

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS DE
CADEIA MÉDIA NA EMISSÃO DE METANO,
PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE EM VACAS
LACTANTES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Eduardo Garcia Becker

Santa Maria, RS, Brasil.

2015

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA
MÉDIA NA EMISSÃO DE METANO, PRODUÇÃO E
QUALIDADE DO LEITE EM VACAS EM LACTANTES**

Eduardo Garcia Becker

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Concentração em Produção Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM-RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Zootecnia.**

Orientador: Dr. Julio Viégas

Santa Maria, RS – Brasil.

2015

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Becker, Eduardo Garcia

Suplementação com ácidos graxos de cadeia média na emissão de metano, produção e qualidade do leite em vacas lactantes / Eduardo Garcia Becker.-2015.

90 p.; 30cm

Orientador: Julio Viégas

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, RS, 2015

1. Ácidos graxos saturados 2. Ácidos graxos voláteis
3. Efeito estufa 4. In vitro gás 5. Lipídeos I. Viégas,
Julio II. Título.

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA NA
EMISSÃO DE METANO, PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE EM
VACAS LACTANTES**

elaborada por

Eduardo Garcia Becker

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Zootecnia

COMISSÃO EXAMINADORA:

Julio Viégas, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Lucas Carvalho Siqueira, Dr. (UNICRUZ)

Gilmar Roberto Meinerz, Dr. (UFFS – Campus Cerro Largo)

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2015.

DEDICATÓRIA

A todos que de alguma forma participaram por mais essa etapa concluída.

“O segredo do sucesso é a constância do propósito.”

Benjamin Disraeli

AGRADECIMENTOS

Ao amigo, professor e orientador Dr. Julio Viégas, obrigado pela confiança, compreensão, apoio, ensinamentos e dedicação.

Aos Estagiários, Mestrandos, Doutorandos e amigos do setor de Bovinocultura de Leite (NUPECLE) de Santa Maria e Palmeira das Missões pelo grande apoio, ajuda e dedicação.

Ao Prof. Dr. Rogério Bermudes pela amizade e apoio durante o experimento realizado em Palmeira das Missões.

A todos meus amigos, sem privilegiar nomes, pela amizade, companheirismo e apoio.

Ao laboratório NIDAL/UFSM pelas análises laboratoriais, em especial ao Prof. Laerte e ao amigo Diego, pela amizade e disponibilidade durante as tardes de ajuda, sempre serei grato.

A empresa Nutrifarma[®] pelo apoio e ajuda para desenvolvimento do projeto e experimentos, em especial ao Vilson Mayer.

A empresa Milkparts[®], pelo apoio e fornecimento dos colares para utilização durante o experimento.

A família Acatrolli, que cedeu sua propriedade para realização do trabalho, e ao Med. Vet. Cassius Frick pela sua disponibilidade e paciência.

Ao pessoal do LABRUMEN, Prof. Gilberto Vilmar Kozloski, e seus orientados, pela amizade e pela ajuda na realização das análises laboratoriais.

Ao pessoal do Laboratório de Nutrição Animal – UNESP, Jaboticabal, Prof.^a Ana Paula Sader e do Laboratório do Departamento de solos da UFRGS-RS, Prof. Cimélio Bayer e Paulo Carvalho pela realização das análises cromatográficas.

A minha mãe e meus irmãos pelo apoio e incentivo durante todo o tempo.

Aos meus avós pelo eterno apoio sempre demonstrado.

Aos demais professores do PPGZ-UFSM, pelo convívio e colaboração com a minha formação.

Ao PPGZ pela oportunidade em fazer parte do seu corpo discente.

Ao CNPQ, pela bolsa de estudo concedida durante o mestrado.

A todos que, de forma indireta, colaboraram com este projeto.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

SUPLEMENTAÇÃO COM ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA NA EMISSÃO DE METANO, PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE EM VACAS LACTANTES

AUTOR: EDUARDO GARCIA BECKER

ORIENTADOR: JULIO VIÉGAS

Data de Defesa: Santa Maria, 26 de Fevereiro de 2015.

Aditivos lipídicos utilizados na nutrição de vacas leiteiras podem afetar tanto a composição da gordura do leite, quanto modificar o perfil de ácidos graxos individuais, reduzindo as emissões de metano, tornando-se uma prática sustentável para pecuária leiteira. Para verificar o efeito de um aditivo a base de ácidos graxos de cadeia média (AGCM), contendo ácido capróico, caprílico, cáprico, láurico e mirístico, foram testados quatro tratamentos: CTL (controle, sem suplementação), AGCM20 (5g AGCM), AGCM40 (10g AGCM) e AGCM80 (20g AGCM) na produção *in vitro* gás (Experimento 1) e na dieta de vacas em lactação (Experimento 2). Os frascos foram distribuídos em um delineamento inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo e os animais em um triplo quadrado latino, com quatro animais, quatro períodos, quatro tratamentos, respectivamente. No experimento 1 foram avaliados a produção de gás, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e metano (CH₄); no Experimento 2 os parâmetros produtivos de leite e perfil individual dos ácidos graxos da gordura do leite. Houve redução significativa na produção de gás e metano ($P < 0,05$), alterando o perfil de AGCC na produção *in vitro* gás nos tratamentos AGCM40 e 80 em comparação com o controle. Não foram observados efeitos nos parâmetros produtivos ($P > 0,05$), entretanto, foram observados aumentos lineares de C17:0 e C18:3n6 ($P < 0,05$), nos tratamentos AGCM20 e 80 respectivamente. Foi constatado que o uso de 10 e 20g de AGCM reduz a produção de metano, não alterando a produção de leite.

Palavras-chave: Ácidos graxos saturados. Ácidos graxos voláteis. Efeito estufa. *In vitro* gás. Lipídeos.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Universidade Federal de Santa Maria

SUPPLEMENT WITH MEDIUM CHAIN FATTY ACIDS ON METHANE EMISSION, PRODUCTION AND MILK QUALITY IN COWS LACTATING

AUTHOR: EDUARDO GARCIA BECKER

ADVISOR: JULIO VIÉGAS

Defense's Place: Santa Maria, February 26th of 2015.

Lipid additives used in the nutrition of dairy cows may affect both milk fat composition, as modifying the individual fatty acid profile, reducing methane emissions, becoming a sustainable practice for dairy cattle. To verify the effect of an additive based on medium chain fatty acids (MCFA) containing caproic acid, caprylic, capric, lauric and myristic, four treatments were tested: CTL (control without addition of MCFA), AGCM20 (5g MCFA), AGCM40 (10g MCFA) and AGCM80 (20g MCFA) on *in vitro* production gas (Experiment 1) and in the diet of lactating cows (Experiment 2). The bottles were distributed in a completely randomized design with repeated measurements over time and animals in triple latin square with four animals, four periods, four treatment, respectively. In Experiment 1 evaluated the production of gas, short chain fatty acids (SCFA) and methane (CH₄); in Experiment 2 the productive parameters of milk and individual profile of fatty acids of milk fat. There was a significant decrease in gas production and methane ($P < 0.05$), changing the profile of SCFA production *in vitro* treatment gas in AGCM40 and 80 compared with the control. No effects on productive parameters ($P > 0.05$), however, were observed linear increase of C17:0 and C18: 3n6 ($P < 0.05$) in the treatments AGCM20 and 80 respectively. It has been found that the use of MCFA 10 and 20g reduce the production of methane, without altering milk production and fatty acids of milk.

