _{12:0}	2,35	1,98	2,01	2,01	1,99	16,09
C _{13:0}	0,06	0,06	0,06	0,05	0,06	35,33
C _{14:0}	9,97 ^a	7,24 ^b	7,41 ^b	7,92 ^b	8,62 ^{ab}	23,98
C _{14:1}	0,83	0,63	0,66	0,70	0,72	22,64
C _{15:0}	0,77	0,75	0,75	0,73	0,80	19,96
C _{16:0}	28,85 ^a	26,86 ^{ab}	23,97 ^b	26,81 ^{ab}	27,91 ^a	15,10
C _{16:1}	1,14	1,17	1,17	1,14	1,24	26,91
C _{17:0}	0,40	0,43	0,42	0,40	0,40	11,69
C _{17:1}	0,11	0,12	0,12	0,12	0,12	18,86
C _{18:0}	11,78 ^b	14,63 ^a	14,83 ^a	15,08 ^a	13,96 ^a	20,87
C _{18:1}	29,50 ^c	32,17 ^b	33,12 ^{ab}	33,58 ^a	32,04 ^b	15,59
C _{18:2}	3,37	3,78	3,92	3,47	2,90	35,44
CLA*	0,25 ^b	0,41 ^a	0,49 ^a	0,45 ^a	0,38 ^{ab}	28,66
Outros	2,32	3,89	2,01	2,23	3,77	46,58

C= Controle; SC = Sabão de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS= óleo de soja; GS = Grão de Soja cru moído, GSF= Grão de soja tratada com formaldeído;

Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem (P> 0,05) pelo teste Tukey

CV = coeficiente de variação (%)

*Isômeros cis-9, trans-11CLA e trans-10, cis-12 CLA

Resultados semelhantes foram observados por Santos et al. (2001) trabalhando com OS e GS para vacas leiteiras. A redução do ácido graxo mirístico pode estar ligado à diminuição da síntese *de novo* na glândula mamária em decorrência da falta de precursores, como o acetato e butirato, ou devido ao fornecimento de fontes lipídicas ricas em ácidos graxos insaturados na dieta, em que parte escapa da biohidrogenação ruminal, sendo absorvidos no intestino delgado, elevando com isto seus teores no leite, além de alguns deles atuar na inibição de enzimas envolvidas na síntese *de novo* (Jenkins, 1993).

Geralmente a concentração de ácido palmítico que chega para absorção no intestino reflete a composição lipídica da dieta. Os menores valores encontrados para o óleo de soja neste estudo podem ser devido ao fato de que essa fonte lipídica utilizada apresenta menor concentração deste ácido graxo, enquanto que o sabão de cálcio e o grão de soja apresentam maiores teores. A quantidade de ácidos graxos insaturados pode também

estar influenciando na concentração de ácido palmítico pela inibição da síntese *de novo*, que também afeta a produção de AGCM.

O aumento dos teores de ácido esteárico e oléico deve-se provavelmente ao elevado teor de ácidos graxos de cadeia longa nas fontes lipídicas, que após passarem total ou parcialmente pela biohidrogenação são incorporados à gordura do leite. O ácido esteárico indica o grau de biohidrogenação de ácidos graxos poliinsaturados no rúmen. A etapa inicial para a biohidrogenação é uma reação de isomerização que converte a dupla ligação *cis-12* no ácido graxo poliinsaturado para seu isômero *trans-11*. As etapas de redução subseqüentes originarão o ácido *trans* vaccênico (C_{18:1} *trans-11*). A extensão na qual o ácido C_{18:1} *trans-11* é hidrogenado à C_{18:0} depende das condições do rúmen e a maior quantidade de ácido linoléico parece inibir de forma irreversível esta reação (Jenkins, 1993).

No presente estudo, as fontes lipídicas foram eficientes em promover elevação dos teores de CLA. Em termos numéricos as dietas com OS e GS apresentaram os maiores valores indicando que, por não estarem protegidos foram mais biohidrogenados em relação ao sabão de cálcio e GSF. Dhiman et al. (2000) verificaram incrementos no teor de CLA quando utilizaram grão de soja tostado moído e óleo de soja em experimento conduzido para determinar o conteúdo de CLA no leite de vacas alimentadas com dietas ricas em ácidos linoléico e linolênico e concluíram que dietas ricas nestes ácidos graxos podem aumentar o teor de CLA no leite quando os lipídeos da dieta estão acessíveis aos microrganismos ruminais. Santos et al. (2001) observaram aumento no teor de CLA com OS, mas não com GS inteiro. Soglia (2003) observou maior aumento do teor de CLA para grão de soja na forma moída em relação a grãos inteiros.

Os CLA são produzidos em parte pelo processo de biohidrogenação parcial do ácido linoléico e linolênico no rúmen e também pela ação da enzima Δ^9 -dessaturase sobre o ácido vaccênico na glândula mamária.

O ácido *trans-11* vaccênico (ATV) e o *cis-9, trans-11* CLA são intermediários importantes durante a biohidrogenação dos ácidos linoléico e linolênico e podem contribuir de forma significativa para mudanças no perfil de ácidos graxos na gordura corporal ou do leite em ruminantes. O *cis-9, trans-11* (CLA) em condições normais é um intermediário transitório de modo

que pouco ou nenhum deste esteja disponível para absorção, ao passo que o ATV pode ser acumulado em maior quantidade. O aparecimento do *cis*-9, *trans*-11 CLA nas gorduras do leite e carne se deve à síntese endógena desse ácido graxo a partir do ATV proveniente da biohidrogenação ruminal pela enzima Δ^9 dessaturase nos tecidos adiposo e mamário (Dhiman et al., 2005).

Além destes dois intermediários, a biohidrogenação parece ter complexidade muito maior e inúmeros outros intermediários estão sendo identificados, a maioria isômeros do CLA. Muitos desses intermediários são formados a partir da biohidrogenação de ácidos graxos poliinsaturados, podendo ser absorvidos e incorporados na gordura dos ruminantes. Alguns dos isômeros podem ser formados por migração das ligações químicas (Griinari e Bauman, 1999, citados por Bauman et al., 2003) e uma porção dos *trans* C_{18:1} pode ser derivada do ácido oléico (*cis*-9 C_{18:1}). Fatores envolvendo tipo de dieta e modificação do ambiente ruminal promove diferenças significativas nos padrões de biohidrogenação, levando à formação de determinados intermediários em detrimento de outros. Contudo, a relação com que as várias rotas de biohidrogenação estão associadas com enzimas específicas e espécies de bactérias ainda não está devidamente compreendido.

2.4 Conclusões

A suplementação da dieta com fontes lipídicas na forma livre, inerte, parcialmente protegida ou protegida, no nível de 5% da matéria seca, promoveu alteração no perfil de ácidos graxos da gordura do leite de vacas no terço médio de lactação. Os suplementos sabões de cálcio e grão de soja cru moído foram efetivos em reduzir os ácidos graxos de cadeia curta e média e aumentar os ácidos graxos de cadeia longa. Todas as fontes lipídicas promoveram aumento nos níveis de ácidos graxos insaturados. O tratamento do grão de soja com formaldeído não foi efetivo em promover mudanças no perfil de ácidos graxos, incluindo o CLA.

2.5 Referências Bibliográficas

- ABUGHAZALEH , A.A., JACOBSON, B.N. The effect of pH and polyunsaturated C₁₈ fatty acid source on the production of vaccenic acid and conjugated linoleic acids in ruminal cultures incubated with docosahexaenoic acid. **Animal Feed Science and Technology**, 2006.
- BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Nutritional Regulation of Milk Fat Synthesis. **Annual Review Nutrition**, v. 23, p. 203-227, 2003.
- BAUMAN, D. E.; PERFIELD, J. W.; VETH, M. J. et al. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. **Proceedings Cornell Nutrition Conference**, p. 175-189, 2003.
- BAUMAN, D. E.; LOCK, A. L. Concepts in lipid digestion and metabolism in dairy cows. Proc. Tri-State Dairy Nutrition Conference. p. 1-14, 2006. Acessado em: <http://tristatedairy.osu.edu/>
- BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A. et al. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **Animal Journal Physiology Regulatory Integrative Composition Physiology**. v. 278, p.179–184, 2002.
- CHILLIARD, Y., FERLAY, A., MANSBRIDGE, R.M. et al. Ruminant milk plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. Review article. **Annual Zootech.**, v. 49, pp. 181 – 205, 2000.
- CHOUIRNARD, P.Y.; CORNEAU, L.; BARBANO, D.M. et al. Conjugated Linoleic Acids Alter Milk Fatty Acid Composition and Inhibit Milk Fat Secretion in Dairy Cows **Journal of Nutrition**. v.129, p.1579–1584, 1997.
- CHOUIRNARD, P.Y, GIRARD, V., BUTLER, W.R. et al. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic concentrations in milk fat. **Journal of Dairy Science**, v.84, n. 3, p. 681 – 690, 2001.
- DEMEYER, D.; DOREAU M. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. **Proceedings of the Nutrition Society**, v.58, p593-607. 1999.
- DHIMAN, T.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W. et al. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 5, p. 1016-1027, 2000.
- DHIMAN, T.R., NAM, S.H., URE, A.L. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. **Critical Reviews in Feed Science and Nutrition**. v. 45, pp 463 – 482, 2005.

- EIFERT, E.C., LANA, R.P., LANNA, D.P.D. et al. 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.
- FENG, S., LOCK, A.L., GARNSWORTHY, P.C. Technical note: A rapid lipid separation method for determining fatty acid composition in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p. 3785 – 3788, 2004.
- GRIINARI, J.M., DWYER, D.A., MCGUIRE, M. A. et al. Trans-octadecanoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 5, p. p. 1251 – 1261, 1998.
- GRUMMER, R.R. Effect of feed on the composition of milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 9, p. 3244 – 3257, 1991.
- HARTMAN, L., LAGO, L.C.A. Rapid separation of fatty acid methylesters. London: **Laboratory practice**, v. 22, p. 475 – 476, 1986.
- JENKINS, T.C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**. v.76 , n.12, p.3851- 3863. 1993.
- PALMQUIST, D.L.; WEISS, W.P. Blood and hydrolyzed feather meals as source of undergradable protein in hight fat diets for cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**. v. 77, n. 6, p. 1630-1651, 1994.
- PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. **Metabolismo de lipídeos**. In: Nutrição de Ruminantes, Telma Teresinha Berchielli, Alexandre Vaz Pires, Simone Gisele de Oliveira (Ed.) – Jaboticabal: Funep, 583 p., 2006.
- PIPEROVA, L.S., TETER, B.B., BRUCKENTAL, I. Et al. Association of diet induced increases in milk trans fatty acids with the activities of acetyl – CoA carboxilase and fatty acid synthetase in the mammary gland of lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 80, n. 8, p. 352, 1998.
- OLIVEIRA, S. G. **Utilização de fontes de gordura a dietas com diferentes níveis de fibra para vacas em lactação**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade de São Paulo. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba – SP, 2002.
- SANTOS, F.L., LANA, R.P., SILVA, M.T.C., et al. Produção e composição do leite de vacas submetidas a dietas contendo diferentes níveis e formas de suplementação de lipídios. **Revista Brasileira de Zootecnia** 30(4):1376-1380, 2001.
- SOGLIA, S.L.O. **Perfil de ácidos graxos e concentração de ácido graxo conjugado (CLA) na gordura do leite de vacas alimentadas com diferentes fontes de lipídeos**. Lavras – UFLA, 75 p. (Tese de Doutorado), 2003.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS. **User’s Guide: Statistics**. Version 8.0. NC: SAS INSTITUTE, 1999.

Capítulo 3

Parâmetros sanguíneos, estimativa de síntese microbiana e balanço de nitrogênio de vacas leiteiras recebendo dietas com diferentes fontes de gordura

3.1 Introdução

A utilização de lipídeos suplementando as dietas de ruminantes pode trazer inúmeras vantagens, principalmente no que diz respeito ao aumento da densidade energética da dieta evitando distúrbios metabólicos causado por excesso de concentrado.

Entretanto, o excesso de lipídeos dietéticos pode interferir sobre a fermentação ruminal, reduzindo a digestibilidade da fração não lipídica da dieta. A digestão ruminal dos carboidratos fibrosos pode ser reduzida em 50% ou mais por menos de 10% de gordura adicionada, o que pode ser acompanhada por diminuição da produção de metano, hidrogênio e AGV, redução da biohidrogenação, além de alteração na relação acetato:propionato. A adição de lipídeos dietéticos também pode modificar o metabolismo protéico no rúmen, diminuindo a digestão da proteína e a concentração de nitrogênio amoniacal (Jenkins, 1993; Harfoot e Hazlewood, 1997).

Embora os mecanismos pelos quais ocorra efeito sobre a fermentação ruminal ainda não estejam elucidados, as teorias mais aceitas envolvem o efeito da cobertura das partículas de alimentos pela gordura, dificultando o acesso dos microrganismos e suas enzimas, além de efeitos citotóxicos diretos, alterando a fluidez da membrana celular, com conseqüente redução do crescimento microbiano (Jenkins, 1993).

Como forma de proteção contra os efeitos adversos, os microrganismos promovem hidrólise dos triglicerídeos e biohidrogenação dos ácidos graxos livres em processo relacionado ao grau de insaturação dos ácidos graxos, o que faz com que os ruminantes tenham a particularidade de não apresentar em seus produtos, carne e leite, a

composição de ácidos graxos na gordura semelhante ao perfil de ácidos graxos da dieta.

Óleos vegetais ricos em ácidos graxos insaturados podem acarretar efeitos negativos no ambiente ruminal, principalmente na digestibilidade das frações fibrosas da dieta. Por outro lado, proteção parcial pode ser conseguida pela utilização de grãos de oleaginosas, visto que as gotículas de lipídeos em sementes de oleaginosas se encontram protegidas em uma matriz protéica que lhes conferem proteção natural.

Suplementos lipídicos denominados gorduras inertes tem sido desenvolvidos com o intuito de aumentar a concentração energética das dietas, com mínima interferência na fermentação ruminal. Os métodos de proteção de gordura incluem a encapsulação por proteína tratada com formaldeído (McAllan et al., 1983), a hidrogenação das gorduras e a produção de sabão de cálcio. Os sabões de cálcio são degradados em pequena proporção e, após a hidrólise no abomaso, seus ácidos graxos podem ser absorvidos, reduzindo os efeitos negativos sobre a fermentação ruminal (Jenkins e Palmquist, 1982).

Excesso de lipídeos na dieta provoca, dentre outros efeitos, a redução de síntese microbiana, seja pelos efeitos tóxicos sobre os microrganismos, como mencionado acima, ou ainda por diminuição na quantidade de carboidratos prontamente disponíveis para fermentação devido à substituição parcial da energia proveniente do concentrado pela energia da gordura.