Keywords: Greenhouse effect. *In vitro* gas. Lipids. Saturated fatty acids. Volatile fatty acids.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 OBJETIVOS E HIPÓTESE	11
2.1 Objetivos geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
2.3 Hipóteses	12
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
3.1 Fontes de gordura na dieta de vacas em lactação	13
3.2 Fermentação ruminal	15
3.3 Produção de metano em ruminantes	18
3.4 Metabolismo dos lipídeos no rúmen	19
3.5 Síntese da gordura do leite	23
3.6 Perfil de ácidos graxos no leite	27
3.7 Funções dos ácidos graxos de cadeia média	29
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
5 CAPÍTULO 1	42
5.1 INTRODUÇÃO	44
5.2 MATERIAL E MÉTODOS	46
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.4 CONCLUSÕES	59
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
6 CAPÍTULO 2	64
6.1 INTRODUÇÃO	66
6.2 MATERIAL E MÉTODOS	68
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
6.4 CONCLUSÕES	84
6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
8 ANEXO	90

1 INTRODUÇÃO

Vários países vêm adotando sistemas de preços diferenciados baseados não só em volume de leite, mas também bonificando produtores rurais com relação à qualidade e a quantidade dos componentes lácteos. A gordura do leite é de grande valor econômico, além de contribuir para a densidade e propriedades físicas do leite, e qualidade organoléptica (HARVATINE et al., 2009) do leite e derivados. Observam-se grandes variações na gordura do leite em comparação a outros componentes (SUTTON, 1989). Dentre as causas dessa variação podemos citar as diferentes raças leiteiras, época do ano e principalmente manipulações dietéticas, sendo esta última passível de alterar os componentes do leite, exigindo uma compreensão da regulação metabólica da síntese da gordura do leite. Relatos na literatura demonstram que a redução na porcentagem da gordura do leite pode chegar até a 46%, decorrente de dietas que contêm altos níveis de grãos e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) (PIPEROVA et al., 2000; PETERSON et al., 2003). Além disso, vários estudos vêm mostrando os efeitos de aditivos na nutrição de vacas leiteiras sobre a composição da gordura do leite (LOCK e BAUMAN, 2004; JENKINS e MCGUIRE, 2006; HARVATINE et al., 2009).

Sempre se busca o aumento de produção e da eficiência produtiva, com um prisma diferenciado em relação à melhoria do perfil nutricional dos produtos alimentares. Leite e produtos lácteos são reconhecidos como importante fonte de nutrientes, energia, proteínas, minerais e vitaminas essenciais na dieta humana (NRC, 2001). A crescente conscientização da saúde humana e de propriedades metabólicas de ácidos graxos do leite (MCGUIRE e BAUMAN, 2002; PARODI, 2002; BAUMAN e GRIINARI, 2003) é parte da motivação para a tentativa de modelar a produção desses ácidos graxos individuais.

Neste sentido, há grande foco na redução de doenças cardiovasculares, buscando a diminuição dos teores dos ácidos graxos saturados (AGS) e o incremento da concentração de ômega-3 e ácido linoleico conjugado (CLA) no leite por causa de seus benefícios potenciais para a saúde humana (LOCK e BAUMAN, 2004). Em contrapartida um estudo de meta-análise realizada em humanos concluiu que o ácido láurico apresentou efeito favorável sobre a taxa de colesterol HDL

(lipoproteína de alta densidade), conhecido popularmente como “colesterol bom”, do que qualquer outro ácido graxo estudado (MENSINK et al., 2003), indicando que leite de ruminantes contendo maiores proporções de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) podem oferecer benefícios em relação à nutrição e saúde humana (HRISTOV et al., 2009).

Diferentes tipos de gorduras são potentes modificadores da fermentação ruminal e podem oferecer uma estratégia nutricional para melhorar a eficiência da dieta fornecida para vacas leiteiras, reduzindo as perdas inerentes ao processo. Contudo, a produção de metano tornou-se um objetivo importante na pesquisa em nutrição de ruminantes. As *Archaeobacterias* e protozoários ruminais vem chamando atenção por serem formadores de gases, em especial o metano, contribuindo diretamente para o aquecimento global (HOOK et al., 2010). Gorduras ricas em ácidos graxos saturados de cadeia média são conhecidos por modificar a fermentação ruminal atuando como supressores da formação de CH₄ (MACHMÜLLER, 2006). Alguns ácidos graxos como caprílico (C8:0), cáprico (C10:0) e láurico (C12:0) são potentes antimetanogênicos através da redução de protozoários ruminais e também da inibição direta da metanogênese ruminal (DOHME et al., 2001; AJISAKA et al., 2002; GOEL et al., 2009). Outros ácidos graxos de comprimento de cadeia mais longa, como os ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), não possuem essas características (DOHME et al., 2001; SOLIVA et al., 2004; ZHANG et al., 2008; HRISTOV et al., 2009).

Assim, o uso de ácidos graxos de cadeia média na dieta de vacas em lactação pode ser uma alternativa afim de aumentar a concentração da gordura do leite, além de modificar o perfil de ácidos graxos do leite, tornando-se uma prática viável também na redução das emissões de metano com impacto no ambiente e na produção leiteira.

2 OBJETIVOS E HIPÓTESES

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do uso de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) contendo ácido cáprico, ácido capróico, ácido caprílico, ácido láurico e ácido mirístico, oriundos de óleos vegetais de palma e coco, na dieta de ruminantes, sobre a produção e qualidade do leite e na produção de gás metano.

2.2 Objetivo específico

Quantificar a produção de ácidos graxos de cadeia curta e produção de metano “*in vitro*”, como parâmetro da atividade fermentativa de micro-organismos ruminais sobre uma dieta basal recebendo, ou não, níveis de AGCM.

Determinar a produção de leite de vacas em lactação suplementadas ou não com níveis de AGCM.

Avaliar a ingestão de matéria seca em vacas em lactação suplementadas, ou não, com níveis de AGCM.

Quantificar os componentes qualitativos (CCS, gordura, proteína, sólidos totais, lactose, ureia) de vacas em lactação suplementadas, ou não, com níveis de AGCM.

Quantificar o perfil de ácidos graxos no leite de vacas em lactação suplementadas, ou não, com níveis de AGCM.

2.3 Hipóteses

Tem-se por hipótese que a adição de AGCM incrementa o percentual de gordura no leite e produção de leite, diminuindo a formação de metano no rúmen em vacas em lactação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Fontes de gordura na dieta de vacas em lactação

Ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos com cadeias de acila compostas por átomos de carbono. Dentre as principais características de ácidos graxos são o comprimento da cadeia, grau de insaturação, geometria da insaturação, ramificação entre outros. As cadeias podem ser saturadas ou insaturadas, lineares ou ramificadas. Todas essas características influenciam suas funções biológicas e a essencialidade dos ácidos graxos (PALMQUIST & MATTOS, 2011). Geralmente, a composição da dieta de vacas leiteiras contém apenas 3% de lipídeos. A suplementação lipídica acima de 5% da matéria seca pode comprometer o consumo (PALMQUIST & JENKINS, 1980), provavelmente por mecanismos regulatórios que controlam a ingestão ou pela capacidade limitada de absorção de lipídeos no rúmen. Todavia, os lipídeos são extremamente importantes, pois eles contribuem diretamente com 75% da gordura do leite e são fontes ricas em energia para ruminantes (PALMQUIST & MATTOS, 2011).

A suplementação com lipídeos na dieta de ruminantes é realizada para aumentar a densidade energética da dieta, e para manipular a fermentação ruminal através da alteração na digestão e absorção de nutrientes (MORAIS et al., 2011), permitindo um maior aporte de energia para a síntese de leite e de seus componentes (STAPLES, 1998). Há diversas fontes de ácidos graxos utilizados nas rações de vacas leiteiras, que são fontes de energia de baixo custo, no qual incluem: 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) (PALMQUIST, 1993). Estas fontes variam em características físicas e químicas que afetam a sua digestibilidade, bem como os efeitos associados sobre o consumo de matéria seca (ALLEN, 2000). Em geral, os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e média (AGCM) apresentam maiores efeitos na fermentação ruminal do que os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) (Nagaraja et al., 1997). Dentre os óleos estudados

podemos citar o óleo de peixe, que é fonte rica em ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), razão da depressão na gordura do leite mesmo em dietas ricas em fibra (BAUMAN & GRIINARI, 2003), como qualquer fonte de AG insaturados quando fornecida em excesso, ao passo que fontes ricas em AG saturados ou mais inertes no rúmen podem aumentar a porcentagem de gordura no leite (PALMQUIST & MATTOS, 2011). A soja contém cerca de 50% de ácido linoleico, a linhaça com 47% de ácido linolênico, e o girassol e a canola são ricos em ácido oleico. Óleos de coco e de palma ricos em AGCM também são potentes manipuladores da fermentação e metabolismo ruminal (HRISTOV et al., 2003). Caroço de algodão integral ou sementes de soja integral tostada podem ser incluídos na ração numa proporção de até 15% da matéria seca (3% gordura suplementar) sem afetar o consumo e a fermentação ruminal. O sebo é mais bioativo no rúmen e não deve exceder 2% da matéria seca, já gorduras reaproveitadas de frituras, por sua vez, devem ser limitadas em 1% da matéria seca em dietas para vacas em lactação (PALMQUIST & MATTOS, 2011).