A síntese de proteína microbiana no rúmen é de vital importância para a saúde e produtividade de animais ruminantes (Pehrson, 2002). Mensuração desse processo é complexo, dispendioso e questionável do ponto de vista de bem estar, por utilizar animais fistulados. Resultados promissores têm sido obtidos pela estimativa de síntese microbiana a partir da concentração de derivados de purina, em especial a alantoína na urina e leite, que são produtos da degradação de ácidos nucléicos em quase sua totalidade dos microrganismos do rúmen (Pehrson, 2002).

Os níveis de uréia no sangue e principalmente no leite vêm sendo apontados, como bons indicadores relacionados ao balanço entre os níveis de energia e proteína na dieta. A suplementação lipídica pode influenciar o

balanço de energia e proteína, não por modificação no nível de energia, mas pela mudança na forma como esta energia será aproveitada pelos microrganismos no rúmen.

Relatos da literatura apontam resultados inconsistentes com relação aos efeitos da suplementação lipídica sobre o metabolismo intermediário em ruminantes. Níveis mais elevados de lipídeos no sangue são observados quando ocorre aumento da absorção no intestino de gordura proveniente da dieta ou pelo aumento da mobilização no tecido adiposo (Jenkins & Jenny, 1989). A mobilização das reservas corporais pode ser caracterizada pelo aumento de ácidos graxos não esterificados (AGNE), atingindo grande magnitude geralmente no período de transição, podendo estender-se até o pico de lactação, em virtude da elevada demanda energética aliada à limitação de consumo típica desta fase (Salfer et al., 1995). Fora do período de início de lactação, o processo de mobilização de reservas no tecido adiposo é pouco significativo e os níveis de lipídeos circulantes, representados por triacilglicerídeos (TAG), fosfolipídeos e ésteres de colesterol, incorporados nas lipoproteínas, principalmente nas de baixa densidade, sofrem influência maior do número de ácidos graxos absorvidos no intestino (Clegg et al., 2001).

Palmquist & Conrad (1978), utilizando diferentes níveis de gordura na dieta, mediram as concentrações metabólicas que foram de 26,1, 29,2 e 32,8 mg/dL de triglicerídeos para o controle, 5,1 e 10,7% de EE na dieta, respectivamente. Os autores, porém, não discutem a influência da natureza da fonte lipídica dietética sobre os níveis de TAG ou de lipoproteínas plasmáticas. Ashes, (2002) reportam que ácidos graxos poliinsaturados, principalmente os óleos ricos em C₂₀ e C₂₂, contribuem para redução dos níveis de TAG e colesterol no sangue. Em torno de 50 a 60% dos ácidos graxos do leite provêm da hidrólise dos TAG plasmáticos e em menor grau dos AGNE pela mobilização do tecido adiposo, e captação dos mesmos pela glândula mamária (Cagliostro e Chilliard, 1991). A glicose é importante por desempenhar papel central na glândula mamária no suprimento de carbono, hidrogênio e oxigênio para a síntese de lactose, que é o maior regulador osmótico no controle do volume de leite produzido pelas vacas leiteiras (Overton, 1997), além de contribuir significativamente para a síntese de

gordura e proteína do leite (Clark, 1975). Os níveis de glicose circulante em ruminantes são geralmente baixos e relativamente constantes, exceto no período de transição ao parto, em que a demanda por nutrientes é elevada no início de lactação, onde a falta de glicose pode levar o animal a desenvolver doenças metabólicas, como cetose e fígado gorduroso. Poucos trabalhos têm associado suplementação lipídica com os níveis de glicose circulante. Garnsworthy (2002) hipotetiza que a disponibilidade de glicose tende a ser menor devido à direta substituição de amido por gordura na dieta, levando a menor produção de propionato no rúmen, sendo este precursor de glicose no metabolismo de ruminantes, além da necessidade de glicose como fonte de glicerol para produção de TAG na mucosa do intestino.

Assim objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da suplementação de fontes lipídicas na forma livre, inerte, parcialmente protegida ou protegida, sobre o balanço de nitrogênio, síntese de proteína microbiana e metabólitos sanguíneos ligados ao metabolismo de lipídeos.

3.2 Material e métodos

O experimento foi realizado na Fazenda Estância dos Buritís, município de Hidrolândia-GO, durante o período de novembro de 2005 a março de 2006.

Foram utilizadas 10 vacas da raça Holandesa, puras e mestiças, com 86 ± 22 dias de lactação, produção média diária de $29,5 \pm 4,4$ kg e peso médio de 556 ± 55 kg, distribuídas em dois quadrados latinos balanceados 5 X 5.

O experimento foi constituído de cinco períodos com duração de 21 dias cada, sendo os quatorze primeiros dias para adaptação e os demais para coleta de amostras para determinação de parâmetros sanguíneos, balanço de nitrogênio e estimativa de síntese microbiana.

Cinco dietas compuseram o experimento, sendo uma dieta controle e mais quatro contendo os mesmos alimentos da dieta controle, porém suplementadas com fontes lipídicas em diferentes formas, ou seja, na forma considerada inerte, com o sabão de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa

(¹SCAGCL); na forma livre, com o óleo de soja OS; na forma parcialmente protegida, com o grão de soja cru moído (GS) e na forma protegida, com o grão de soja moído tratado com formaldeído (GSF). Os procedimentos relacionados ao balanceamento das dietas experimentais e manejo dos animais estão descritos no Capítulo 1.

As vacas foram ordenhadas mecanicamente, duas vezes ao dia, fazendo-se o registro da produção de leite. Foi coletada amostra de leite, no 17° dia, na ordenha da manhã e da tarde, fazendo-se a amostra composta, aproximadamente 50 mL para fins de análise de compostos nitrogenados totais e alantoína. O leite primeiramente foi desproteínizado com ácido tricloroacético (10 mL de leite foram misturados com 5 mL de ácido tricloroacético a 25%, deixado em repouso por cerca de 30 minutos, seguido de filtração em papel-filtro e armazenado a -20°C, sendo as análises de alantoína realizadas no filtrado.

A urina foi coletada no 15° dia do período, quatro horas após a alimentação matinal, pelo método 'spot'. Depois de devidamente homogeneizadas e filtradas, foram obtidas alíquotas de 10 mL das amostras que foram diluídas em 40 mL de ácido sulfúrico 0,0036 N. Estas amostras tiveram seu pH ajustado para abaixo de três e posteriormente foram acondicionadas em recipientes plásticos, devidamente identificados e congeladas a -20°C para posteriores análises de creatinina, uréia, alantoína e ácido úrico. Também foi coletado 40 mL de urina pura sem conservante e congelada a -20°C para posterior determinação do teor de nitrogênio.

No 20° dia de cada período experimental foi coletada amostra de sangue, utilizando agulhas e tubos com vácuo, quatro horas após a alimentação matinal. Logo após a coleta, as amostras de sangue foram centrifugadas (5000 rpm por 15 minutos), sendo então coletadas amostras de soro sanguíneo, que foram acondicionadas em tubos do tipo "ependorfs" devidamente identificadas e congeladas para posterior análise.

¹ Megalac[®]-E (Church & Dwight, Co.)

Foi realizada, por meio de Kits comerciais (IN VITRO DIAGNÓSTICO[®]), os teores de glicose, colesterol total (CT) e dosagem de colesterol contido na lipoproteína de alta densidade (HDL), além de TAG e uréia. Os teores de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e lipoproteína de baixa densidade (LDL) foram estimados a partir dos valores de TAG e HDL por meio das equações:

$$\text{VLDL} = \text{TAG}/5$$

$$\text{LDL} = \text{CT} - (\text{VLDL} + \text{HDL})$$

As análises de alantoína da urina e leite foram feitas pelo método colorimétrico, segundo Fujihara et al. (1987), descrito por Chen & Gomes (1992). A determinação da creatinina e ácido úrico na urina foram por meio de kits comerciais (Labtest[®]). A análise de N-uréico no leite foi realizada juntamente com as análises de sólidos do leite na Clínica do leite – ESALQ/USP.

O volume urinário total diário foi estimado a partir da proposição de excreção de 29,00 mg/kg peso vivo (PV) de creatinina (Valadares et al., 1999).

A excreção total de DP foi calculada pela soma das quantidades de alantoína e ácido úrico excretados na urina e da quantidade de alantoína excretada no leite, expressas em mmol/dia.

As purinas absorvidas (X, mmol/dia) foram calculadas a partir da excreção de DP (Y, mmol/dia), por meio da equação $Y = 0,85X + 0,385 \text{ PV}^{0,75}$, em que 0,85 é a recuperação de purinas absorvidas como derivados de purinas e $0,385 \text{ PV}^{0,75}$ a contribuição endógena para excreção de purinas (Verbic et al., 1990).

A síntese de compostos nitrogenados microbianos no rúmen (Y, gN/dia) foi calculada em função das purinas absorvidas (X, mmol/dia), por meio da equação $Y = (70X) / (0,83 \times 0,116 \times 1000)$, em que 70 representa o conteúdo de N na purinas (mg N/mmol); 0,83, a digestibilidade das purinas microbianas e 0,116, a relação N-purina:N total nas bactérias (Chen & Gomes, 1992).

Os animais foram manejados em baias individuais onde receberam alimentação fornecida duas vezes ao dia, às 7:00 e às 17 horas. Diariamente foram feitas pesagens das quantidades das dietas fornecidas e das sobras

de cada tratamento para estimativa do consumo. Foi feito monitoramento diário do consumo a fim de manter as sobras dos alimentos em torno de 10%, com base na matéria seca. No momento da alimentação, durante o período experimental, foram feitas amostragens das dietas e sobras que foram acondicionadas em sacos plásticos e congeladas para posteriores análises.

O preparo das amostras compostas do alimento fornecido, das sobras diárias de cada animal e das fezes em cada período experimental e as análises de compostos nitrogenados (N) seguiram as especificações descritas por Silva & Queiróz (2002). O balanço de compostos nitrogenados (BCN) foi obtido pela diferença entre o total de N ingerido e o total de N excretado nas fezes e urina, e contido no leite.

A partir desses valores, procedeu-se ao cálculo para quantificação do nitrogênio retido (Nret), descontando-se do BCN o valor estimado (AFRC, 1993) da exigência para nitrogênio endógeno basal (NEB), que considera o N endógeno tecidual e as perdas dérmicas de N como 0,35 e 0,018 do peso metabólico, respectivamente.

$$\text{NEB (g/dia)} = (0,35 + 0,018) \times \text{PV}^{0,75}$$

Desde modo, o valor do Nret foi expresso como:

$$\text{Nret (g/dia)} = (\text{Nconsumido} - \text{Nfezes} - \text{Nurina} - \text{Nleite}) - \text{NEB}$$

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e testes de médias, utilizando-se o procedimento GLM do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 1999), aplicando-se o teste de Tukey para comparação entre as médias e utilizando um nível de 5% de significância.

As variáveis foram analisadas segundo o modelo estatístico:

$$Y_{ijkl} = \mu + Q_i + T_j + (P/Q)_{ik} + (V/Q)_{il} + Q \times T_{ij} + e_{ijkl}$$

Sendo Y_{ijkl} = observação na vaca l , no período k , submetida ao tratamento j , no quadrado latino i ; μ = efeito geral da média; Q_i = efeito do quadrado latino i , sendo $i = 1,2$; T_j = efeito da dieta j , sendo $j = 1,2,3,4,5$; $(P/Q)_{ik}$ = efeito do período k , dentro do quadrado latino i , sendo $k = 1,2,3,4,5$;

$(V/Q)_{il}$ = efeito da vaca l , dentro do quadrado latino i , sendo $l = 1,2,3,4,5$; $Q \times T_{ij}$ = efeito da interação entre o quadrado latino i x dieta j ; e_{ijkl} = erro aleatório associado a cada observação $ijkl$; $e_{ijkl} \sim \text{NID}(0, \sigma^2)$.

3.3 Resultados e Discussão:

Na Tabela 1 estão contidos os dados referentes ao consumo e excreção de nitrogênio, bem como o balanço de nitrogênio (N). Foi possível observar maiores ($P < 0,05$) consumos de N nas dietas controle e na dieta contendo sabão de cálcio. Para as demais dietas não foi observada diferença de consumo.

Tabela 1 - Consumos, excreções médias diárias e balanço dos compostos nitrogenados obtidos para as dietas experimentais.

Parâmetros	Dietas					CV (%)
	C	SC	OS	GS	GSF	
N Ingerido (g/dia)	421,67 ^a	411,55 ^a	383,46 ^b	373,72 ^b	387,29 ^b	3,63
N Fezes (g/dia)	133,71 ^{bc}	123,97 ^{bc}	139,19 ^{ab}	122,74 ^c	150,46 ^a	9,17
N Urina (g/dia)	143,21 ^{ab}	154,41 ^a	119,15 ^c	137,92 ^b	117,79 ^c	8,90
N Leite (g/dia)	116,67 ^a	109,82 ^{bc}	113,40 ^{ab}	107,24 ^{bc}	101,87 ^c	6,29
Balanço (g/dia)	28,07 ^a	23,35 ^{ab}	11,72 ^{bc}	5,16 ^c	17,17 ^b	29,50
NEB (g/dia)	41,78	42,05	41,82	41,68	41,62	7,24
N retido(g/dia)	-13,71 ^b	-18,70 ^b	-30,11 ^a	-37,08 ^a	-24,25 ^{ab}	25,46

C= Controle; SC = Sabão de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS= óleo de soja; GS = Grão de Soja cru moído, GSF = Grão de soja tratada com formaldeído;
Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem ($P > 0,05$) pelo teste Tukey
CV = coeficiente de variação (%)

Maiores valores de N na dieta podem estar relacionados ao maior consumo de matéria seca observado para esta dieta (Capítulo 1) em relação às demais dietas envolvendo fontes lipídicas. O consumo de N semelhante a dieta contendo sabão de cálcio, pode estar ligada à maior concentração média de PB (15,95% contra 15,05% do controle) observada na composição da dieta, compensando o menor consumo de matéria seca em relação ao controle. O consumo de N seja na forma de proteína ou de nitrogênio não protéico, está relacionado ao atendimento das exigências para crescimento microbiano, exigências do animal, redução das perdas de compostos nitrogenados e redução do impacto negativo da liberação desses compostos para o meio ambiente (Santos, 2006). Poucas informações estão disponíveis

na literatura com relação ao efeito de lipídeos sobre a ingestão de N. Aparentemente não há efeito depressor direto da suplementação lipídica sobre a ingestão de N, sendo esta afetada indiretamente pelo menor consumo de matéria seca decorrente de elevadas quantidades de lipídeos na dieta.

Entretanto, o consumo de N por si só, não é suficiente para inferir se as exigências protéicas estão sendo atendidas de modo que o animal possa desempenhar todo seu potencial. O metabolismo protéico pode sofrer influência de vários fatores levando a diferenças na resposta quanto à eficiência de utilização de N. Níveis elevados de excreção de N na urina podem indicar excesso de ingestão de N, ou desbalanço na relação N:energia no rúmen, principalmente quando a origem da fonte de energia provem de lipídeos. Neste caso os microrganismos não têm a capacidade de utilizar lipídeos como fonte de energia para manutenção e crescimento (Santos, 2006). A menor disponibilidade de energia para os microrganismos em função da suplementação lipídica poderia inferir em acúmulo de nitrogênio amoniacal (N-NH₃) no rúmen, levando a maior excreção de N na urina através do ciclo da uréia. Entretanto, o efeito da suplementação lipídica parece ser contrário. Doreau & Chilliard (1997), relatam efeito defaunatório sobre os protozoários quando gorduras insaturadas são adicionadas às dietas, principalmente aquelas ricas em ácido linoléico e linolênico. A consequência principal da defaunação é a queda na concentração de N-NH₃ no rúmen, decorrente da redução da atividade proteolítica dos protozoários (Doreau & Farley, 1995).

Maiores excreções de N na urina ($P < 0,05$) foram observados nas dietas controle e contendo sabão de cálcio, sugerindo que pode ter havido perda de N em função da maior ingestão de N para esta dieta. De um modo geral as dietas com fontes lipídicas apresentaram menores excreções de N na urina. Silva (2005) trabalhando com cabras leiteiras observou menores excreções de N na urina em dietas com lipídeos (óleo de soja, soja grão e sabão de cálcio) e relatou a possibilidade de que a adição de lipídeos pode contribuir para minimizar as perdas de N. Na dieta com GSF foi observado o menor valor de N excretado na urina, podendo indicar menor atividade proteolítica no rúmen, porém, no presente estudo não foi possível reforçar

esta teoria em função da impossibilidade de determinação da concentração de N-NH₃ ruminal.

Com relação ao N excretado nas fezes, vale ressaltar o maior valor encontrado na dieta com GSF. A proteção contra a degradação protéica pelos microrganismos no rúmen ocasionado pela complexação parece influenciar também na digestão e absorção intestinal da proteína, aumentando o nitrogênio excretado nas fezes. Este fato é reforçado pelo resultado de digestibilidade aparente da proteína (Capítulo 1) que foi menor para esta dieta.

Todos as dietas apresentaram valores positivos no balanço de N, indicando que os teores de proteína da dieta estavam adequados, entretanto, maior valor de N para as dietas controle e sabão de cálcio podem indicar excesso de N e, conseqüentemente, maiores gastos de energia para excreção do N via ciclo da uréia.

O maiores valores de N_{ret} para as dietas controle e SC pode ser reflexo dos maiores consumos de N e como não houve diferenças para o NEB, pode-se inferir maior eficiência de aproveitamento do nitrogênio.

As concentrações de uréia no soro (US) e no leite (UL), nitrogênio uréico no soro (NUS) e no leite (NUL) e a relação nitrogênio uréico no leite e no soro (NUL/NUS) estão contidos na Tabela 2. Maiores valores (P<0,05) de US foram observados nos tratamentos controle e nas dietas contendo SC e OS. Os valores de UL seguiram o mesmo padrão, com menor valor para a dieta com GSF.

Tabela 2 - Concentrações médias de uréia sérica (US), N-uréia sérica (NUS), uréia no leite (UL), N-uréia no leite (NUL) e relação NUL/NUS obtidas para as dietas experimentais

Item	Dieta					CV (%)
	C	SC	OS	GS	GSF	
US (mg/dL)	44,10 ^a	43,00 ^{ab}	40,70 ^{ab}	38,10 ^b	30,00 ^c	10,86
NUS (mg/dL)	19,67 ^a	19,18 ^{ab}	18,15 ^{ab}	16,99 ^b	13,38 ^c	10,86
UL (mg/dL)	35,23 ^a	38,03 ^a	34,10 ^a	35,00 ^a	25,60 ^b	11,15
NUL (mg/dL)	15,71 ^a	16,96 ^a	15,21 ^a	15,91 ^a	11,42 ^b	11,15
NUL/NUS	0,80 ^b	0,90 ^{ab}	0,84 ^{ab}	0,93 ^a	0,87 ^{ab}	10,78

C= Controle; SC = Sabão de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS= óleo de soja; GS = Grão de Soja cru moído, GSF = Grão de soja tratada com formaldeído;

Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem ($P > 0,05$) pelo teste Tukey

CV = coeficiente de variação (%)

O nível de nitrogênio uréico no leite reflete o nível de nitrogênio uréico no sangue. Gustafsson & Palmquist (1993) observaram correlação positiva entre a concentração de amônia no fluido ruminal e a concentração de uréia no sangue. Pehrson (2002), citando Oltner e Wiktorsson (1983) relata que vários autores têm encontrado forte correlação entre as concentrações de uréia no sangue e no leite. A concentração de uréia no sangue e no leite são afetadas não apenas pelo consumo de proteína digestível proveniente da dieta, mas também pelo balanço entre as quantidades de energia fermentável e proteína na dieta (Carlsson & Bergstrom, 1994).

Valores normais de uréia no leite oscilam entre 12 a 17 mg/dL. Níveis elevados de uréia no leite, acima de 17 mg/dL, indicam que pode estar havendo distúrbios metabólicos e comprometimento do desempenho animal. O excesso de amônia transformada em uréia pode alterar o metabolismo intermediário, influenciando nas concentrações de glicose e ácidos graxos livres no sangue tornando os animais mais susceptíveis à cetose.

Todos os tratamentos apresentaram valores de NUL dentro desta faixa e a relação NUL/NUS encontra-se dentro dos parâmetros aceitáveis de 0,8 a 0,9 (Pehrson, 2002), com exceção do tratamento contendo GS, indicando que a substituição parcial de energia fermentável do concentrado por energia não fermentável proveniente dos lipídeos, independente da fonte, não influenciou estes parâmetros. Provavelmente, a elevada participação de concentrado na dieta tenha mascarado estes efeitos. Carvalho (2000) comenta que teores de proteína no leite abaixo de 3%, aliado a valores de NUL abaixo de 12,00 mg/dL (2,98% de proteína no leite e

11,42% de NUL para o tratamento GSF) indicam deficiência de proteína na dieta e ou deficiência de proteína degradável no rúmen. Neste sentido a complexação com formaldeído pode ter diminuído o aporte de proteína degradável no rúmen, influenciando no metabolismo protéico.

Na Tabela 3 estão contidos os valores médio diários para excreção de alantoína e ácido úrico, bem como as estimativas de síntese de proteína microbiana. Os animais alimentados com fontes lipídicas excretaram menos alantoína ($P < 0,05$) na urina (ALAU) e apresentaram menores valores estimados de compostos nitrogenados microbianos (Nmic) em relação à dieta controle.

Os ácidos nucleicos são derivados diretamente da dieta, dos microrganismos ruminais e do catabolismo endógeno. Porém, a grande maioria de derivados de purina excretada é derivada dos microrganismos ruminais (Giesecke et al., 1994). Mais de 90% da alantoína excretada é via urina e tem sido utilizada como forma indireta de estimar a produção de proteína microbiana no rúmen. Vários estudos têm demonstrado relação não linear entre alantoína no leite e produção de leite e estreitas correlações entre consumo de energia fermentescível dietética e de matéria seca, embora haja grande variação na concentração de alantoína no leite (Pehrson, 2002).

Tabela 3 - Médias diárias das excreções de alantoína na urina (ALAU) e no leite (ALAL), ácido úrico na urina (AU), purina totais (PT), purinas absorvida (PA), e compostos nitrogenados microbianos (Nmic) obtidas para as dietas experimentais.

Item	Dieta					CV (%)
	C	SC	O	GS	GSF	
ALAU (mmol/dia)	311,49 ^a	162,63 ^b	204,86 ^b	230,24 ^b	221,82 ^b	26,04
ALAL (mmol/dia)	50,94 ^{ab}	43,15 ^b	49,70 ^{ab}	20,22 ^c	31,92 ^{bc}	36,73
AU (mmol/dia)	22,41	19,63	21,91	28,07	22,72	35,87
PT (mmol/dia)	401,32 ^a	225,42 ^b	269,48 ^b	278,53 ^b	276,46 ^b	22,65
PA (mmol/dia)	384,84 ^a	213,44 ^b	263,21 ^b	276,39 ^b	274,02 ^b	26,63
Nmic (g/dia)	291,78 ^a	155,18 ^b	188,44 ^b	200,95 ^b	199,23 ^b	26,63
Pbmic(g/100gNDT)	15,24 ^a	8,76 ^b	10,99 ^a	11,49 ^a	11,26 ^a	26,07

C= Controle; SC = Sabão de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS= óleo de soja; GS = Grão de Soja cru moído, GSF = Grão de soja moído tratado com formaldeído;

Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem ($P > 0,05$) pelo teste Tukey

CV = coeficiente de variação (%)

As menores excreções de ALAU nos tratamentos com suplementação lipídica leva-nos a inferir que os lipídeos podem ter interferido no padrão de

fermentação ruminal, diminuindo a síntese de compostos nitrogenados (Nmic), independente da natureza da fonte lipídica. Eifert et al. (2005) observou redução da síntese de proteína microbiana, mas não da eficiência de síntese, quando óleo de soja, com ou sem ionóforo foi fornecido às vacas. Suplementos lipídicos ricos em ácidos graxos poliinsaturados geralmente interferem na síntese de proteína microbiana, pelo possível efeito tóxico sobre os microrganismos (Doreau & Ferlay, 1995) ou pela substituição de fontes de energia fermentável (Nagaraja et al., 1997). A substituição de fontes de energia fermentável não parece ser a explicação mais provável, uma vez que a eficiência de síntese microbiana (g Pmic/100g NDT) foi similar entre os tratamentos com fontes lipídicas e o tratamento controle, exceto para o tratamento envolvendo sabão de cálcio. Neste sentido esperava-se maior efeito depressor quando óleo de soja foi adicionado pelo fato deste lipídeo não apresentar nenhuma forma de proteção e ser mais nocivo aos microrganismos, entretanto, não foi o que ocorreu porque o grão de soja, tanto normal, quanto complexado com formaldeído, foram fornecidos na forma moída, anulando a proteção parcial oferecida por grãos de oleaginosas. O sabão de cálcio, considerado gordura inerte, provavelmente, foi solubilizado no rúmen, por ser rico em ácidos graxos poliinsaturados na sua composição.

A eficiência de síntese microbiana similar entre as dietas com lipídeos e a dieta controle pode também ser explicada em função de possível efeito defaunatório da gordura, diminuindo o número de protozoários o que levaria a um aumento do número de bactérias, resultante da diminuição da predação dos protozoários (Jenkins, 1993).

Os valores séricos de glicose, colesterol total (CT), triacilglicérides (TAG), e os valores de colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) são encontrados na Tabela 4. A suplementação com fontes lipídicas não influenciou ($P>0,05$) os níveis de glicose, HDL, VLDL e TAG. Maiores valores ($P<0,05$) de CT e LDL foram observados nas dietas com lipídeos, independente da fonte lipídica.

TABELA 4 - Concentrações médias de glicose (GLI), colesterol total (CT), triacilglicerídeos (TAG), e os valores de colesterol ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL), lipoproteína de alta densidade (HDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL), obtidos para as dietas experimentais

Item	Dieta					CV (%)
	C	M	OS	GS	GSF	
GLI (mg/dL)	52,60	54,70	53,90	51,90	53,40	8,60
CT (mg/dL)	127,80 ^b	165,30 ^a	153,40 ^a	157,10 ^a	158,40 ^a	12,37
LDL (mg/dL)	78,08 ^b	111,06 ^a	99,90 ^{ab}	103,60 ^a	108,46 ^a	19,18
HDL (mg/dL)	46,60	50,80	50,40	50,40	46,60	13,22
VLDL (mg/dL)	3,12	3,44	3,10	3,10	3,34	11,27
TG (mg/dL)	15,60	17,20	15,50	15,50	16,70	11,27

C= Controle; SC = Sabão de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; OS= óleo de soja; GS = Grão de Soja cru moído, GSF = Grão de soja tratada com formaldeído;

Médias seguidas de mesma letra na mesma linha não diferem ($P > 0,05$) pelo teste Tukey

CV = coeficiente de variação (%)

Os níveis de glicose são baixos durante o início de lactação devido ao fato da elevada demanda mamária por glicose para síntese de lactose. As baixas concentrações de glicose estão intimamente relacionadas às baixas concentrações de insulina. Passado a fase inicial de lactação, os níveis de glicose são relativamente constantes e variam entre 60 e 67 mg/dL para vacas adultas da raça holandesa com mais de 24 meses (Pogliane et al. , 2006)

O metabolismo da glicose em ruminantes é feito através da gliconeogênese. Os carboidratos são fermentados no rúmen, obtendo-se ácidos graxos voláteis (acético, propiônico e butírico). O ácido propiônico é metabolizado no fígado e transformado em glicose, sendo responsável por 50% da produção deste elemento. O glicerol (proveniente da lipólise e metabolismo de lipídios) também pode ser utilizado como precursor gliconeogênico.

Há poucas informações disponíveis com relação à influência da suplementação lipídica sobre os níveis de glicose circulante em vacas e se houver, ocorre no início da lactação, não pela suplementação lipídica, mas pela elevada mobilização do tecido adiposo. Afóra esta fase, a influência lipídica sobre os níveis de glicose parece pouco provável, devido ao eficiente controle homeostático que os ruminantes possuem a fim de manter suprimento adequado de glicose para tecidos-chaves que só utilizam glicose como fonte de energia, como a glândula mamária e o cérebro. Poderia

ocorrer influência de suplementação dietética de lipídeos se elevada quantidade de gordura fosse suplementada a ponto de diminuir a quantidade de energia fermentável disponível para os microrganismos e deste modo comprometer a produção de propionato, o principal precursor de glicose em ruminantes. No presente estudo a utilização de lipídeos não influenciou os níveis de glicose circulantes, independente da natureza da fonte. Provavelmente, a elevada participação de concentrado em todas as dietas foi suficiente para garantir um adequado suprimento de propionato para a gliconeogênese no fígado.

Entre as fontes lipídicas utilizadas neste trabalho, nenhuma influenciou os níveis de CT, VLDL, HDL, LDL ou TAG. Em comparação ao controle que não tinha gordura suplementar, os níveis de CT e LDL foram superiores, em decorrência da maior ingestão de ácidos graxos nestes tratamentos. Sabe-se que ácidos graxos poliinsaturados atuam no metabolismo de lipídeos em vacas lactantes, principalmente na redução da síntese de novo de ácidos graxos, o que pode promover alterações nos lipídeos plasmáticos. Yamasaky et al., (2000), observou redução nos níveis de colesterol, leptina e deposição no tecido adiposo branco perirenal em ratos com suplementação de CLA + óleo de girassol em relação ao controle. Contudo, o tratamento controle era suplementado com óleo de girassol sem CLA. Estes autores atribuíram ao *trans*-10, *cis*-12 CLA este efeito, por ser um potente repartidor de nutrientes. Ashes et al., (2002) reportaram que há redução de triglicerídeos e de colesterol total no sangue de animais recebendo óleos ricos em ácidos graxos n-3, principalmente os C₂₀ e C₂₂, muito encontrados em óleos marinhos. Outros autores, porém, não detectaram alterações nos níveis de colesterol quando lipídeos foram adicionados à dieta.