Ácidos graxos em geral são conhecidos como particularmente tóxicos para a atividade ruminal de alguns protozoários, bactérias celulolíticas e metanogênicas. Foram mostrados como redutores do metabolismo destes protozoários no rúmen, diminuindo a degradabilidade da fibra, e conseqüentemente afetando o consumo de matéria seca (DOHME et al., 2001; DOHME et al., 2004; ODONGO et al., 2007). Apesar dos lipídeos se comportarem de maneira semelhante os ácidos graxos saturados (AGS) são menos prejudiciais à flora microbiana. Já a utilização de ácidos graxos insaturados (AGI) interfere de maneira mais severa no metabolismo ruminal (PALMQUIST & JENKINS, 1980).

Gorduras em geral são viáveis na nutrição de ruminantes como fonte de energia, e no que diz respeito ao uso em vacas em lactação ocorrem respostas variáveis na produção e composição do leite, sendo que essas respostas dependem da dieta basal fornecida (volumoso:concentrado), estágio de lactação, balanço energético, e principalmente a qualidade e composição do ácido graxo utilizado (GRUMMER, 2004). Além disso, ácidos graxos apresentam efeitos associativos sobre a digestão dos nutrientes no rúmen. Mudanças no consumo de matéria seca, teor de gordura do leite e digestibilidade da fibra são indicativos de que há alteração na fermentação ruminal durante a adição de gordura na dieta (NRC, 2001). Observando os diversos benefícios com a suplementação de ácidos graxos na dieta

de vacas em lactação, alguns cuidados devem ser levados em conta durante a suplementação, como o período de adaptação da dieta, por exemplo. Grummer (1990) e Staples et al. (1998) citam que essa adaptação e aceitabilidade de fontes de gordura durante o fornecimento são determinantes para um retorno benéfico no desempenho produtivo dos animais, pois quando se avalia diversas fontes de ácidos graxos em dietas de vacas em lactação, diferentes respostas são esperadas principalmente devido ao tipo e nível de inclusão do ácido graxo. E isso explica em partes a redução no consumo de matéria seca, baixa produção de leite e mudanças nos componentes do leite.

O fornecimento de ácidos graxos pode trazer benefícios quantitativos e qualitativos à produção leiteira, pois conforme PALMQUIST & JENKINS (1980), os mesmos servem como alternativa viável para suprir a demanda energética de vacas leiteiras, além de promover a redução da metanogênese, entretanto, podem afetar negativamente a digestão da fibra quando a suplementação ultrapassa 5% da matéria seca total da dieta.

3.2 Fermentação ruminal

O rúmen apresenta um ecossistema microbiano estável e ao mesmo tempo dinâmico. Além disso, é um sistema aberto e contínuo, que proporciona um ambiente ideal para a manutenção da população microbiana estável, pela contínua evolução em anos de seleção (KOZLOSKI, 2009).

O pH ruminal exerce grande influência sobre o ambiente ruminal por permitir ou não a proliferação de determinadas espécies de micro-organismos que habitam o rúmen, exercendo assim, grande impacto sobre o perfil de fermentação ruminal, além de outras influências, como motilidade e absorção ruminal. Quando há alteração no pH, a permeabilidade desses organismos podem mudar, reduzindo a geração de ATP. Desta maneira, quanto mais baixo é o pH ruminal menor será o crescimento microbiano para gerar energia via fermentação, e conseqüentemente reduzir a geração de ATP. Outro ponto importante que afeta o perfil fermentativo, além do menor crescimento microbiano, é a redução na digestão da celulose (NAGARAJA & TITGEMEYER, 2007).

No ecossistema anaeróbio do rúmen, os micro-organismos fermentam carboidratos e proteínas para obter nutrientes necessários para seu crescimento. Muitos dos produtos finais dessa fermentação, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e a proteína microbiana, são as principais fontes de nutrientes (energia e nitrogênio) para o ruminante. Juntamente com o metano, dióxido de carbono, amônia, calor e material celular formam os produtos finais formados da incompleta oxidação dos alimentos no rúmen. Grande parte da energia consumida pelos ruminantes, cerca de 2 a 12%, pode ser perdida na forma de metano, que é formado no rúmen a partir da fermentação dos carboidratos. Além disso, durante a fermentação anaeróbica das hexoses é produzido o hidrogênio. Este pode ser usado na síntese dos AGCC e também eliminado via formação de metano (BAKER, 1999).

Os AGCC são estruturas hidrossolúveis ímpares e ramificadas, constituídas de um a cinco carbonos e se encontram altamente concentradas no rúmen, e suprem de 60% a 80% do requerimento energético dos ruminantes (GONZALEZ, 2003). Todos os carboidratos, digeridos no rúmen, transformam-se em AGCC, dentre os principais estão os ácidos acético (C2), propiônico (C3) e butírico (C4), também conhecidos como ácidos graxos voláteis (AGV), onde suas concentrações relativas dependem da dieta fornecida (LUCCI, 1997).

O rúmen possui grande capacidade de absorção de ácidos graxos voláteis (AGV) em razão de sua grande superfície e adequado suprimento sanguíneo. Em torno de 70 a 90% do ácido butírico é convertido em β -hidroxibutirato (BHB), via β -hidroxi- β -metilbutiril-CoA, e acetoacetato, que ocorre durante sua passagem pela parede ruminal. Igualmente o ácido propiônico sofre fixação de CO_2 formando succinato, e é utilizado pelo tecido ou em sua maior parte é metabolizado por meio do ciclo de Krebs, para formar a glicose que é o principal precursor da lactose do leite. O acetato, em menor proporção, também é metabolizado no rúmen, dando origem provavelmente aos corpos cetônicos, de forma semelhante ao butirato (CHURCH, 1993; TEIXEIRA & TEIXEIRA, 2001).

A utilização de aditivos na dieta de ruminantes pode alterar o padrão fermentativo, reduzindo a relação acetato:propionato (C2:C3), o que torna o rúmen mais eficiente energeticamente e com menor geração de CH_4 . Segundo Jenkins (1993), o fornecimento de gordura promove variações sobre a fermentação ruminal, e, comparando diferentes fontes, essas variações são atribuídas às estruturas dos lipídeos. Dentre os fatores, o grau de insaturação dos AG pode ser a característica

essencial para tal, isso porque os ácidos graxos insaturados inibem a fermentação ruminal em relação aos ácidos graxos saturados. Ainda, essa característica específica pode ser justificada pelo fato de que a mistura de ácidos graxos saturados e insaturados melhoram a fermentação quando comparada com fontes simples de ácidos graxos insaturados (HARVATINE & ALLEN, 2006).

Essa diminuição na fermentação ruminal causa redução da digestibilidade dos nutrientes da dieta e na degradação da fibra, potencialmente quando ácidos graxos não esterificados (AGNE) são adicionados na dieta de ruminantes (PALMQUIST & JENKINS, 1980; JENKINS, 1993). A digestão de carboidratos estruturais pode ser reduzida em 50%, quando menos de 10% de gordura é adicionada na dieta de ruminantes, e é acompanhada pela redução na produção de metano, hidrogênio, e ácidos graxos voláteis, incluindo baixa razão C2:C3 (JENKINS, 1993).

Quando se diminui a proporção volumoso:concentrado, também diminui a proporção de acetato:propionato (C2:C3) (ANNISON & ARMSTRONG, 1970). A proporção C2:C3 é utilizada para comparar dietas e predizer um valor nutritivo relativo. Em geral, quando na dieta se aumenta os níveis de celulose e hemicelulose em relação aos níveis de carboidratos solúveis e amidos, também se aumenta a proporção C2:C3 (MURPHY et al., 1982).