3.4 Conclusões

Das dietas suplementadas com lipídeos em diferentes formas, no nível de 5% da matéria seca, somente o suplemento sabão de cálcio diminuiu a eficiência de síntese microbiana. A relação NUL/NUS não foi afetada pela suplementação lipídica. Os suplementos lipídicos nas suas diferentes formas foram efetivos em promover aumentos do colesterol total no sangue.

3.5 Referências bibliográficas

- AGRICULTURAL AND FOOD RESEARCH COUNCIL. AFRC **Energy and Protein Requirements of Ruminants**. Wallingford, UK: CAB international, 159p., 1993.
- ASHES, J. R. Utilization of rumen protected n-3 fatty acids by ruminants. **In: Recent Developments in Ruminant Nutrition 4**, J. Wiseman, PC Garnsworthy, Nottingham University Press, 600p., 2002.
- 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**. Rowett Research Institute. Aberdeen, UK. (occasional publication). 21p., 1992.
- CARVALHO, M.P., Manipulando a composição do leite: proteína I curso on line sobre qualidade do leite. **Milkpoint**, 15 p., 2000.
- CARLSSON, J., BERGSTROM, J. The diurnal variation of urea in cow`s milk and how milk fat content, storage and preservation affects analyses by a flow injection technique. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 35, p. 67 – 77, 1994.
- CLARK, J. H. Lactacional responses to postruminal administration of proteins and amino acids. **Journal of Dairy Science**, v. 58, p. 1178-1197, 1975.
- CLEGG, R.A.; BARBERA, M.C.; POOLEYA, L. et al. Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. **Livestock Production Science**, v. 70, p. 3–14, 2001.
- DOREAU, M., CHILLIARD, Y. Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, v. 78, suppl 1, p. 15 – 35, 1997.
- DOREAU, M., FERLAY, A. Effect of dietary lipidson the ruminal metabolism in the rumen: A review. **Livestock Production Science**, v. 43, p. 97 – 110, 1995.
- EIFERT, E.C., LANNA, R.P., LEÃO, M.I., et al. Efeito da combinação de óleo de soja e monensina na dieta sobre o consumo de matéria seca e a digestão de vacas lactantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 297 – 308, 2005.
- GAGLIOSTRO, G.A., CHILLIARD, Y. Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 2 Voluntary intake, milk production and composition. **Journal of Dairy Science**, v. 74, 499–509, 1991.
- GARNSWORTHY, P.C. Fat in dairy cow diets. **In: Recent Developments in Ruminant Nutrition 4**, J. Wiseman, PC Garnsworthy, Nottingham University Press, 600p., 2002.

- GIESECKE, D.; EHRENTREICH, L.; STANGASSINGER, M. et al. Mammary and renal excretion of purine metabolites in relation to energy intake and milk yield in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 2376 – 2381, 1994.
- GUSTAFSSON, A. H.; PALMQUIST, D. P. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea, and milk urea in dairy cows at high and low yields. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 475-484, 1993.
- HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: **The Rumen Microbial Ecosystem**. Hobson e Stewart, editores. Glasgow: Blackie Academic & Professional. p.382-426. 1997.
- JENKINS, T. C.; PALMQUIST, D. L. Effect of added fat and calcium on in vitro formation of insoluble fatty acid soaps and cell wall digestibility. **Journal of Animal Science**, v. 55, p. 957-963, 1982.
- JENKINS, T. C.; JENNY, B. F. Effect of hydrogenated fat on feed intake, nutrient digestion, and lactation performance of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p.2316-2324, 1989.
- JENKINS, T.C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**. v.76 , n.12, p.3851- 3863. 1993.
- McALLAN, A.B., KNIGHT, R., SUTTON, I.D. The effect of free and protected oils on the digestion of dietary carbohydrates between the mouth and duodenum of sheep. **British of Journal Nutrition**, v. 49, p. 433, 1983.
- NAGAJARA, T.G., NEWBOLD, C. J.; VAN NEVEL, C. J. et al. Manipulation of ruminal fermentation. In: HOBSON & STEWART (Eds). **The rumen microbial ecosystem**. 2. Ed. Great Britain: Blackie Academic & Professional, p. 523-632, 1997.
- OVERTON, T. R.; DRACKLEY, J. K.; OTTEMANN-ABBAMONTE, C. J. et al. Emmert demand in ruminant. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose. **Journal of Animal Science**. 77:1940-1951, 1999.
- PALMQUIST, D. L., CONRAD, H. R. High fat rations of dairy cows. Effects of feed intake, milk and fat production, and plasma metabolites. **Journal of Dairy Science**, v.61, p. 890-901, 1978.
- PEHRSON, B Milk analysis, nutritional and disease status of dairy cows. In: **Recent Developments in Ruminant Nutrition 4**, J. Wiseman, PC Garnsworthy, Nottingham University Press, 600p., 2002.
- POGLIANI, F.C., AZEDO, M.R., BIRGEL, D.B. Lipidograma de bovinos da raça Holandesa criados no estado de São Paulo: Valores de referência e influência dos fatores etários e sexuais. Disponível em http://www.biologico.sp.gov.br/biologico/v68_supl_raib/185.pdf

- SALFER, J. A.; LINN, J. O.; OTTERBY, D. E.; et al. Early Lactation Responses of Holstein Cows Fed a Rumen-Inert Fat Prepartum, Postpartum, or Both. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 368-377, 1995.
- SANTOS, F.A.P. Metabolismo de proteínas **In: Nutrição de Ruminantes**, Telma Teresinha Berchielli, Alexandre Vaz Pires, Simone Gisele de Oliveira (Ed.) – Jaboticabal: Funep, 583 p., 2006.
- SILVA, D.J.; QUEIROZ, A C. **Análise de alimentos: Métodos químicos e biológicos**. 3ª ed. Viçosa- MG: UFV.235 p, 2002.
- SILVA, M.M.C. **Suplementação de lipídios em dietas para cabras leiteiras**. Viçosa: UFV, 108p. (Tese – Doutorado em Zootecnia), 2005.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM. SAS. **User's Guide: Statistics**. Version 8.0. NC: SAS INSTITUTE, 1999.
- VALADARES, R.F.D., BRODERICK, G.A., VALADARES FILHO, S.C. et al. Effect of replacing alfafa silage with high moisture corn on ruminal protein synthesis estimated from excretion of total purine derivatives. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2686-2696, 1999.
- VERBIC, J., CHEN, X.B., MACLEOD, N.A. et al. Excretion of purine derivatives by ruminants. Effect of microbial nucleic acid infusion on purine derivative excretion by steers. **Journal of Agricultural Science**, 114 (3): 243-248, 1990.
- YAMASAKI, M., MANSO, K., OGINO, Y. et al. Acute reduction of serum leptin level by dietary conjugated linoleic acid in Sprague-Dawley rats. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 11, p. 467 – 471, 2000

Considerações Finais

A suplementação lipídica das dietas de vacas leiteiras em diferentes formas, no nível de 5% de matéria seca, deprime o consumo de matéria seca e dos nutrientes, exceto para o consumo de extrato etéreo, porém não influenciam a produção de leite. Os teores de gordura do leite são influenciados negativamente pela suplementação lipídica, independente da forma, seja livre, inerte, parcialmente protegida ou protegida. O suplemento óleo de soja fornecido na forma livre reduziu a digestibilidade da FDN e CHOT.

A suplementação da dieta com fontes lipídicas na forma livre, inerte, ou parcialmente protegida, no nível de 5% da matéria seca, alteraram o perfil de ácidos graxos da gordura do leite, exceto no suplemento GSF, que não foi efetivo em promover mudanças no perfil de ácidos graxos, incluindo o CLA. Os suplementos sabões de cálcio e grão de soja crú moído foram efetivos em reduzir os ácidos graxos de cadeia curta e média e aumentar os ácidos graxos de cadeia longa. Todas as fontes lipídicas promoveram aumento nos níveis de ácidos graxos insaturados.

Avaliando o efeito da suplementação lipídica em dietas para vacas leiteiras, no nível de 5% de matéria seca, pode-se afirmar que, nas formas suplementadas, não houve influência na eficiência de síntese microbiana, exceto para o suplemento de sabão de cálcio, que diminuiu a eficiência de síntese microbiana, levando a inferir possível dissociação dos ácidos graxos em nível de rúmen. A relação NUL/NUS não foi afetada pela suplementação lipídica. Os suplementos lipídicos nas suas diferentes formas foram efetivos em promover aumentos do colesterol total no sangue.

APÊNDICE

Apêndice A

Tabela 1A – Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores referentes ao consumo de matéria seca, em kg/dia (CMS), CMS em relação ao peso vivo, em % (CMS_{PV}) e ao peso metabólico (CMS_{PM}), consumo de fibra em detergente neutro (CFDN) e de FDN em relação ao peso vivo (CFDN_{PV}) e ao peso metabólico (CFDN_{PM})

A	QL	P	T	PESO	CMS	CMS _{PV}	CMS _{PM}	CFDN	CFDN _{PV}	CFDN _{PM}
1	1	1	2	581	14,01	2,41	118,42	4,86	0,84	0,58
1	1	2	1	575	17,31	3,01	147,45	6,70	1,17	0,79
1	1	3	3	571	16,68	2,92	142,78	6,31	1,11	0,74
1	1	4	5	560	15,47	2,76	134,36	5,78	1,03	0,67
1	1	5	4	550	16,03	2,91	141,16	6,55	1,19	0,74
2	1	1	1	500	16,66	3,33	157,54	6,02	1,20	0,64
2	1	2	4	500	15,45	3,09	146,10	6,67	1,33	0,71
2	1	3	2	500	16,70	3,34	157,96	6,48	1,30	0,68
2	1	4	3	500	16,26	3,25	153,79	6,30	1,26	0,67
2	1	5	5	530	16,03	3,03	145,16	6,30	1,19	0,70
3	1	1	4	455	14,33	3,15	145,44	5,31	1,17	0,52
3	1	2	5	465	16,74	3,60	167,15	6,86	1,47	0,69
3	1	3	1	488	18,47	3,79	177,93	6,90	1,41	0,72
3	1	4	2	500	16,68	3,34	157,72	6,30	1,26	0,67
3	1	5	3	520	16,81	3,23	154,41	6,76	1,30	0,74
4	1	1	5	566	16,68	2,95	143,74	6,07	1,07	0,70
4	1	2	3	568	16,70	2,94	143,50	6,72	1,18	0,78
4	1	3	4	570	16,16	2,83	138,50	6,61	1,16	0,77
4	1	4	1	580	17,60	3,03	148,91	6,82	1,18	0,81
4	1	5	2	590	17,04	2,89	142,30	6,91	1,17	0,83
5	1	1	3	500	14,50	2,90	137,09	5,25	1,05	0,56
5	1	2	2	510	15,44	3,03	143,87	6,13	1,20	0,66
5	1	3	5	514	16,09	3,13	149,05	6,14	1,20	0,66
5	1	4	4	525	16,38	3,12	149,34	6,40	1,22	0,70
5	1	5	1	540	17,61	3,26	157,23	6,88	1,27	0,77
1	2	1	1	499	16,39	3,28	155,23	5,85	1,17	0,62
1	2	2	2	505	16,28	3,22	152,84	6,48	1,28	0,69
1	2	3	5	508	17,29	3,40	161,54	6,66	1,31	0,71
1	2	4	3	520	15,84	3,05	145,44	5,90	1,13	0,64
1	2	5	4	540	16,87	3,12	150,61	6,76	1,25	0,76
2	2	1	3	564	15,84	2,81	136,84	5,77	1,02	0,67
2	2	2	5	560	17,53	3,13	152,24	7,01	1,25	0,81
2	2	3	4	554	18,48	3,34	161,83	7,26	1,31	0,83
2	2	4	2	560	16,99	3,03	147,56	6,29	1,12	0,72
2	2	5	1	560	18,97	3,39	164,83	7,57	1,35	0,87
3	2	1	5	565	15,99	2,83	138,01	5,89	1,04	0,68
3	2	2	1	570	18,26	3,20	156,53	7,29	1,28	0,85
3	2	3	3	575	17,39	3,02	148,12	6,70	1,17	0,79
3	2	4	4	585	16,05	2,74	134,95	7,15	1,22	0,85
3	2	5	2	590	15,79	2,68	131,90	6,30	1,07	0,75
4	2	1	4	605	14,23	2,35	116,62	5,63	0,93	0,69
4	2	2	3	590	15,17	2,57	126,74	6,23	1,06	0,75
4	2	3	2	586	16,13	2,75	135,46	6,07	1,04	0,72
4	2	4	1	590	16,48	2,79	137,63	6,27	1,06	0,75
4	2	5	5	605	15,52	2,57	127,23	6,40	1,06	0,78

5	2	1	2	628	14,11	2,25	112,51	4,91	0,78	0,62
5	2	2	4	600	16,71	2,78	137,80	6,78	1,13	0,82
5	2	3	1	600	16,39	2,73	135,18	6,08	1,01	0,74
5	2	4	5	600	15,26	2,54	125,91	5,92	0,99	0,72
5	2	5	3	600	15,94	2,66	131,51	6,39	1,07	0,78

Tabela 2A - Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores referentes aos consumos de proteína bruta (CPB), extrato etéreo (CEE), carboidratos totais (CHOT), carboidratos não fibrosos (CCNF), matéria mineral (CMM), matéria orgânica (CMO) e de nutrientes digestíveis totais (CNDT)