De acordo com Palmquist (1988), o efeito da adição de AG sobre a degradabilidade ruminal de nutrientes pode ser minimizado se a dieta contiver alta quantidade de volumoso, principalmente porque a forragem tem capacidade de manter o funcionamento normal do rúmen. Isto é, o tipo de volumoso utilizado durante a suplementação de AG promove diferentes efeitos na digestão ruminal (UEDA et al. 2003).

Onetti & Grummer (2004) enfatizam que a utilização de silagem de milho como volumoso causam mudanças na população bacteriana no rúmen, favorecendo o processo de biohidrogenação que causa a formação de CLA (*trans*-10, *cis*-12) reduzindo a síntese de gordura do leite (BAUMMAN & GRIINARI 2001). Além disso, alta proporção de silagem de milho na dieta diminui no rúmen a proporção molar de acetato e reduz a de propionato quando comparadas a dietas ricas em silagem de alfafa, ou dietas com proporções iguais das duas forragens (DHIMAN & SATTER, 1997; ONETTI et al., 2001).

Além do volumoso utilizado durante a suplementação de gordura na dieta, a fase de lactação pode influenciar o padrão de fermentação ruminal. Onetti & Grummer (2004) avaliaram os resultados de 41 experimentos sobre fermentação ruminal em diferentes fases de lactação com a inclusão de sais cálcio de ácidos graxos, sebo e gordura branca hidrogenada, e concluíram que houve redução na relação C2:C3 em vacas no terço médio de lactação em relação ao início da lactação. Segundo os autores, este resultado pode ser explicado pelo aumento da ingestão de matéria seca (IMS) e da taxa de passagem em vacas em início de lactação, o que influencia a degradação da fibra reduzindo a produção total de AGV, especialmente acetato. Com relação à utilização de feno, Elliot et al. (1993) e Ueda et al. (2003) avaliaram a suplementação de gordura em vacas leiteiras no início de lactação e utilizaram feno de gramíneas como principal volumoso nas dietas, e observaram redução na proporção molar de acetato em relação à de propionato.

Algumas fontes de gordura na forma protegida, como os sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa, ou sementes de oleaginosas inteiras ou parcialmente quebradas, possuem efeito inerte sobre a população microbiana ruminal, ou seja, não apresentando toxicidade da gordura nos processos de fermentação ruminal (ALLEN, 2000; PALMQUIST & MATTOS, 2006).

3.3 Produção de metano em ruminantes

Importantes determinações são exigidas por países importadores de produtos de origem animal, onde os sistemas produtivos precisam oferecer mais do que simplesmente alimento. Produtos lácteos são adquiridos com o objetivo de fornecer benefícios diretos (paladar, valor nutritivo, segurança alimentar), e também qualidades indiretas (nível de bem estar, sistema que preserve o ambiente, sustentabilidade ambiental) ao qual não podem ser tratadas isoladamente.

Há muito tempo, ruminantes são grandes vilões na emissão de gases do efeito estufa. No entanto, a queima de combustíveis fósseis é o principal emissor de gases na forma de CO₂, enquanto as atividades agropecuárias contribuem para produção de CH₄ (WHEELER et al., 2008). O metano é um importante gás que contribui para o efeito estufa, além de estar diretamente relacionado à fermentação

ruminal e eficiência dietética e a consequente perda de energia nos sistemas de produção de leite. Este gás é responsável por 6 a 18% da energia bruta da dieta que é perdida durante o processo fermentativo (PEDREIRA & PRIMAVESI, 2006).

Apenas 15% do metano produzido pela agropecuária, combustíveis fósseis e queimadas, possuem contribuição relativa ao efeito estufa (MCT, 2000). Sendo que 22% é gerado por fontes antrópicas da fermentação ruminal representando 3,3% do total de gases do efeito estufa causado pela fermentação ruminal (USEPA, 2000). Segundo Pinedo et al. (2009) apenas 11% do total de metano gerado é de responsabilidade dos bovinos de leite, que contribui com apenas 0,36% de gás CH₄ do efeito estufa.

Bovinos produzem e eliminam metano através da fermentação ruminal, que esta relacionada com o tipo de dieta fornecida, consumo e digestibilidade do alimento. Com isso, existe a possibilidade de redução da produção de metano pela modificação ruminal, que pode ser obtida através de alterações na relação volumos:concentrado, tipo de carboidratos ofertados, uso de aditivos alimentares como por exemplo ionóforos e leveduras (MOHAMMED et al., 2004; PEDREIRA, 2004) que melhoram a digestibilidade e a eficiência energética da dieta (JOHNSON & JOHNSON, 1995). Outro fator importante na redução de metano é o aumento na eficiência dietética e no potencial de produção de leite, onde é necessário um menor número de animais para obtermos um aumento de produtividade.

Outra forma promissora de reduzir a metanogênese decorrente da manipulação ruminal é o uso de suplementação lipídica na dieta, que aumenta a eficiência dietética dos sistemas de produção leiteira, através da menor digestibilidade da fibra e o aumento do conteúdo de ácidos graxos de cadeia curta, efeitos que podem estar relacionados às reduções no crescimento de bactérias e protozoários produtores de metano, aumentando a produção leiteira (JENKINS & MCGUIRE, 2006).

3.4 Metabolismo dos lipídeos no rúmen

Na ingestão de lipídeos no rúmen a partir de constituintes vegetais, sua liberação ocorre através do processo fermentativo dos demais componentes como

carboidratos, proteínas e fibras. Em algumas situações podem passar pelo rúmen sem sofrer alterações, pois não sofrem processo de fermentação no rúmen, mas grande parte destes sofrerá ação por parte das bactérias ruminais.

De uma forma geral, o metabolismo ruminal de lipídios pode ser resumido por dois processos principais, ou seja, ocorre em primeiro lugar a lipólise seguida posteriormente pela biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados. Inicialmente ocorre uma extensa hidrólise dos lipídeos esterificados da dieta liberando ácidos graxos livres (AGL) e glicerol por ação de lipases de natureza extracelular produzidas pelos micro-organismos ruminais (JENKINS, 1993). Processo este conhecido por lipólise, que é, portanto, um pré-requisito para ação das bactérias responsáveis pela hidrogenação que só atuam em ácidos graxos livres. A hidrólise realizada por esses micro-organismos é elevada (>85%), e esse processo pode ser influenciado por diversos fatores, como o pH ruminal, nível e tipo de gordura na dieta e o uso de ionóforos que inibem a atividade bacteriana (DOREAU & CHILLIARD, 1997; HARFOOT & HAZLEWOOD, 1997). Grande parte do processo de hidrólise dos lipídeos da dieta é realizado pelas lipases microbianas, que são enzimas extracelulares produzidas por micro-organismos ruminais gerando ácidos graxos livres (AGL) e glicerol. O glicerol é fermentado rapidamente, produzindo ácido propiônico como produto final (PALMQUIST et al., 1993).

Durante o processo de biohidrogenação ruminal ocorrem mudanças na natureza dos lipídeos da dieta, que consiste na adição de íons de hidrogênio nos ácidos graxos com duplas ligações, transformando AG insaturados em AG saturados, ocorrendo mudanças no perfil de ácidos graxos durante a digestão, acarretando grande variação entre a gordura da dieta e a gordura secretada (BEYERS & SCHELLING, 1993). Este processo pode ser considerado uma estratégia de autodefesa dos micro-organismos ruminais em diminuir a concentração de ácidos graxos insaturados, que são, conseqüentemente, mais tóxicos à população microbiana ruminal. Os ácidos graxos reagem com íons de cálcio insolúveis que, portanto, se tornam atóxicos em nível de rúmen (PALMQUIST & MATTOS, 2006). A biohidrogenação depende das características das fontes de gordura, tempo de retenção da fonte de gordura no rúmen e das características da população microbiana, embora o processo possa ser alto, acima de 90% (ALLEN, 2000).

Após a hidrólise os ácidos graxos se tornam disponíveis para o processo de biohidrogenação, que inicia pela isomerização que converte o ácido graxo linoleico (*cis*-9, *cis*-12 dieno metileno-interrompido) em ácido *cis*-9, *trans*-11 dieno conjugado (ácido linoleico conjugado (CLA) ou ácido rumênico). Este metabólito é intermediário, sendo apenas transitório, e rapidamente hidrogenado a C18:1 *trans*-11 (ácido vacênico), que então é liberado no ambiente ruminal. Os micro-organismos secundários posteriormente hidrogenam a ligação *trans*-11 com a formação do produto final primário da biohidrogenação, o ácido esteárico. Quanto ao ácido linolênico, o processo de biohidrogenação é semelhante. A isomerase produz C18:3 *cis*-9, *trans* 11, *cis* 15, que posteriormente, pode ser hidrogenado conforme Figura 1.