A	QL	P	T	CPB	CEE	CCHO	CCNF	CMM	CMO	CNDT
1	1	1	2	2,52	0,74	9,38	4,55	1,38	12,64	9,81
1	1	2	1	2,97	0,48	12,18	5,53	1,68	15,63	12,25
1	1	3	3	2,62	0,78	11,83	5,56	1,45	15,22	10,68
1	1	4	5	2,56	0,74	10,96	5,22	1,21	14,26	10,10
1	1	5	4	2,51	0,73	11,22	4,71	1,57	14,46	10,65
2	1	1	1	2,96	0,48	11,69	5,72	1,52	15,14	11,15
2	1	2	4	2,42	0,77	10,75	4,12	1,51	13,94	10,52
2	1	3	2	2,62	0,80	11,81	5,38	1,47	15,24	11,20
2	1	4	3	2,56	0,72	11,72	5,46	1,27	14,99	10,56
2	1	5	5	2,55	0,76	11,12	4,86	1,61	14,43	10,68
3	1	1	4	2,41	0,75	9,83	4,56	1,33	13,00	9,98
3	1	2	5	2,71	0,85	11,60	4,79	1,58	15,16	11,17
3	1	3	1	2,99	0,49	13,44	6,60	1,55	16,92	12,65
3	1	4	2	2,78	0,78	11,74	5,48	1,37	15,30	11,30
3	1	5	3	2,73	0,73	11,59	4,87	1,77	15,05	10,59
4	1	1	5	2,82	0,88	11,43	5,41	1,55	15,13	11,36
4	1	2	3	2,83	0,79	11,47	4,79	1,62	15,08	11,05
4	1	3	4	2,39	0,80	11,62	5,05	1,35	14,81	11,03
4	1	4	1	2,85	0,44	12,96	6,18	1,36	16,24	11,93
4	1	5	2	2,74	0,79	11,65	4,79	1,85	15,19	11,93
5	1	1	3	2,53	0,72	9,92	4,71	1,33	13,17	9,44
5	1	2	2	2,61	0,75	10,53	4,44	1,56	13,88	10,92
5	1	3	5	2,49	0,80	11,44	5,34	1,35	14,73	11,07
5	1	4	4	2,59	0,78	11,68	5,33	1,32	15,06	11,30
5	1	5	1	2,93	0,42	12,47	5,64	1,79	15,82	11,73
1	2	1	1	2,88	0,45	11,54	5,74	1,52	14,87	11,29
1	2	2	2	2,75	0,80	11,08	4,65	1,66	14,63	11,56
1	2	3	5	2,62	0,85	12,34	5,73	1,47	15,81	12,13
1	2	4	3	2,62	0,73	11,16	5,30	1,32	14,51	10,37
1	2	5	4	2,68	0,76	11,71	5,00	1,71	15,16	11,81
2	2	1	3	2,75	0,78	10,82	5,10	1,49	14,35	10,08
2	2	2	5	2,88	0,86	12,17	5,22	1,61	15,92	11,68
2	2	3	4	2,78	0,91	13,23	6,02	1,55	16,93	13,00
2	2	4	2	2,80	0,81	11,91	5,67	1,46	15,53	12,02
2	2	5	1	3,12	0,44	13,46	5,95	1,95	17,03	12,87
3	2	1	5	2,68	0,83	11,02	5,17	1,47	14,52	11,20
3	2	2	1	3,10	0,50	12,92	5,68	1,74	16,52	12,59
3	2	3	3	2,77	0,81	12,35	5,70	1,45	15,94	11,92
3	2	4	4	2,57	0,81	11,37	4,26	1,31	14,75	10,86
3	2	5	2	2,61	0,71	10,72	4,47	1,74	14,05	10,68
4	2	1	4	2,32	0,73	9,84	4,25	1,33	12,90	9,35
4	2	2	3	2,55	0,73	10,45	4,26	1,44	13,73	10,19
4	2	3	2	2,59	0,79	11,37	5,34	1,38	14,75	11,30

4	2	4	1	2,71	0,42	11,97	5,75	1,36	15,11	11,53
4	2	5	5	2,48	0,71	10,67	4,31	1,66	13,86	10,14
5	2	1	2	2,51	0,74	9,47	4,60	1,40	12,71	10,01
5	2	2	4	2,72	0,84	11,59	4,85	1,56	15,15	11,51
5	2	3	1	2,69	0,47	11,83	5,79	1,40	14,99	11,87
5	2	4	5	2,44	0,74	10,88	5,00	1,21	14,05	10,63
5	2	5	3	2,62	0,71	10,92	4,57	1,70	14,25	10,79

Tabela 3A - Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores referentes aos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria orgânica (CDMO), da proteína bruta (CDPB), extrato etéreo (CDEE), fibra em detergente neutro (CDFDN), matéria seca (CDMS), carboidratos totais (CDCHO) e dos carboidratos não fibrosos (CDCNF)

A	QL	P	T	CDMO	CDPB	CDEE	CDFDN	CDMS	CDCHO	CDCNF
1	1	1	2	70,94	72,34	87,52	59,03	71,10	69,25	80,27
1	1	2	1	75,06	73,91	77,66	67,34	75,27	75,24	84,90
1	1	3	3	64,95	66,95	77,99	47,47	65,15	63,64	82,15
1	1	4	5	65,65	69,26	75,60	49,13	65,65	64,13	80,89
1	1	5	4	69,03	69,05	68,88	58,13	69,20	69,03	84,35
2	1	1	1	70,33	72,73	77,51	62,52	70,13	69,43	76,75
2	1	2	4	69,72	71,28	78,99	65,65	69,93	68,70	73,69
2	1	3	2	67,92	69,17	81,43	53,95	67,95	66,72	82,21
2	1	4	3	66,04	66,47	68,22	39,82	64,88	65,81	96,02
2	1	5	5	68,82	64,42	74,61	52,48	69,35	69,44	91,64
3	1	1	4	70,73	72,53	80,45	56,88	70,78	69,54	84,42
3	1	2	5	68,00	63,44	76,94	50,86	67,93	68,41	93,79
3	1	3	1	71,80	73,67	72,16	55,09	71,15	71,37	88,53
3	1	4	2	68,29	70,67	83,10	53,47	67,63	66,73	82,11
3	1	5	3	65,35	63,43	77,59	49,76	65,04	65,03	86,44
4	1	1	5	69,13	63,21	77,93	47,59	68,88	69,92	95,24
4	1	2	3	67,83	66,77	78,55	50,04	66,93	67,36	91,89
4	1	3	4	69,01	66,11	76,63	55,81	68,27	69,08	86,61
4	1	4	1	70,92	66,49	67,58	55,38	69,50	72,00	90,51
4	1	5	2	72,78	71,15	84,13	62,39	72,92	72,39	86,97
5	1	1	3	66,15	68,68	77,78	50,20	65,78	64,67	80,94
5	1	2	2	72,88	73,81	82,65	62,51	73,07	71,95	85,11
5	1	3	5	69,79	59,97	74,22	53,54	69,27	71,61	92,57
5	1	4	4	69,96	70,60	74,31	55,77	69,31	69,53	86,19
5	1	5	1	71,80	70,78	61,99	61,63	71,28	72,38	85,62
1	2	1	1	72,78	71,19	75,29	62,26	71,83	73,07	84,18
1	2	2	2	73,03	69,71	84,18	64,99	73,07	73,05	84,38
1	2	3	5	71,51	76,18	73,18	54,99	71,15	70,40	88,50
1	2	4	3	66,60	67,66	72,98	47,91	65,31	65,93	86,16
1	2	5	4	73,17	72,79	71,43	61,22	72,62	73,37	89,96
2	2	1	3	64,63	69,74	79,84	45,03	63,95	62,24	81,85
2	2	2	5	67,85	61,06	76,69	49,78	67,44	68,83	94,67
2	2	3	4	71,12	72,40	79,51	53,17	69,92	70,28	91,10
2	2	4	2	71,64	73,16	83,81	51,05	70,10	70,45	92,15
2	2	5	1	72,77	71,40	77,50	58,61	70,94	72,94	91,34
3	2	1	5	71,22	62,60	79,60	55,43	69,15	72,69	92,53
3	2	2	1	73,46	68,15	64,00	64,34	71,36	75,11	89,06
3	2	3	3	69,69	68,80	74,98	48,56	67,29	69,53	94,42
3	2	4	4	69,18	69,58	61,10	56,13	67,14	69,66	92,64

3	2	5	2	70,70	67,56	79,65	61,48	69,70	70,88	84,23
4	2	1	4	66,61	64,65	78,91	45,83	64,74	66,15	93,26
4	2	2	3	68,94	64,19	75,04	51,38	66,45	69,67	96,70
4	2	3	2	70,81	66,87	82,16	54,38	69,02	70,91	89,88
4	2	4	1	73,87	71,28	61,37	57,20	71,63	74,90	94,35
4	2	5	5	68,27	59,31	72,72	57,03	66,64	70,06	89,59
5	2	1	2	72,39	73,40	83,75	53,69	70,87	71,23	90,10
5	2	2	4	70,12	67,99	81,05	56,53	68,08	69,82	88,59
5	2	3	1	75,82	74,60	79,89	60,90	73,53	75,94	91,86
5	2	4	5	70,77	61,94	69,83	59,60	68,68	72,81	88,56
5	2	5	3	70,18	69,80	84,52	55,82	68,85	69,34	88,43

Tabela 4A - Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores de produção de leite (PL), produção de leite corrigida para gordura (PLC), gordura do leite (GO), proteína do leite (PB), lactose do leite (LC), e sólidos totais (SO)

A	QL	P	T	PL	GO	PLC	PB	LC	SO
1	1	1	2	27,63	2,16	21,63	2,83	4,24	9,99
1	1	2	1	29,03	2,73	25,41	2,88	4,24	10,26
1	1	3	3	24,71	3,27	23,82	3,07	4,10	10,64
1	1	4	5	22,48	2,71	19,59	2,87	4,41	10,46
1	1	5	4	23,86	3,13	22,44	2,89	4,41	11,50
2	1	1	1	25,04	2,88	22,54	3,35	4,74	11,92
2	1	2	4	22,46	3,30	21,75	3,16	4,50	11,86
2	1	3	2	22,26	2,75	19,55	3,29	4,58	11,61
2	1	4	3	21,28	3,05	19,72	3,30	4,47	11,83
2	1	5	5	18,34	3,59	18,63	3,30	4,64	12,57
3	1	1	4	22,91	2,82	20,40	3,13	4,68	11,50
3	1	2	5	24,20	2,90	21,86	2,87	4,37	10,65
3	1	3	1	25,83	2,58	21,98	3,01	4,65	11,04
3	1	4	2	25,00	2,48	20,86	3,13	4,42	10,46
3	1	5	3	24,83	2,82	22,08	3,12	4,49	11,48
4	1	1	5	28,75	2,32	23,26	2,68	4,22	9,91
4	1	2	3	28,48	2,14	22,18	2,97	4,02	9,62
4	1	3	4	22,77	2,57	19,34	2,89	4,08	10,15
4	1	4	1	24,16	2,77	21,33	3,03	4,18	10,94
4	1	5	2	21,46	2,70	18,67	2,93	4,29	11,14
5	1	1	3	21,94	3,31	21,28	3,23	4,49	11,95
5	1	2	2	20,63	2,88	18,55	3,09	4,48	10,82
5	1	3	5	19,68	3,46	19,57	3,17	4,61	11,64
5	1	4	4	19,41	4,09	21,29	3,21	4,52	12,64
5	1	5	1	19,83	4,41	22,79	3,52	4,52	14,26
1	2	1	1	23,00	2,80	20,40	3,10	4,75	11,51
1	2	2	2	21,80	2,35	17,73	3,14	4,66	10,96
1	2	3	5	19,43	2,99	17,82	3,00	4,73	11,36
1	2	4	3	19,03	2,97	17,41	3,22	4,75	12,02
1	2	5	4	17,74	3,82	18,66	3,36	4,80	13,21
2	2	1	3	26,02	2,05	19,91	3,09	4,26	10,24
2	2	2	5	25,46	3,12	23,91	3,05	4,30	11,30
2	2	3	4	24,30	3,06	22,59	3,22	4,36	10,98
2	2	4	2	23,66	2,62	20,28	3,22	4,56	11,36
2	2	5	1	21,68	3,72	22,46	3,35	4,57	12,88
3	2	1	5	27,07	2,39	22,21	2,72	4,34	10,17
3	2	2	1	28,45	2,59	24,28	2,82	4,25	10,62
3	2	3	3	24,63	2,57	20,93	2,88	4,08	10,59

3	2	4	4	23,67	2,55	17,48	2,86	4,13	10,48
3	2	5	2	20,03	2,19	13,41	3,20	4,41	10,65
4	2	1	4	21,07	2,42	17,39	3,04	4,05	10,34
4	2	2	3	19,46	2,11	15,09	3,24	3,94	10,66
4	2	3	2	15,24	2,72	13,31	3,58	3,82	11,28
4	2	4	1	15,68	3,21	14,94	3,38	3,98	11,58
4	2	5	5	13,48	2,72	11,79	3,24	3,65	11,50
5	2	1	2	26,24	2,06	20,12	2,91	4,28	10,04
5	2	2	4	23,23	2,85	20,78	2,99	4,23	10,88
5	2	3	1	21,26	3,07	19,79	3,00	4,34	11,08
5	2	4	5	18,91	3,13	15,91	2,93	4,26	11,23
5	2	5	3	19,17	2,56	14,55	3,15	4,00	10,30

Modelo 1A - Modelo utilizado para estimativa dos parâmetros taxa de passagem (Kp) e o tempo médio de retenção no rumén-retículo (TMRR) para partículas de volumoso.

G3G1 model 16:10 Monday, February 11, 2008						
----- trat=1 anim=1 -----						
The NLIN Procedure						
Dependent Variable: Cr						
Method: Marquardt						
Iterative Phase						
Iter	C	I	k	td	Sum of Squares	
0	14000.0	0.2000	0.0600	9.0000	8657.3	
1	14175.1	0.2222	0.0495	9.3628	8236.0	
7	14214.3	0.2186	0.0515	9.2488	7961.3	
NOTE: Convergence criterion met.						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F	
Model	4	648607	162152	264.78	<.0001	
Error	13	7961.3	612.4			
Uncorrected Total	17	656568				
Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence			
C	14214.3	740.0	12615.6	15813.0		
I	0.2186	0.0388	0.1347	0.3025		
k	0.0515	0.00917	0.0317	0.0713		
td	9.2488	1.2381	6.5742	11.9235		
----- trat=1 anim=2 -----						
The NLIN Procedure						
Dependent Variable: Cr						
Method: Marquardt						
Iterative Phase						
Iter	C	I	k	td	Sum of Squares	
0	12000.0	0.2000	0.0600	7.0000	7112.7	
1	12408.9	0.1732	0.0539	5.7618	3723.1	
4	12382.3	0.1673	0.0573	5.5018	3616.3	
NOTE: Convergence criterion met.						
Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F	
Model	4	423149	105787	351.04	<.0001	
Error	12	3616.3	301.4			
Uncorrected Total	16	426765				
Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence			
C	12382.3	538.7	11208.6	13555.9		

I	0.1673	0.0293	0.1035	0.2312
k	0.0573	0.0126	0.0299	0.0847
td	5.5018	1.2030	2.8808	8.1229

----- trat=2 anim=1 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Cr
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	17000.0	0.2000	0.0350	12.0000	11692.4
1	15449.9	0.1616	0.0446	11.2824	11626.0
11	15522.6	0.1626	0.0487	11.2331	9730.3

NOTE: Convergence criterion met.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Model	4	549833	137458	183.65	<.0001
Error	13	9730.3	748.5		
Uncorrected Total	17	559563			

Li mi ts

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence		
C	15522.6	956.2	13456.9	17588.4	
I	0.1626	0.0353	0.0864	0.2388	
k	0.0487	0.0129	0.0207	0.0766	
td	11.2331	1.7356	7.4835	14.9827	

----- trat=2 anim=2 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Cr
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	17000.0	0.2000	0.0600	9.0000	15899.6
1	17467.3	0.1643	0.0595	7.3442	10294.6
7	17363.3	0.1481	0.0704	6.4970	9297.0

NOTE: Convergence criterion met.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Model	4	948058	237014	331.42	<.0001
Error	13	9297.0	715.2		
Uncorrected Total	17	957355			

Li mi ts

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence		
C	17363.3	764.6	15711.5	19015.0	
I	0.1481	0.0329	0.0771	0.2192	
k	0.0704	0.0251	0.0163	0.1245	
td	6.4970	1.3236	3.6376	9.3564	