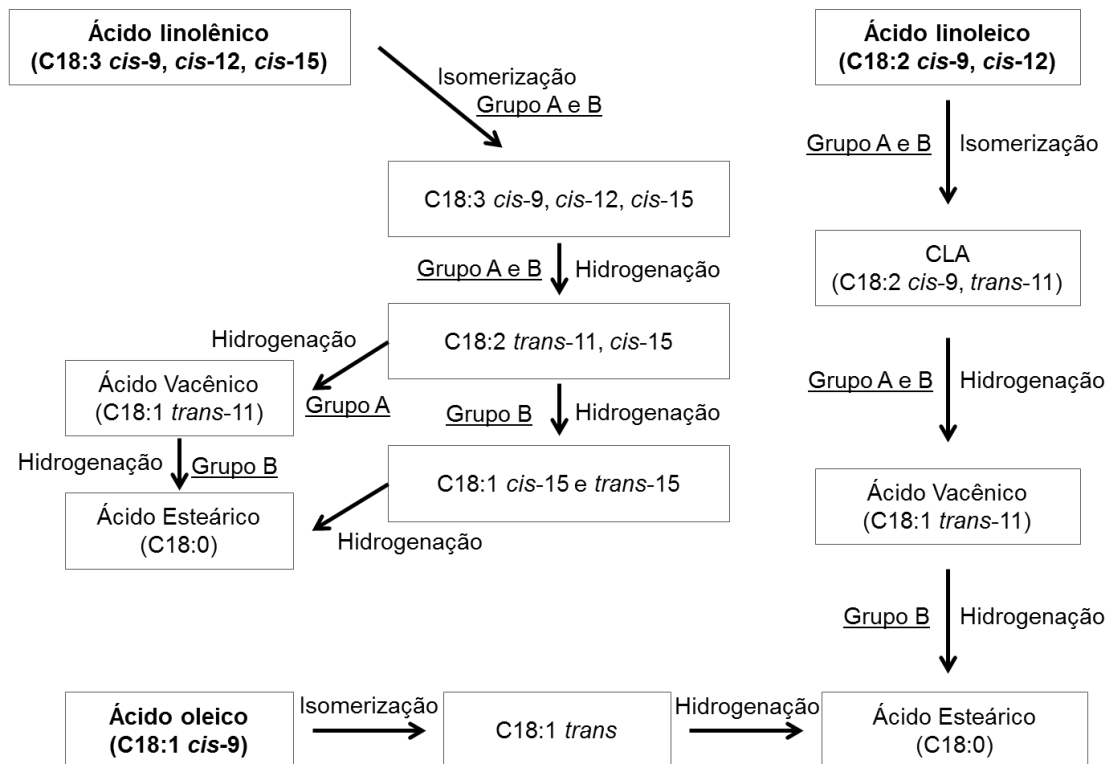


Figura 1. Vias da biohidrogenação dos ácidos linoleico, linolênico e oleico pelos grupos A e B. Adaptado de Davis & Brown (1970).

Vale lembrar que o ácido rumênico (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) não é intermediário da biohidrogenação do ácido linolênico (PALMQUIST & MATTOS, 2011). Se os ácidos graxos insaturados estão em alta concentração no rúmen, o passo final é inibido e a concentração de C18:1 *trans*-11 aumenta. Na maior parte

dos casos, os mecanismos, vias e micro-organismos responsáveis por esse processo ainda não foram determinados e muitos destes ainda são especulativos (PALMQUIST & MATTOS, 2011).

Durante a biohidrogenação dois grupos de bactérias estão envolvidos que são classificadas como A e B, de acordo com o padrão metabólico (KEMP & LANDER, 1984). O grupo A, hidrogena os ácidos linoléico e linolênico somente à C18:1 *trans*-11, já o grupo B, é capaz de hidrogenar ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) à ácido esteárico de acordo com a Figura 1 (KEPLER et al., 1970). Muitas das espécies de micro-organismo parecem ser do gênero *Butyrivibrio* ou outras produtoras de ácido butírico, uma vez que a alta concentração de butirato está relacionada com o processo de biohidrogenação. *Butyrivibrio fibrisolvens* tem sido reconhecida como a principal bactéria responsável pela biohidrogenação de ácidos graxos insaturados no rúmen (KEPLER et al., 1970), e Kim et al. (2002) identificaram que a bactéria ruminal *Megasphaera elsdenii* produz quantidades expressivas de CLA *trans*-10, *cis*-12.

Os ácidos graxos da dieta sofrem mudanças em sua estrutura química e o perfil desses AG é alterado quando passam para o abomaso, devido ao processo de biohidrogenação. Grandes concentrações do ácido esteárico (C18:0) teriam que ser encontradas na digesta abomasal para comprovar a completa biohidrogenação de AG (HARVATINE & ALLEN, 2006). Embora o ácido esteárico seja o principal produto da biohidrogenação ruminal de ácidos graxos insaturados, existem algumas condições que afetam a biohidrogenação. Em dietas suplementadas com óleo de peixe tem sido observada a inibição do último passo da biohidrogenação, o que leva ao acúmulo de ácidos graxos C18:1 *trans* (WACHIRA et al., 2002; SHINGFIELD et al., 2003). Além de condições que diminuem o pH ruminal, dietas ricas em concentrado e a utilização de ionóforos podem inibir o último passo da biohidrogenação (VAN NEVEL & DEMEYER, 1995).

Foi amplamente sugerido que a biohidrogenação ocorria como mecanismo para eliminação de hidrogênio (H^+), contudo, somente 1 a 2% do hidrogênio metabólico é usado para este processo (CZERKAWSK, 1984). Em condições normais de alimentação, a maior parte dos ácidos graxos insaturados ingeridos, linoleico e linolênico, são biohidrogenados acima de 80% (PALMQUIST & MATTOS, 2011). A biohidrogenação aumenta com o grau de insaturação dos ácidos graxos, além disso, a extensão pela qual este processo ocorre depende também da

frequência de alimentação (NRC, 2001). Segundo o NRC (2001) a estimativa de biohidrogenação de AGPI que varia de 60 a 90% pode cair para 30 a 40% quando fornecidos como sais de cálcio de ácidos graxos.

Em todas as espécies a formação de micelas pode ser considerada o principal fator para o processo de solubilização e, portanto, a fase decisiva para a eficiência de absorção intestinal de ácidos graxos (BAUMAN & LOCK, 2006). Ácidos graxos saturados tem solubilidade mais baixa nas micelas e conseqüentemente tem absorção mais baixa do que ácidos graxos insaturados ou de cadeia mais curtas, outro fator importante é que a digestibilidade de lipídeos tende a diminuir quando a ingestão de AG é aumentada e estes são biohidrogenados a ácido esteárico (PALMQUIST & MATTOS, 2006).

Grande parte dos AG, especialmente ácidos graxos de cadeia média (de 10 a 14 átomos de carbono) e AGPI de cadeia longa, são tóxicos aos micro-organismos ruminais, sendo os mais susceptíveis as bactérias Gram (+), metanogênicas e protozoários. A toxicidade dos AG parece estar relacionada aos que tem solubilidade maior em água e membranas celulares, com potencialidade para romper a estrutura das membranas. Portanto, AG que se associam à partícula do alimento nas superfícies hidrofóbicas possuem menor toxicidade aos micro-organismos ruminais, o que explica quando o animal é alimentado com dietas mais ricas em volumoso. Além disso, micro-organismos apresentam o mecanismo de biohidrogenação como uma autodefesa convertendo os ácidos graxos saturados em insaturados, que são conseqüentemente menos tóxicos (PALMQUIST & MATTOS, 2006).

Sendo assim, mudanças no metabolismo ruminal decorrentes de condições dietéticas levam direta ou indiretamente às alterações na produção e composição do leite.