----- trat=3 anim=1 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Cr
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	18000.0	0.2000	0.0350	7.0000	10803.4
1	17126.4	0.2205	0.0373	8.3784	9104.0
6	17129.8	0.2239	0.0374	8.4771	9051.7

NOTE: Convergence criterion met.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Model	4	620627	155157	205.70	<.0001
Error	12	9051.7	754.3		
Uncorrected Total	16	629679			

Li mi ts

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence		
-----------	----------	------------------	----------------------------	--	--

C	17129.8	1011.4	14926.0	19333.5
I	0.2239	0.0454	0.1249	0.3228
k	0.0374	0.00642	0.0234	0.0514
td	8.4771	1.4603	5.2955	11.6587

----- trat=3 anim=2 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Cr
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	14000.0	0.1000	0.0600	2.0000	23556.5
1	14381.1	0.0987	0.0475	0.5998	21968.6
9	14972.2	0.1175	0.0367	1.7210	21681.4

NOTE: Convergence criterion met.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Model	4	388546	97136.6	58.24	<.0001
Error	13	21681.4	1667.8		
Uncorrected Total	17	410228			

Parameter	Estimate	Std Error	Approximate	95% Confidence
C	14972.2	1919.1	10826.2	19118.2
I	0.1175	0.0507	0.00799	0.2270
k	0.0367	0.0213	-0.00932	0.0828
td	1.7210	4.3647	-7.7084	11.1504

----- trat=4 anim=1 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Cr
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	15000.0	0.1000	0.0850	1.0000	12451.8
1	14782.8	0.1096	0.0805	2.6605	11419.2
10	14946.1	0.1248	0.0632	3.1023	11269.7

NOTE: Convergence criterion met.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Model	4	596633	149158	172.06	<.0001
Error	13	11269.7	866.9		
Uncorrected Total	17	607902			

Parameter	Estimate	Std Error	Approximate	95% Confidence
C	14946.1	941.2	12912.8	16979.4
I	0.1248	0.0419	0.0342	0.2154
k	0.0632	0.0363	-0.0152	0.1416
td	3.1023	2.1439	-1.5293	7.7339

----- trat=4 anim=2 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Cr
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	16000.0	0.2000	0.0350	5.0000	26404.2
1	15184.5	0.1759	0.0399	4.6225	25834.5
5	15150.3	0.1743	0.0417	4.5777	25628.4

NOTE: Convergence criterion met.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Model	4	577201	144300	73.20	<.0001
Error	13	25628.4	1971.4		
Uncorrected Total	17	602830			

Parameter	Estimate	Std Error	Approximate	95% Confidence
C	15150.3	1011.4	14926.0	19333.5
I	0.1743	0.0454	0.1249	0.3228
k	0.1743	0.00642	0.0234	0.0514
td	4.5777	1.4603	5.2955	11.6587

Li mi ts

C	15150.3	1586.7	11722.4	18578.1
I	0.1743	0.0605	0.0437	0.3049
k	0.0417	0.0153	0.00860	0.0747
td	4.5777	2.9317	-1.7558	10.9112

----- trat=5 anim=1 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Cr
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	12000.0	0.2000	0.0600	6.0000	12665.3
1	12702.9	0.2178	0.0461	6.2495	12019.1
4	12732.4	0.2157	0.0490	6.2357	11452.8

NOTE: Convergence criterion met.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Model	4	530925	132731	150.66	<.0001
Error	13	11452.8	881.0		
Uncorrected Total	17	542378			

Li mi ts

Parameter	Estimate	Std Error	Approximate	95% Confidence
C	12732.4	903.9	10779.7	14685.2
I	0.2157	0.0523	0.1028	0.3287
k	0.0490	0.0114	0.0243	0.0737
td	6.2357	1.7655	2.4216	10.0498

----- trat=5 anim=2 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Cr
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	16000.0	0.2000	0.0350	7.0000	34020.4
1	14774.8	0.1635	0.0459	6.6514	32028.3
9	14410.5	0.1487	0.0611	6.4083	28932.1

NOTE: Convergence criterion met.

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Approx Pr > F
Model	4	594989	148747	66.84	<.0001
Error	13	28932.1	2225.5		
Uncorrected Total	17	623921			

Li mi ts

Parameter	Estimate	Std Error	Approximate	95% Confidence
C	14410.5	1441.8	11295.7	17525.4
I	0.1487	0.0655	0.00726	0.2901
k	0.0611	0.0393	-0.0238	0.1461
td	6.4083	3.0192	-0.1142	12.9309

Modelo 2A - Modelo utilizado para estimativa dos parâmetros taxa de passagem (Kp) e o tempo médio de retenção no rumén-retículo (TMRR) para partículas do farelo de soja.

G2G1 model

17:59 Monday, February 11, 2008

trat=1 anim=1

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Yb
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
------	---	---	---	----	----------------

0	1000.0	0.2000	0.0850	10.0000	71.1400
1	1026.5	0.1569	0.0838	8.9353	34.9461
7	1031.1	0.1587	0.0852	8.7422	30.3134

NOTE: Convergence criterion met.

Parameter	Estimate	Std Error	Approximate	95% Confidence
C	1031.1	39.2760	945.5	1116.6
I	0.1587	0.0391	0.0735	0.2439
k	0.0852	0.0265	0.0275	0.1429
td	8.7422	0.6480	7.3303	10.1542

----- trat=1 anim=2 -----

The NLIN Procedure
Dependent Variable Yb
Method: Marquardt
Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	1000.0	0.2000	0.0600	6.0000	252.1
1	762.3	0.2372	0.0733	7.6622	148.6
7	782.3	0.2657	0.0738	8.0575	134.9

NOTE: Convergence criterion met.

Parameter	Estimate	Std Error	Approximate	95% Confidence
C	782.3	73.3358	623.9	940.7
I	0.2657	0.1116	0.0247	0.5067
k	0.0738	0.0243	0.0213	0.1263
td	8.0575	1.5699	4.6659	11.4491

----- trat=2 anim=1 -----

The NLIN Procedure
Dependent Variable Yb
Method: Marquardt
Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	1000.0	0.3000	0.0850	14.0000	283.4
1	1223.0	0.2745	0.0587	13.1056	173.6
11	1255.1	0.2731	0.0632	12.9880	138.3

NOTE: Convergence criterion met.

Parameter	Estimate	Std Error	Approximate	95% Confidence
C	1255.1	81.6876	1078.7	1431.6
I	0.2731	0.0676	0.1271	0.4191
k	0.0632	0.0119	0.0375	0.0889
td	12.9880	0.8614	11.1272	14.8489

----- trat=2 anim=2 -----

The NLIN Procedure
Dependent Variable Yb
Method: Marquardt
Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	1000.0	0.3000	0.0850	13.0000	551.4
1	1150.6	0.2906	0.0674	12.2333	365.0
7	1386.1	0.2412	0.0551	10.1879	244.8

NOTE: Convergence criterion met.

Parameter	Estimate	Std Error	Approximate	95% Confidence
C	1386.1	117.7	1131.8	1640.4
I	0.2412	0.0680	0.0942	0.3882
k	0.0551	0.0129	0.0273	0.0830
td	10.1879	1.0864	7.8408	12.5350

----- trat=3 anim=1 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Yb
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	1000.0	0.2000	0.0850	9.0000	291.2
1	1243.9	0.2464	0.0495	8.5598	204.1
10	1307.4	0.3371	0.0528	9.7425	98.6239

NOTE: Convergence criterion met.

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence	
C	1307.4	76.4302	1140.9	1473.9
I	0.3371	0.0665	0.1922	0.4820
k	0.0528	0.00692	0.0378	0.0679
td	9.7425	0.6454	8.3363	11.1488

Approximate Correlation Matrix

	C	I	k	td
C	1.0000000	0.3628197	-0.7547573	0.1297752
I	0.3628197	1.0000000	-0.6601204	0.8264580
k	-0.7547573	-0.6601204	1.0000000	-0.3359876
td	0.1297752	0.8264580	-0.3359876	1.0000000

----- trat=3 anim=2 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Yb
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	1000.0	0.3000	0.0600	11.0000	428.1
1	1123.3	0.2804	0.0465	10.4301	393.7
5	1121.0	0.2662	0.0504	10.3401	387.0

NOTE: Convergence criterion met.

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence	
C	1121.0	153.3	789.8	1452.2
I	0.2662	0.1153	0.0171	0.5153
k	0.0504	0.0168	0.0142	0.0867
td	10.3401	1.6541	6.7666	13.9137

----- trat=4 anim=1 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Yb
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	1000.0	0.2000	0.0600	6.0000	144.2
1	1091.1	0.2278	0.0436	5.9140	135.9
17	1130.9	0.3176	0.0403	6.9745	116.1

NOTE: Convergence criterion met.

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate 95% Confidence	
C	1130.9	92.5394	931.0	1330.8
I	0.3176	0.0794	0.1461	0.4891
k	0.0403	0.00662	0.0260	0.0546
td	6.9745	0.9856	4.8453	9.1038

----- trat=4 anim=2 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Yb
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Sum of

Iter	C	I	k	td	Squares
0	1000.0	0.2000	0.0600	9.0000	56.3546
1	966.0	0.1773	0.0599	8.4619	42.4197
11	952.6	0.1464	0.0719	7.8523	41.4190

NOTE: Convergence criterion met.

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate	95% Confidence
C	952.6	50.8124	841.9	1063.3
I	0.1464	0.0482	0.0415	0.2514
k	0.0719	0.0272	0.0127	0.1312
td	7.8523	1.1102	5.4334	10.2713

----- trat=5 anim=1 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Yb
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	1000.0	0.2000	0.0850	8.0000	62.4479
1	1051.9	0.2318	0.0680	8.1967	60.8907
5	1053.3	0.2334	0.0716	8.2505	54.8719

NOTE: Convergence criterion met.

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate	95% Confidence
C	1053.3	48.8084	947.8	1158.7
I	0.2334	0.0463	0.1335	0.3334
k	0.0716	0.0123	0.0450	0.0982
td	8.2505	0.7431	6.6451	9.8560

----- trat=5 anim=2 -----

The NLIN Procedure
 Dependent Variable Yb
 Method: Marquardt
 Iterative Phase

Iter	C	I	k	td	Sum of Squares
0	1000.0	0.2000	0.0850	11.0000	386.4
1	1142.8	0.1658	0.0801	9.9669	241.8
17	1228.3	0.1173	0.1173	8.6093	193.1

WARNING: Step size shows no improvement.
 WARNING: PROC NLIN failed to converge.

Parameter	Estimate	Approx Std Error	Approximate	95% Confidence
C	1228.3	88.6662	1036.8	1419.9
I	0.1173	0.0160	0.0828	0.1518
k	0.1173	0.00978	0.0962	0.1385
td	8.6093	1.6027	5.1469	12.0717

Apêndice B

Tabela 1B – Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácidos graxos de cadeia média (AGCM), ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos insaturados (AGI), ácidos graxos de cadeia ímpar (AGCI), ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), ácidos graxos poliinsaturados (AGPI);

N	QL	P	T	AGCC	AGCM	AGCL	AGS	AGI	AGCI	AGMI	AGPI
1	1	1	2	1,67	35,03	55,82	49,87	42,65	1,32	38,75	3,90
1	1	2	1	2,68	40,78	48,05	60,49	31,02	1,14	27,43	3,59
1	1	3	3	2,74	40,98	45,08	57,32	31,48	1,27	28,74	2,74
1	1	4	5	2,62	40,98	53,72	54,62	42,70	1,38	39,07	3,63
1	1	5	4	2,21	39,48	58,75	59,43	41,01	1,28	37,40	3,61
2	1	1	1	2,91	51,72	39,23	61,65	32,21	1,45	30,10	2,11
2	1	2	4	1,71	35,36	59,13	56,21	39,99	1,13	33,99	6,00
2	1	3	2	1,38	37,29	49,92	51,10	37,49	1,14	34,38	3,11
2	1	4	3	2,13	37,54	54,96	53,34	41,29	1,36	35,05	6,24
2	1	5	5	1,61	41,69	56,71	53,45	46,56	1,30	44,22	2,34
3	1	1	4	1,74	37,97	57,32	53,74	43,29	1,15	40,90	2,39
3	1	2	5	2,57	49,84	37,94	63,39	26,96	1,40	24,07	2,89
3	1	3	1	2,00	37,50	57,30	52,65	44,15	1,27	39,30	4,85
3	1	4	2	2,32	38,90	54,85	55,83	40,24	1,30	34,77	5,47
3	1	5	3	1,84	39,48	56,93	50,13	48,12	1,36	43,92	4,20
4	1	1	5	2,23	31,37	53,41	47,25	39,76	0,89	35,23	4,53
4	1	2	3	1,79	37,42	55,96	53,94	41,23	1,16	37,67	3,56
4	1	3	4	2,08	40,74	50,47	56,57	36,72	1,37	32,36	4,36
4	1	4	1	1,96	37,40	51,12	49,62	40,86	1,25	36,91	3,95
4	1	5	2	2,14	47,50	48,35	59,22	38,77	1,78	35,53	3,24
5	1	1	3	1,84	36,45	56,70	55,21	39,78	1,11	36,13	3,65
5	1	2	2	2,11	37,60	49,07	55,85	32,93	1,13	30,07	2,86
5	1	3	5	2,81	53,68	37,08	63,46	30,11	1,50	28,15	1,96
5	1	4	4	2,29	48,05	43,03	58,17	35,20	1,43	32,07	3,13
5	1	5	1	2,29	36,61	61,05	54,63	45,32	1,19	40,49	4,83
1	2	1	1	3,98	60,41	29,05	69,58	23,86	1,59	21,70	2,16
1	2	2	2	1,53	34,95	56,44	50,67	42,25	1,32	35,01	7,24
1	2	3	5	2,75	51,43	35,79	66,06	23,91	1,96	21,60	2,31
1	2	4	3	1,97	35,85	58,74	53,50	43,06	1,32	37,65	5,41
1	2	5	4	2,08	39,44	52,18	54,08	39,62	1,26	35,14	4,48
2	2	1	3	2,59	44,35	49,58	58,87	37,65	1,33	34,44	3,21
2	2	2	5	1,97	37,47	57,63	51,30	45,77	1,27	41,95	3,82
2	2	3	4	1,67	38,44	50,69	52,14	38,66	1,39	34,99	3,67
2	2	4	2	2,26	48,40	42,37	59,53	33,50	1,54	30,36	3,14
2	2	5	1	3,25	44,45	49,32	60,41	36,61	1,62	33,78	2,83
3	2	1	5	1,70	43,98	43,33	56,32	32,69	1,24	29,36	3,33
3	2	2	1	1,84	38,66	54,12	53,54	41,08	1,34	36,13	4,95
3	2	3	3	2,18	37,64	54,17	57,09	36,90	1,38	31,34	5,56
3	2	4	4	2,00	35,11	57,95	52,83	42,23	1,44	38,56	3,67
3	2	5	2	2,04	39,87	50,97	53,73	39,15	1,48	35,54	3,61
4	2	1	4	2,36	42,51	51,49	57,20	39,16	1,20	35,40	3,76
4	2	2	3	2,88	48,04	42,90	60,51	33,31	1,63	29,80	3,51
4	2	3	2	2,11	36,21	54,79	56,09	37,02	1,27	32,83	4,19
4	2	4	1	2,73	35,13	59,93	57,30	40,49	1,32	36,13	4,36
4	2	5	5	2,21	39,13	54,46	54,83	40,97	1,43	37,82	3,15