3.5 Síntese da gordura do leite

A gordura do leite é constituída predominantemente de triglicerídeos (acima de 95%) em todos os mamíferos. Os 5% restantes representam as outras classes de lipídeos como os fosfolipídios, colesterol, diacilglicerol, monoacilglicerol e ácidos graxos livres (BAUMAN & GRIINARI, 2003). A composição de ácidos graxos da

gordura do leite tem diferenças entre os mamíferos (BAUMAN & GRIINARI, 2003). A composição da gordura do leite de ruminantes (bovinos) é comparada com as outras espécies na Tabela 1.

Os ácidos graxos da gordura do leite são provenientes basicamente de duas fontes, da absorção de lipídeos circulantes de ácidos graxos pré-formados, e da síntese *de novo* das células da glândula mamária (DILS, 1986). Ácidos graxos de cadeia curta e média, compostos de 4 a 14 carbonos, vêm basicamente da síntese *de novo* (acetato e em menor parte β -hidroxibutirato). Ácidos graxos de cadeia longa (acima de 16 carbonos) são derivados da absorção de lipídeos circulantes (da dieta ou da mobilização de reservas corporais) e os ácidos graxos compostos de 16 carbonos originam de ambas as fontes (BAUMAN & GRIINARI, 2003). Em ruminantes, cerca da metade dos ácidos graxos do leite vem do processo da síntese *de novo*, onde utilizam 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 da metade dos primeiros quatro carbonos para a síntese *de novo* de ácidos graxos em ruminantes (BAUMAN & DAVIS, 1974).

Tabela 1. Comparação da composição dos ácidos graxos do leite (% molar) de ruminantes com outras espécies.

Ácido graxo	Vacas	Humanos	Ratos	Elefante	Lobo Marinho
C4:0	12	-	-	-	-
C6:0	5	<1	<1	1	-
C8:0	2	<1	4	8	-
C10:0	4	2	12	49	-
C12:0	4	4	11	21	-
C14:0	11	6	13	3	7
C16:0	24	21	28	7	23
C16:1	3	6	2	2	11
C18:0	7	3	3	<1	2
C18:1	24	45	16	7	33
C18:2	3	13	10	2	2
C18:3	1	1	1	<1	8
>C18:3	<1	<1	<1	-	15

Adaptado de Jensen (2002).

Os ácidos graxos pré-formados que entram na glândula mamária para serem utilizados na síntese de gordura são derivados de lipoproteínas circulantes e AGNE

que foram originados respectivamente da absorção de lipídeos do trato digestivo e da mobilização de gordura das reservas corporais (BAUMAN & DAVIS, 1974). 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 menos de 10% dos ácidos graxos da gordura do leite. No entanto, vacas que estão em balanço energético negativo, a mobilização das reservas corporais aumenta proporcionalmente com a extensão do déficit de energia (BAUMAN & GRIINARI, 2001).

Perante o processo de síntese da gordura do leite, aspectos históricos na identificação da depressão da gordura do leite (DGL) foram revistos (ERDMAN, 1996; BAUMAN & GRIINARI, 2001). Davis & Brown (1970) dividiram em dois grupos de dietas que causavam DGL. O primeiro são dietas com altos níveis de carboidratos digestíveis e quantidade reduzida de componentes fibrosos. O segundo grupo é composto de dietas com suplementos ricos em AGPI como o óleo de peixe e óleos vegetais.

Diversas teorias foram propostas para explicar a DGL induzida pela dieta, onde alterações na dieta e em processos microbianos ruminais formam a base de todas. Dentre as teorias propostas, diversas foram refutadas, mas 3 em especial continuam a ter suporte científico (DOREAU et al., 1999; BAUMAN & GRIINARI, 2001). A primeira delas é que a DGL é decorrente da produção inadequada de acetato e butirato durante a fermentação ruminal. Além desta, a segunda teoria apresentada é do aumento de propionato, que aumenta a gliconeogênese elevando os níveis de insulina circulante, o que induz uma escassez de precursores para a síntese mamária de gordura do leite. A terceira e mais aceita, conclui que a DGL é decorrente da produção de ácidos graxos através da biohidrogenação ruminal.

Davis & Brown (1970) foram os primeiros a sugerir uma possível relação entre a DGL e os ácidos graxos *trans* octadecenóicos durante a incompleta biohidrogenação ruminal. Posteriormente foi elaborada a teoria dos ácidos graxos C18:1 *trans*-11 por diversos pesquisadores (ASTRUP et al., 1976; ERDMAN, 1999). No entanto inconsistências foram observadas, onde aumentos nos teores de C18:1 *trans*-11 não corresponderam com reduções na gordura do leite (KALSCHEUR et al., 1997; BAUMAN & GRIINARI, 2001). C18:1 *trans*-11 é um produto intermédio da biohidrogenação do ácido linoleico e ácido linolênico (Figura 1). No entanto outros

isômeros C18:1 *trans* são produzidos no rúmen, absorvidos no intestino delgado e incorporados na gordura do leite (CORL et al., 2002; PIPEROVA et al., 2002). Então Griinari et al. (1998) associou o envolvimento de C18:1 *trans*-10 com a DGL em vez dos isômeros em geral de C18:1 *trans*. O ácido graxo C18:1 *trans*-10 é formado via piruvato da redução do CLA *trans* 10, *cis*-12 através de uma via menor da biohidrogenação do ácido linoleico (GRIINARI & BAUMAN, 1999) (Figura 2). Evidências maiores foram fornecidas por Baumgard et al. (2000), quando realizaram infusões abomasais de isômeros puros de CLA e demonstraram que o CLA *trans*-10, *cis*-12 inibe a síntese de gordura do leite, o que não ocorre com o CLA *cis*-9, *trans*-11.

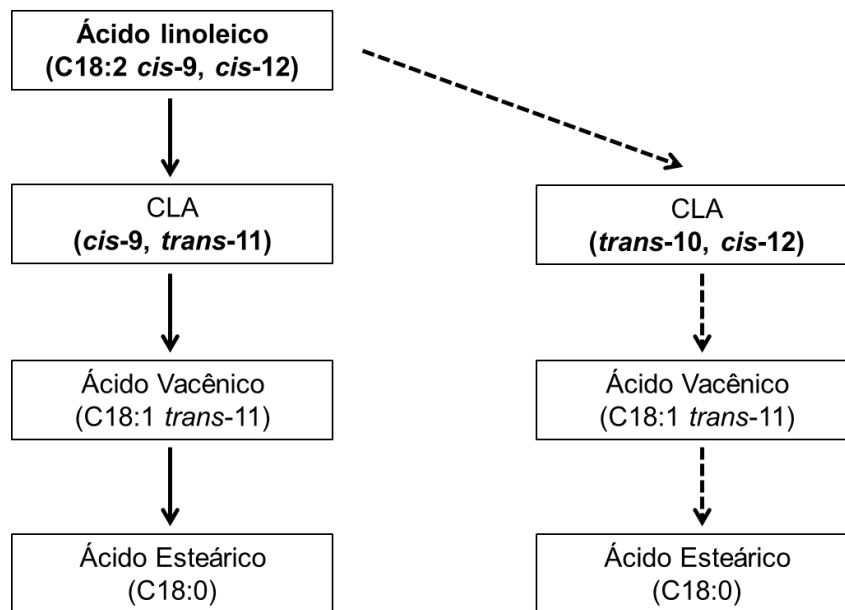


Figura 2. Biohidrogenação ruminal do ácido linoleico e formação de CLA. Adaptado de Griinari & Bauman, (1999).

Então Bauman & Griinari (2001) propôs a "teoria biohidrogenação", onde o conceito básico é que em certas condições dietéticas as vias de biohidrogenação ruminal sofrem alterações e produzem intermediários de ácidos graxos, onde alguns dos quais, e nem todos, são potentes inibidores da síntese de gordura do leite. CLA *trans*-10, *cis*-12 foi o primeiro intermediário identificado e associado com a DGL, mas é evidente que outros são formados no rúmen durante a biohidrogenação sob condições induzidas pela dieta (BAUMAN & GRIINARI, 2003). Assim são

necessárias mais pesquisas para identificar inibidores da gordura do leite, que são produzidos durante a biohidrogenação ruminal, obtendo uma compreensão mais ampla do metabolismo lipídico.

3.6 Perfil de ácidos graxos no leite

Pesquisadores têm usado conhecimento sobre nutrição e metabolismo de lipídeos para modificar o conteúdo e perfil de ácidos graxos em alimentos de origem animal utilizados por humanos. Ao contrário de animais monogástricos, como os suínos, em ruminantes a modificação da composição da gordura é mais complexa devido à influência da biohidrogenação ruminal. No entanto para modificar a composição da gordura do leite em ruminantes é mais rápido e direto (PALMQUIST & MATTOS, 2011).

De acordo com Peres (2001), a gordura do leite é um componente abundante e muito variável, sua concentração e composição sofre maior influência da nutrição e condições ambientais do que as demais frações. É composta primariamente por triglicerídeos que constituem aproximadamente 98% do total da gordura do leite. Outros lipídios estão inclusos na gordura do leite entre estes: diacilglicerídeos (0,25-0,48%); monoacilglicerídeos (0,02-0,4%); glicolipídios (0,006%) e ácidos graxos livres (0,1-0,4%). A diferença mais notável entre a gordura do leite dos ruminantes e dos monogástricos é a porcentagem relativamente alta que os ruminantes apresentam de ácidos graxos de cadeia curta, derivados da síntese *de novo* e com o acetato como principal fonte de carbono (BAUMAN & GRIINARI, 2003). É estimado que a gordura do leite de ruminantes tenha mais de 400 ácidos graxos diferentes, e isto se refere, em grande parte, ao grande metabolismo lipídico que ocorre no rúmen (JENSEN, 2002).

Diversas técnicas continuam a ser desenvolvidas para melhorar o perfil de ácidos graxos do leite como a utilização de aldeído fórmico, além disso, tem se testado o uso de produtos químico não aldeídos, proteínas do soro do leite, amônia ou aminas para proteger fontes lipídicas da biohidrogenação (PALMQUIST & MATTOS, 2011), além de fontes de gorduras com grau de insaturação diferentes.

Novas gorduras foram e estão sendo testadas nos últimos anos para resistir a biohidrogenação e aumentar a concentração de ácidos graxos insaturados no leite (JENKINS & MACGUIRE, 2006). Sais de cálcio de ácidos graxos, comumente conhecidos como “gordura protegida”, na verdade, não são nem protegidas nem *bypass*, uma vez que se misturam ao conteúdo ruminal e seus ácidos graxos são biohidrogenados no rúmen. O correto seriam ser chamados de “inertes”, pois não interferem na atividade microbiana no rúmen, que é uma característica dos produtos com fontes de ácidos graxos insaturados. O que não ocorre com os ácidos graxos saturados e triglicerídeos que possuem baixa atividade inibitória ruminal, mas baixa digestibilidade (PALMQUIST & MATTOS, 2011).

A manipulação da biohidrogenação, além de influenciar a insaturação no tecido adiposo e na gordura do leite em ruminantes, também possui outros objetivos como a alteração do comprimento médio das cadeias acila dos AG. Por exemplo, o uso de ácido palmítico na dieta aumenta o teor desse AG na gordura do leite, resultando numa gordura mais sólida que favorece a produção de derivados de creme de leite (PALMQUIST & MATTOS, 2011). Outro AG importante para aumentar a plasticidade e maciez da gordura do leite, que está relacionado com a qualidade da manteiga, é o ácido oleico (JENKINS & MACGUIRE, 2006).

Atualmente, se busca o aumento dos teores de CLA (ácido linoléico conjugado), por ser um nutracêutico. Acreditava-se que a origem de CLA (ácido rumênico) fosse decorrente apenas do resultado da biohidrogenação ruminal incompleta, mas hoje, sabe-se que sua maioria resulta da atividade endógena da dessaturação do ácido graxo C18:1 *trans*-11 (ácido vacênico) por uma enzima presente na glândula mamária e tecido adiposo chamada estearoil-CoA-dessaturase ou Delta-9 dessaturase (SCD) (Corl et al., 2001). Consequentemente, altos níveis do ácido vacênico no rúmen provocam o aumento sistêmico de C18:2 *cis*-9, *trans*-11 (WASOWSKA et al., 2006).

O isômero de CLA mais predominante na gordura do leite é o C18:2 *cis*-9, *trans*-11, que corresponde de 80-90% dos isômeros desse ácido graxo, não exercendo efeito na depressão da gordura do leite (BAUMGARD, et al., 2000), sendo que o mesmo está relacionado com ação anticarcinogênica e com a modulação da resposta imune (PARIZA, et al., 2001). Também tem sido atribuído ao ácido linolênico (C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15) numerosos benefícios à saúde humana por ser considerado da família ômega (*n*-3) (GIVENS et al., 2000).

Animais que consomem maior quantidade de forragem de qualidade, em condições normais, apresentam maiores teores de CLA no leite (>2% de AG). Nesses alimentos, o ácido linolênico possui elevados teores, onde é biohidrogenado a ácido vacênico e posteriormente, convertido a CLA. No caso de animais confinados e com limitação no fornecimento de volumoso, conseguem-se altos teores de CLA (4-5% de AG no leite) com a suplementação de óleos ricos em ácido linoleico. Deitas a base de grãos reduzem as proporções de ácidos graxos saturados (entre 6 e 16 carbonos), e aumentam a proporção de ácidos graxos insaturados (JENKINS & MACGUIRE, 2006). No entanto, é comum observar nessas condições, aumento considerável de C18:2 *trans*-10, *cis*-12, ao invés do ácido rumênico, o que ocasiona a depressão da gordura do leite. O fornecimento de ácido linoleico juntamente com óleo de peixe (2:1, em base de 3% da matéria seca) resulta em altos teores de CLA. O óleo de peixe interfere no padrão da biohidrogenação ruminal, inibindo a transformação de ácido vacênico em ácido esteárico. O fornecimento de sais de cálcio de CLA também aumenta os teores de CLA na gordura do leite (PALMQUIST & MATTOS, 2011). Em geral, o perfil de ácidos graxos da gordura do leite pode ser significativamente melhorado através da manipulação da dieta e do manejo nutricional de vacas leiteiras.

3.7 Funções dos ácidos graxos de cadeia média

Entre os AGCM, o ácido láurico exerce um efeito específico sobre o HDL (lipoproteínas de alta densidade). Em um estudo de meta-análise de ensaios com humanos foi possível concluir que o ácido láurico teve um efeito mais favorável sobre o total de HDL comparando com qualquer outro AG estudado, saturado ou insaturado (MENSINK et al., 2003). Uma avaliação recente concluiu que, apesar da grande contribuição do leite e de produtos lácteos que possuem AG saturados na dieta humana, não há relação clara entre o consumo desses alimentos e o risco de doença cardiovascular (GERMAN et al., 2009). O consumo da gordura do leite, em comparação com óleos poli-insaturados, tem se mostrado vantajoso em aumentar a concentração de HDL no plasma, a qual está inversamente relacionada com o risco de doenças cardiovasculares em seres humanos (HODSON et al., 2001; SJOGREN

et al., 2004). Efeitos negativos de ácido caprílico e ácido cáprico no colesterol do sangue não foram relatados (GERMAN & DILLARD, 2004).

Ácidos graxos de cadeia média têm sido reconhecidos pelas suas funções antivirais (HORNUNG et al., 1994) e antibacterianas (DAWSON et al., 2002). Da mesma forma, as propriedades antimicrobianas de ácido láurico foram demonstradas contra micro-organismos patogênicos de origem alimentar e bactérias deteriorantes (ABABOUCHE et al., 1992), aumentando assim a qualidade higiênica e vida de prateleira do leite e dos produtos lácteos (DOHME et al., 2004). Além de possuírem essa atividade ruminal em alguns micro-organismos, apresentam características que contribuem para a redução na produção de gases ruminais e aumento da gordura do leite sem afetar a produção.