5	2	1	2	2,08	41,23	52,79	57,18	38,92	1,28	33,73	5,19
5	2	2	4	1,74	40,46	49,54	53,44	38,30	1,34	34,51	3,79
5	2	3	1	2,11	36,97	56,48	57,58	37,98	1,25	33,91	4,07
5	2	4	5	2,09	33,86	58,22	49,37	44,80	1,40	39,76	5,04
5	2	5	3	2,47	42,47	52,53	56,82	40,65	1,48	35,97	4,68

Tabela 2B – Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores referentes, em percentual dos ácidos graxos capríco (C_{6:0}), caprílico (C_{8:0}), cáprico (C_{10:0}), láurico (C_{12:0}), tridecanóico (C_{13:0}), mirístico (C_{14:0}), miristoléico (C_{14:1}) e pentadecanóico (C_{15:0})

N	QL	P	T	C _{6:0}	C _{8:0}	C _{10:0}	C _{12:0}	C _{13:0}	C _{14:0}	C _{14:1}	C _{15:0}
1	1	1	2	0,48	0,11	1,08	1,59	0,04	7,12	0,57	0,67
1	1	2	1	0,91	0,04	1,73	2,36	0,06	9,30	0,60	0,70
1	1	3	3	0,92	0,09	1,73	2,22	0,05	8,43	0,74	0,71
1	1	4	5	0,54	0,06	2,02	1,99	0,06	8,62	0,90	0,79
1	1	5	4	0,50	0,07	1,64	2,16	0,03	6,97	0,53	0,70
2	1	1	1	1,15	0,15	1,61	2,53	0,09	12,44	1,07	0,93
2	1	2	4	0,60	0,03	1,08	1,61	0,05	7,53	0,62	0,63
2	1	3	2	0,38	0,07	0,93	1,82	0,05	5,56	0,61	0,63
2	1	4	3	0,60	0,05	1,48	2,11	0,07	7,99	0,71	0,74
2	1	5	5	0,41	0,08	1,12	2,00	0,03	6,93	0,56	0,75
3	1	1	4	0,63	0,05	1,06	1,68	0,04	7,75	0,51	0,63
3	1	2	5	0,86	0,06	1,65	2,12	0,06	11,77	0,79	0,86
3	1	3	1	0,79	0,08	1,13	2,55	0,05	7,25	0,71	0,68
3	1	4	2	0,51	0,06	1,75	2,68	0,07	8,58	0,75	0,72
3	1	5	3	0,52	0,09	1,23	1,81	0,03	6,09	0,66	0,74
4	1	1	5	0,79	0,05	1,39	1,30	0,03	6,35	0,57	0,48
4	1	2	3	0,62	0,02	1,15	1,82	0,04	8,42	0,52	0,64
4	1	3	4	0,62	0,09	1,37	1,97	0,06	7,83	0,86	0,78
4	1	4	1	0,73	0,07	1,16	1,91	0,04	7,83	1,04	0,69
4	1	5	2	0,29	0,06	1,79	1,63	0,06	8,64	0,71	0,99
5	1	1	3	0,62	0,05	1,17	1,75	0,04	7,63	0,64	0,58
5	1	2	2	0,81	0,04	1,26	1,95	0,04	8,62	0,48	0,65
5	1	3	5	0,76	0,06	1,99	2,82	0,07	9,88	0,97	0,92
5	1	4	4	0,72	0,07	1,50	2,88	0,07	10,81	0,95	0,82
5	1	5	1	0,90	0,06	1,33	1,85	0,03	5,90	0,62	0,62
1	2	1	1	1,39	0,12	2,47	3,09	0,11	15,44	1,02	1,10
1	2	2	2	0,50	0,05	0,98	1,51	0,05	7,07	0,48	0,71
1	2	3	5	0,90	0,08	1,77	2,10	0,11	11,74	0,75	1,22
1	2	4	3	0,56	0,05	1,36	1,95	0,06	8,03	0,47	0,72
1	2	5	4	0,67	0,05	1,36	1,73	0,04	7,45	0,67	0,68
2	2	1	3	0,86	0,10	1,63	2,30	0,06	9,49	0,67	0,84
2	2	2	5	0,53	0,06	1,38	1,58	0,05	8,17	0,74	0,74
2	2	3	4	0,55	0,07	1,05	1,71	0,05	8,32	0,76	0,78
2	2	4	2	0,84	0,06	1,36	2,36	0,07	11,55	0,97	0,93
2	2	5	1	1,13	0,07	2,05	2,29	0,05	9,07	0,97	0,88
3	2	1	5	0,53	0,04	1,13	1,87	0,04	9,27	0,67	0,77
3	2	2	1	0,78	0,06	1,00	2,54	0,05	7,33	0,62	0,71
3	2	3	3	0,69	0,10	1,39	1,95	0,06	8,45	0,47	0,75
3	2	4	4	0,54	0,06	1,40	2,13	0,07	8,37	0,56	0,82
3	2	5	2	0,59	0,08	1,37	2,13	0,07	7,98	0,67	0,77
4	2	1	4	0,67	0,06	1,63	2,45	0,06	10,00	0,73	0,74
4	2	2	3	0,75	0,10	2,03	1,99	0,07	10,90	0,86	0,93
4	2	3	2	0,65	0,06	1,40	2,02	0,05	8,33	0,56	0,71
4	2	4	1	0,87	0,06	1,80	2,40	0,05	7,01	0,71	0,72

4	2	5	5	0,68	0,08	1,45	1,92	0,06	7,19	0,69	0,73
5	2	1	2	0,61	0,04	1,43	2,09	0,06	8,94	0,54	0,75
5	2	2	4	0,55	0,06	1,13	1,77	0,04	8,19	0,78	0,74
5	2	3	1	0,64	0,08	1,39	1,99	0,06	8,08	0,98	0,68
5	2	4	5	0,44	0,05	1,60	2,22	0,04	6,29	0,59	0,74
5	2	5	3	0,75	0,07	1,65	2,17	0,07	8,67	0,87	0,81

Tabela 3B – Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores referentes, em percentual dos ácidos graxos palmítico (C_{16:0}), palmitoléico (C_{16:1}), heptadecanóico (C_{17:0}), heptadecanoléico (C_{17:1}), esteárico (C_{18:0}), oléico (C_{18:1}); linoléico (C_{18:2}), ácido linoléico conjugado (CLA) e outros não identificados (OUT)

N	QL	P	T	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{17:0}	C _{17:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	CLA	OUT
1	1	1	2	23,67	1,37	0,48	0,13	14,63	36,68	3,56	0,55	7,17
1	1	2	1	27,19	0,57	0,31	0,07	17,89	26,19	3,37	0,22	8,72
1	1	3	3	27,50	1,33	0,38	0,13	15,29	26,54	2,40	0,42	11,12
1	1	4	5	27,11	1,51	0,39	0,14	13,04	36,52	3,24	0,38	2,69
1	1	5	4	28,20	0,89	0,43	0,12	18,73	35,86	3,14	0,31	2,12
2	1	1	1	33,40	1,26	0,37	0,06	8,98	27,71	1,69	0,19	4,11
2	1	2	4	24,32	0,60	0,39	0,06	19,97	32,71	5,38	0,38	4,34
2	1	3	2	27,21	1,41	0,35	0,11	14,10	32,25	2,72	0,71	12,64
2	1	4	3	24,69	1,23	0,41	0,14	15,20	32,97	5,76	0,51	5,34
2	1	5	5	29,93	1,49	0,39	0,13	11,81	42,04	2,15	0,36	1,55
3	1	1	4	26,22	1,14	0,36	0,12	15,32	39,13	2,22	0,34	2,90
3	1	2	5	33,33	0,91	0,40	0,08	12,28	22,29	2,50	0,41	8,43
3	1	3	1	24,84	1,42	0,38	0,16	14,90	37,01	4,66	0,39	4,00
3	1	4	2	24,98	1,12	0,39	0,12	16,09	32,78	4,87	0,40	4,33
3	1	5	3	28,02	2,13	0,40	0,19	11,20	40,94	3,97	0,60	3,38
4	1	1	5	21,78	0,86	0,28	0,10	14,80	33,70	3,90	0,45	13,57
4	1	2	3	25,22	0,76	0,41	0,07	15,60	36,32	3,16	0,67	4,56
4	1	3	4	27,79	1,45	0,39	0,14	15,67	29,91	3,83	0,33	7,01
4	1	4	1	24,16	1,73	0,38	0,14	12,65	34,00	3,57	0,27	9,13
4	1	5	2	33,86	1,61	0,53	0,20	11,37	33,01	2,91	0,34	3,10
5	1	1	3	24,97	0,84	0,38	0,11	18,02	34,54	3,29	0,34	5,43
5	1	2	2	25,19	0,67	0,36	0,08	16,93	28,84	2,52	0,24	11,35
5	1	3	5	37,17	1,85	0,39	0,12	9,40	25,21	1,59	0,33	6,27
5	1	4	4	30,57	1,95	0,38	0,16	10,35	29,01	2,78	0,48	4,30
5	1	5	1	26,66	0,93	0,43	0,11	16,85	38,83	4,47	0,37	2,54
1	2	1	1	38,54	1,11	0,27	0,11	7,05	19,46	1,61	0,23	4,19
1	2	2	2	24,18	0,95	0,43	0,13	15,19	33,45	6,83	0,40	7,09
1	2	3	5	34,52	0,99	0,50	0,13	13,12	19,73	1,87	0,41	8,66
1	2	4	3	23,65	0,97	0,42	0,12	16,70	36,09	5,17	0,36	3,32
1	2	5	4	27,79	1,08	0,42	0,12	13,89	33,27	3,98	0,41	6,39
2	2	1	3	29,91	1,08	0,34	0,09	13,34	32,60	2,88	0,47	3,64
2	2	2	5	25,10	1,09	0,36	0,12	13,33	40,00	3,39	0,50	3,66
2	2	3	4	25,66	1,16	0,42	0,14	13,53	32,93	3,38	0,62	8,77
2	2	4	2	31,03	1,49	0,42	0,12	10,91	27,78	2,74	0,29	5,08
2	2	5	1	29,76	1,43	0,55	0,14	14,56	31,24	2,45	0,17	3,19
3	2	1	5	30,32	1,04	0,35	0,08	12,00	27,57	2,86	0,29	11,17
3	2	2	1	26,03	1,38	0,46	0,12	14,58	34,01	4,64	0,33	6,38
3	2	3	3	25,16	0,80	0,45	0,12	18,09	29,95	5,19	0,53	5,85
3	2	4	4	22,20	0,96	0,43	0,12	16,81	36,92	3,38	0,57	4,66
3	2	5	2	26,78	1,47	0,51	0,13	13,45	33,27	3,16	0,35	7,22
4	2	1	4	27,60	0,93	0,33	0,07	13,66	33,67	3,43	0,44	3,63
4	2	2	3	31,93	1,36	0,47	0,16	11,34	27,42	3,10	0,39	5,10

4	2	3	2	23,75	0,79	0,41	0,10	18,71	31,38	3,52	0,43	7,13
4	2	4	1	23,42	0,82	0,44	0,11	20,53	34,49	3,65	0,19	5,63
4	2	5	5	27,30	1,24	0,52	0,12	14,90	35,77	2,98	0,47	3,90
5	2	1	2	27,99	0,86	0,38	0,09	14,89	32,24	4,92	0,39	3,78
5	2	2	4	27,70	1,24	0,42	0,14	12,84	32,35	3,22	0,63	8,20
5	2	3	1	24,45	0,73	0,41	0,10	19,80	32,10	3,56	0,17	5,28
5	2	4	5	22,58	1,40	0,46	0,16	14,95	37,61	4,47	0,37	7,83
5	2	5	3	28,67	1,21	0,49	0,11	13,47	33,78	4,27	0,57	2,37

Apêndice C

Tabela 1C – Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores em g/dia de nitrogênio ingerido (ING), nitrogênio excretado nas fezes (NFE), urina (NUR) e leite (NLE), balanço de nitrogênio (BAL), nitrogênio endógeno basal (NEB) e nitrogênio retido (Nret)

N	QL	P	T	ING	NFE	NUR	NLE	BAL	NEB	Nret
1	1	2	1	430,18	124,06	142,47	133,77	29,88	43,21	-13,33
2	1	1	1	429,40	129,29	138,12	134,21	27,77	38,91	-11,15
3	1	3	1	430,71	125,92	149,26	124,40	31,13	38,21	-7,08
4	1	4	1	408,76	152,87	128,13	117,13	10,63	43,49	-32,87
5	1	5	1	423,59	136,99	145,58	111,68	29,33	41,22	-11,90
1	2	1	1	416,38	132,69	140,28	114,08	29,33	38,85	-9,52
2	2	5	1	452,30	142,95	158,04	116,20	35,11	42,36	-7,25
3	2	2	1	448,77	158,14	131,23	128,37	31,04	42,93	-11,89
4	2	4	1	389,35	124,68	150,19	84,80	29,69	44,05	-14,37
5	2	3	1	387,24	109,50	148,80	102,05	26,89	44,61	-17,72
1	1	1	2	396,85	111,36	139,43	125,11	20,95	43,55	-22,60
2	1	3	2	404,82	129,07	136,89	117,18	21,68	38,91	-17,23
3	1	4	2	430,31	130,32	150,50	125,20	24,29	38,91	-14,62
4	1	5	2	424,96	126,63	169,55	100,60	28,18	44,05	-15,88
5	1	2	2	404,02	109,27	168,28	101,99	24,47	39,49	-15,02
1	2	2	2	426,27	133,20	163,90	109,52	19,65	39,20	-19,55
2	2	4	2	434,65	120,44	162,47	121,90	29,84	42,36	-12,52
3	2	5	2	404,61	135,56	160,46	87,19	21,39	44,05	-22,66
4	2	3	2	400,75	137,24	154,22	87,29	22,00	43,83	-21,83
5	2	1	2	388,28	106,63	138,45	122,17	21,03	46,17	-25,14
1	1	3	3	377,74	138,54	104,12	121,38	13,70	42,99	-29,29
2	1	4	3	366,29	137,19	106,34	112,36	10,40	38,91	-28,51
3	1	5	3	393,59	159,61	104,64	123,95	5,39	40,07	-34,68
4	1	2	3	408,78	150,27	110,65	135,34	12,53	42,82	-30,29
5	1	1	3	366,56	126,79	114,39	113,39	11,99	38,91	-26,92
1	2	4	3	377,32	135,71	131,98	98,04	11,58	40,07	-28,49
2	2	1	3	398,58	132,95	122,34	128,64	14,66	42,59	-27,93
3	2	3	3	400,58	138,44	135,44	113,50	13,21	43,21	-30,00
4	2	2	3	367,45	146,04	109,71	100,88	10,82	44,05	-33,24
5	2	5	3	377,71	126,41	151,88	86,54	12,88	44,61	-31,73
1	1	5	4	369,13	124,16	129,43	110,33	5,22	41,79	-36,58
2	1	2	4	354,16	111,03	123,48	113,56	6,10	38,91	-32,81
3	1	1	4	356,42	106,00	129,77	114,73	5,91	36,25	-30,34
4	1	3	4	348,90	129,45	109,66	105,29	4,50	42,93	-38,43
5	1	4	4	381,50	121,91	152,95	99,69	6,95	40,36	-33,41
1	2	5	4	396,65	116,69	172,36	95,37	7,31	41,22	-41,22
2	2	3	4	410,04	122,84	156,13	125,19	5,88	42,02	-36,14
3	2	4	4	377,83	124,96	154,96	94,59	3,32	43,77	-40,45
4	2	1	4	341,01	131,17	102,51	102,48	4,85	44,89	-40,04
5	2	2	4	401,55	139,24	147,95	111,13	3,23	44,61	-41,39
1	1	4	5	376,94	125,77	130,81	103,23	17,13	42,36	-25,23
2	1	5	5	376,79	145,34	114,89	96,84	19,73	40,65	-20,92
3	1	2	5	400,25	158,50	111,72	111,13	18,90	36,85	-17,95
4	1	1	5	417,71	165,95	111,86	123,28	16,61	42,70	-26,09
5	1	3	5	365,95	159,27	102,98	99,82	3,88	39,73	-35,85
1	2	3	5	386,95	100,02	168,40	93,26	25,26	39,38	-14,11

2	2	2	5	426,55	179,45	111,53	124,24	11,33	42,36	-31,03
3	2	1	5	398,00	160,54	102,06	117,81	17,58	42,65	-25,06
4	2	5	5	365,63	161,44	116,61	69,88	17,70	44,89	-27,19
5	2	4	5	358,19	148,31	107,03	79,27	23,58	44,61	-21,04

Tabela 2C – Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores em mg/dL de uréia sérica (US), N-uréia sérica (NUS), uréia no leite (UL), N-uréia no leite (NUL) e relação NUL/NUS

N	QL	P	T	US	NUS	UL	NUL	NUL/NUS
1	1	1	2	62,00	27,65	46,59	20,78	0,75
1	1	2	1	59,00	26,31	49,46	22,06	0,84
1	1	3	3	44,00	19,62	40,47	18,05	0,92
1	1	4	5	33,00	14,72	28,07	12,52	0,85
1	1	5	4	53,00	23,64	42,85	19,11	0,81
2	1	1	1	40,00	17,84	27,87	12,43	0,70
2	1	2	4	36,00	16,06	31,08	13,86	0,86
2	1	3	2	41,00	18,29	37,58	16,76	0,92
2	1	4	3	35,00	15,61	32,67	14,57	0,93
2	1	5	5	25,00	11,15	19,24	8,58	0,77
3	1	1	4	49,00	21,85	41,77	18,63	0,85
3	1	2	5	39,00	17,39	28,39	12,66	0,73
3	1	3	1	51,00	22,75	42,42	18,92	0,83
3	1	4	2	45,00	20,07	39,55	17,64	0,88
3	1	5	3	44,00	19,62	34,75	15,50	0,79
4	1	1	5	31,00	13,83	26,50	11,82	0,85
4	1	2	3	41,00	18,29	31,82	14,19	0,78
4	1	3	4	35,00	15,61	43,48	19,39	1,24
4	1	4	1	42,00	18,73	43,57	19,43	1,04
4	1	5	2	37,00	16,50	39,06	17,42	1,06
5	1	1	3	43,00	19,18	27,67	12,34	0,64
5	1	2	2	30,00	13,38	28,72	12,81	0,96
5	1	3	5	20,00	8,92	23,23	10,36	1,16
5	1	4	4	27,00	12,04	27,69	12,35	1,03
5	1	5	1	35,00	15,61	23,21	10,35	0,66
1	2	1	1	45,00	20,07	22,98	10,25	0,51
1	2	2	2	41,00	18,29	32,69	14,58	0,80
1	2	3	5	26,00	11,60	24,08	10,74	0,93
1	2	4	3	39,00	17,39	34,93	15,58	0,90
1	2	5	4	31,00	13,83	28,12	12,54	0,91
2	2	1	3	45,00	20,07	29,98	13,37	0,67
2	2	2	5	32,00	14,27	26,48	11,81	0,83
2	2	3	4	37,00	16,50	37,15	16,57	1,00
2	2	4	2	38,00	16,95	39,15	17,46	1,03
2	2	5	1	39,00	17,39	33,77	15,06	0,87
3	2	1	5	43,00	19,18	34,39	15,34	0,80
3	2	2	1	54,00	24,08	44,73	19,95	0,83
3	2	3	3	41,00	18,29	46,50	20,74	1,13
3	2	4	4	47,00	20,96	39,80	17,75	0,85
3	2	5	2	50,00	22,30	42,47	18,94	0,85
4	2	1	4	36,00	16,06	31,82	14,19	0,88
4	2	2	3	34,00	15,16	29,48	13,15	0,87
4	2	3	2	32,00	14,27	33,72	15,04	1,05
4	2	4	1	42,00	18,73	31,84	14,20	0,76

4	2	5	5	22,00	9,81	18,43	8,22	0,84
5	2	1	2	54,00	24,08	40,85	18,22	0,76
5	2	2	4	30,00	13,38	26,28	11,72	0,88
5	2	3	1	34,00	15,16	32,42	14,46	0,95
5	2	4	5	29,00	12,93	27,24	12,15	0,94
5	2	5	3	41,00	18,29	32,74	14,60	0,80

Tabela 3C – Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores em mg/dL para glicose (GLI), colesterol total (CT), valores de colesterol ligado à lipoproteína de alta densidade (HDL), triacilglicerídeos (TAG), colesterol ligado à lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) e ligado à lipoproteína de baixa densidade (LDL),

N	QL	P	T	GLI	CT	HDL	TAG	VLDL	LDL
1	1	1	2	59,00	175,00	44,00	13,00	2,60	128,40
1	1	2	1	49,00	155,00	40,00	16,00	3,20	111,80
1	1	3	3	43,00	156,00	53,00	14,00	2,80	100,20
1	1	4	5	55,00	171,00	55,00	16,00	3,20	112,80
1	1	5	4	52,00	207,00	64,00	14,00	2,80	140,20
2	1	1	1	62,00	133,00	44,00	10,00	2,00	87,00
2	1	2	4	56,00	188,00	50,00	14,00	2,80	135,20
2	1	3	2	54,00	195,00	55,00	17,00	3,40	136,60
2	1	4	3	53,00	196,00	60,00	12,00	2,40	133,60
2	1	5	5	45,00	209,00	43,00	15,00	3,00	163,00
3	1	1	4	66,00	163,00	45,00	10,00	2,00	116,00
3	1	2	5	57,00	184,00	48,00	21,00	4,20	131,80
3	1	3	1	59,00	145,00	52,00	18,00	3,60	89,40
3	1	4	2	52,00	187,00	60,00	16,00	3,20	123,80
3	1	5	3	56,00	206,00	55,00	19,00	3,80	147,20
4	1	1	5	62,00	168,00	47,00	9,00	1,80	119,20
4	1	2	3	64,00	146,00	60,00	13,00	2,60	83,40
4	1	3	4	42,00	130,00	50,00	14,00	2,80	77,20
4	1	4	1	51,00	108,00	51,00	14,00	2,80	54,20
4	1	5	2	57,00	130,00	56,00	18,00	3,60	70,40
5	1	1	3	56,00	133,00	42,00	14,00	2,80	88,20
5	1	2	2	57,00	135,00	51,00	21,00	4,20	79,80
5	1	3	5	52,00	145,00	55,00	17,00	3,40	86,60
5	1	4	4	45,00	140,00	55,00	18,00	3,60	81,40
5	1	5	1	51,00	115,00	59,00	18,00	3,60	52,40
1	2	1	1	55,00	142,00	47,00	13,00	2,60	92,40
1	2	2	2	48,00	178,00	50,00	18,00	3,60	124,40
1	2	3	5	54,00	200,00	54,00	18,00	3,60	142,40
1	2	4	3	51,00	225,00	55,00	17,00	3,40	166,60
1	2	5	4	47,00	208,00	52,00	19,00	3,80	152,20
2	2	1	3	61,00	105,00	39,00	18,00	3,60	62,40
2	2	2	5	47,00	140,00	30,00	20,00	4,00	106,00
2	2	3	4	51,00	164,00	55,00	21,00	4,20	104,80
2	2	4	2	49,00	164,00	51,00	18,00	3,60	109,40
2	2	5	1	53,00	149,00	50,00	18,00	3,60	95,40
3	2	1	5	54,00	120,00	29,00	18,00	3,60	87,40
3	2	2	1	48,00	108,00	46,00	16,00	3,20	58,80
3	2	3	3	44,00	125,00	40,00	14,00	2,80	82,20
3	2	4	4	42,00	150,00	50,00	15,00	3,00	97,00

3	2	5	2	48,00	236,00	50,00	19,00	3,80	182,20
4	2	1	4	63,00	115,00	43,00	15,00	3,00	69,00
4	2	2	3	59,00	126,00	50,00	18,00	3,60	72,40
4	2	3	2	62,00	140,00	50,00	20,00	4,00	86,00
4	2	4	1	50,00	117,00	38,00	17,00	3,40	75,60
4	2	5	5	57,00	133,00	50,00	16,00	3,20	79,80
5	2	1	2	61,00	113,00	41,00	12,00	2,40	69,60
5	2	2	4	55,00	106,00	40,00	15,00	3,00	63,00
5	2	3	1	48,00	106,00	39,00	16,00	3,20	63,80
5	2	4	5	51,00	114,00	55,00	17,00	3,40	55,60
5	2	5	3	52,00	116,00	50,00	16,00	3,20	62,80

Tabela 4C – Período (P), quadrado (QL), animal (A), tratamento (T) e valores em mmol/dia, das excreções de alantóina na urina (ALUR) e no leite (ALAL), ácido úrico na urina (AU), purina totais (PT), purinas absorvidas (PA), compostos nitrogenados microbianos (Nmic em g/dia) e eficiência de síntese microbiana (PBmic – g/100gNDT)

N	QL	P	T	ALUR	ALAL	ACUR	PT	PA	NMIC	Pbmic
1	1	1	2	118,58	30,34	11,77	160,70	135,46	98,48	6,13
1	1	2	1	331,51	55,94	18,64	406,10	424,58	308,69	15,85
1	1	3	3	171,31	93,28	29,62	294,22	293,24	213,20	12,58
1	1	4	5	235,82	21,40	25,05	282,27	279,94	203,53	12,57
1	1	5	4	305,48	15,33	30,34	351,15	361,68	262,96	15,72
2	1	1	1	279,56	65,12	13,43	358,11	373,41	271,49	14,73
2	1	2	4	163,01	34,20	21,54	218,75	209,46	152,29	9,22
2	1	3	2	175,50	80,47	17,52	273,49	273,86	199,11	11,14
2	1	4	3	243,18	38,95	25,35	307,49	313,86	228,19	13,63
2	1	5	5	276,17	13,96	23,76	313,89	319,26	232,11	13,84
3	1	1	4	140,99	16,35	29,44	186,79	175,13	127,33	7,65
3	1	2	5	152,38	35,70	22,10	210,19	201,92	146,81	8,37
3	1	3	1	363,65	81,56	23,44	468,66	504,34	366,68	19,29
3	1	4	2	167,67	40,61	25,08	233,36	226,65	164,78	9,14
3	1	5	3	228,27	97,71	45,61	371,60	387,85	281,99	16,80
4	1	1	5	274,59	32,84	30,94	338,37	345,53	251,21	13,27
4	1	2	3	228,87	99,05	33,23	361,15	372,18	270,59	15,44
4	1	3	4	202,46	4,33	25,44	232,24	220,38	160,23	9,25
4	1	4	1	292,07	38,71	45,83	376,61	389,54	283,21	14,93
4	1	5	2	116,27	49,59	16,17	182,03	159,93	116,28	6,11
5	1	1	3	174,86	84,83	19,03	278,73	280,03	203,59	12,78
5	1	2	2	177,76	41,06	31,24	250,07	245,59	178,55	10,25
5	1	3	5	259,53	57,60	22,14	339,27	350,25	254,65	14,64
5	1	4	4	163,21	21,25	24,21	208,67	195,82	142,37	8,02
5	1	5	1	265,78	37,29	18,90	321,97	328,05	238,51	12,35
1	2	1	1	443,51	55,54	15,71	514,75	557,77	405,53	21,70
1	2	2	2	107,12	20,45	6,31	133,89	109,26	79,44	4,31
1	2	3	5	205,03	30,51	22,47	258,01	255,08	185,45	9,72
1	2	4	3	146,16	60,96	12,31	219,43	208,83	151,83	9,23
1	2	5	4	281,29	16,04	38,94	336,27	344,87	250,74	13,49
2	2	1	3	261,16	79,18	24,59	364,93	376,91	274,03	16,10
2	2	2	5	257,12	49,07	36,57	342,76	351,10	255,27	13,91
2	2	3	4	237,29	24,28	31,22	292,80	292,75	212,84	10,41
2	2	4	2	152,72	15,16	12,99	180,87	160,64	116,80	6,09
2	2	5	1	370,79	42,79	19,62	433,20	457,51	332,63	16,25
3	2	1	5	297,67	40,58	26,01	364,26	376,05	273,41	14,66

3	2	2	1	195,62	68,70	14,86	279,17	275,60	200,38	10,01
3	2	3	3	216,19	50,72	34,91	301,82	301,90	219,49	11,60
3	2	4	4	224,66	30,98	22,72	278,36	273,60	198,92	11,59
3	2	5	2	110,54	46,74	14,87	172,15	148,31	107,83	6,33
4	2	1	4	239,87	20,05	28,14	288,07	283,65	206,23	13,18
4	2	2	3	189,88	46,75	22,54	259,16	250,67	182,25	11,28
4	2	3	2	240,37	40,45	35,54	316,35	318,23	231,37	12,84
4	2	4	1	220,50	24,76	13,94	259,20	250,72	182,29	9,91
4	2	5	5	132,80	12,83	6,80	152,42	124,07	90,20	5,67
5	2	1	2	259,79	66,64	24,85	351,28	356,45	259,16	15,28
5	2	2	4	344,17	19,35	28,74	392,26	406,57	295,59	16,34
5	2	3	1	351,88	39,00	39,77	430,64	451,73	328,43	17,39
5	2	4	5	127,05	24,75	11,38	163,18	137,06	99,65	5,97
5	2	5	3	188,75	45,61	21,91	256,27	246,59	179,28	10,48