AGCM são conhecidos particularmente como tóxicos para a atividade ruminal de alguns protozoários e bactérias. Foram mostrados como redutores do metabolismo destes protozoários no rúmen, diminuindo a degradabilidade da fibra, e conseqüentemente afetando a ingestão (DOHME et al., 2001). Na suplementação de ácidos graxos, quando as dietas são ricas em volumosos, não há toxicidade devido ao fato desses AG se associarem as superfícies hidrofóbicas das partículas do alimento (PALMQUIST & MATTOS, 2006). Estudos de Machmüller & Kreuzer (1999), Dohme et al. (2001) e Hristov et al. (2001; 2004a; b), tem mostrado um forte efeito inibitório do ácido láurico em protozoários ciliados ruminais. Houve uma redução de 80% na contagem destes protozoários, quando utilizado até 4% da MS, não inibindo a IMS, com uma dieta totalmente misturada (TMR) (HRISTOV et al., 2009). Já Faciola et al. (2008) utilizou níveis maiores do que 4% na MS para alcançar alta redução na contagem de protozoários quando a aplicação foi através de TMR.

Faciola et al. (2005) relataram que ácido láurico aplicado à TMR não foi tão eficaz na redução da contagem de protozoários, ao contrario de quando administrados diretamente no rúmen. Neste último estudo, vacas em lactação alimentadas com 0,96% de ácido láurico na MS na TMR resultaram numa redução marginal de 32% nas contagens totais de protozoários, em comparação com uma redução de 91% obtida quando suplementado com 1% de ácido láurico intraruminal. A explicação para esse fenômeno é a provável maior concentração ruminal de ácido láurico conseguida imediatamente a seguir da infusão abomasal (HRISTOV et al., 2009).

Devido à direta relação dos AGCM com a atividade ruminal de alguns protozoários e bactérias, esses ácidos graxos foram relatados como supressores da formação de metano (DOHME et al., 2001; MACHMÜLLER et al., 2002; AJISAKA et al., 2002; SOLIVA et al., 2003; GOEL et al., 2009; HRISTOV et al., 2009; ZEITZ et al., 2013). Enquanto ácidos graxos de cadeia longa (AGCL), tais como o ácido palmítico (C16:0) e ácido esteárico (C18:0) não apresentam esse efeito *in vitro* (DOHME et al., 2001; SOLIVA et al., 2004; ZHANG et al., 2008) e *in vivo* (HRISTOV et al., 2009). Comprovado por Zeitz et al. (2013), onde o efeito antimetanogênico decresceu com o aumento da cadeia dos ácidos graxos (C10:0=C12:0>C14:0>C18:0). No entanto em alguns estudos estes AGCM não inibiram as produções de metano (AJISAKA et al., 2002; VAN ZIJDERVELD et al., 2011).

Hristov et al. (2011) concluiu que adicionando ácido láurico na dieta de vacas em lactação obteve uma diminuição de 90% de CH₄ por *Methanosarcina barkeri* e inibiu totalmente a formação de CH₄ por *Methanosarcina thermoautotrophicus*. Já em culturas de *Methanosarcina voltae*, a suplementação de ácido cáprico suprimiu a formação de CH₄ completa e irreversivelmente após 8 horas de cultivo. Há uma forte inibição na produção de metano quando utilizado óleo de coco, que contém 46% de ácido láurico, em alguns estudos (MACHMÜLLER et al., 2003), em contrapartida nos estudos de Soliva et al. (2004) não houve inibição do CH₄.

Numa comparação feita por Ajisaka et al. (2002) concluíram que o ácido caprílico foi inferior ao ácido cáprico na metanogênese *in vitro*. Ou seja, houve uma redução de 60% na produção de metano quando adicionado ácido cáprico e uma diminuição não significativa de 20% na produção de metano observada quando adicionado ácido caprílico. Mais tarde Goel et al. (2009), encontraram reduções de metano de 45 e 88%, respectivamente, com 20 ou 30 mg de ácido cáprico. Em contrapartida, alguns estudos com suplementação de ácido caprílico não teve nenhum efeito antimetanogênico no fluido ruminal *in vitro* (DOHME et al., 2001; ABEL et al., 2002). O que reforça as conclusões de Van zijderveld et al., (2011), que com a adição de ácido cáprico e caprílico não há efeito sobre a produção de metano.

Ácidos graxos de cadeia média saturado podem inibir a ingestão de matéria seca quando suplementados em concentrações dietéticas altas. Tem sido demonstrado que a infusão abomasal de nata ou suplementação com AGCM não

teve nenhum efeito sobre o IMS (KADEGOWDA et al., 2008, VYAS et al., 2012). Confirmando os resultados por Sun et al., (2013), que testou diferentes proporções de AGCM e não observaram queda no consumo. Hristov et al. (2009) concluíram que a adição de óleo de coco diretamente no interior do rúmen através da cânula não afetou a IMS. No entanto a suplementação de óleo de coco no concentrado reduziu significativamente a IMS em vacas em lactação (DRACKLEY et al., 1992). Trabalhos estes de acordo com Dohme et al. (2004) quando adicionaram ácido láurico a 4% na dieta a IMS foi significativamente diminuída. As diferenças nesses estudos podem ter sido ocasionadas pelas diferentes quantidades oferecidas desses lipídeos. Sabe-se que a IMS esta diretamente relacionada com a produção de leite em vacas leiteiras de alta produção, com isso é necessária sempre à maximização desta para mantermos ou aumentarmos a produção. Com base nisso todos os estudos com AGCM em que a IMS não foi afetada, a produção de leite foi, conseqüentemente, mantida (PALMQUIST & MATTOS, 2006).

À medida que as proporções de AGCM na suplementação são aumentadas, há uma tendência de aumento linear da porcentagem de gordura do leite e conseqüentemente dos sólidos totais (SUN et al., 2013). Kadegowda et al. (2008) relataram que a infusão abomasal de gordura de manteiga, que contém tanto AGCM e AGCL, aumentou a concentração de gordura de leite em 14%, ao passo que apenas a infusão de AGCL não teve nenhum efeito. Com resultados semelhantes em trabalhos anteriores, quando administrado óleo de coco na dieta de vacas em lactação houve um aumento de 12% na produção da gordura do leite (STORRY et al., 1971). Através destes estudos, Van Zijderveld et al. (2011) aumentaram significativamente a concentração de gordura no leite com a adição de AGCM incluindo C8:0 e C10:0, e atribuem esse aumento a maior digestibilidade desses ácidos graxos. Em contrapartida, estudos de Hristov et al. (2011) diminuíram a síntese de gordura no leite, ou não tiveram efeito sobre a produção de gordura no leite (HRISTOV et al., 2009; VYAS et al., 2012). Estudos de Kadegowda et al. (2008) e Hristov et al. (2009) mostram alterações no perfil de ácidos graxos no leite, havendo aumentos significativos de AGMI, AGPI, e de alguns isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA) que são benéficos para a saúde humana.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABABOUC, L.; CHAIBI, A.; BUSTA F. F. Inhibition of bacterial spore growth by fatty acids and their sodium salts. **J. Food Prot.**, 55:980–984, 1992.

ABEL, H.J.; IMMIG, I.; HARMAN, E. Effect of adding caprylic and capric acid to grass on fermentation characteristics during ensiling and in the artificial rumen system RUSITEC. **Anim. Feed. Sci.**, Tech. 99, 65–72, 2002.

AJISAKA, N.; MOHAMMED N.; HARA K.; MIKUNI K.; HARA K.; HASHIMOTO H.; KUMATA T.; KANDA S.; ITABASHI H. Effects of medium-chain fatty acid-cyclodextrin complexes on ruminal methane production *in vitro*. **J. Anim. Sci.**, 73:479–484, 2002.

ALLEN, M. S. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, 83:1598–1624, 2000.

ANNISON, E. F.; ARMSTRONG, D. G. **Physiology of digestion and metabolism in the ruminant**. England: Oriel Press, p. 422, 1970.

ASTRUP, H.N.; VIK-MO, L.; EKERN, A.; BAKKE, F. Feeding protected and unprotected oils to dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 59:426–30, 1976.

BAKER, S. K. Rumen methanogens, and inhibition of methanogenesis. **Australian Journal of Agricultural Research**, 50:1293, 1999.

BAUMAN, D. E.; DAVIS, C. L. Biosynthesis of milk fat. In **Lactation: A Comprehensive Treatise**, ed. BL Larson, VR Smith, New York: Academic Vol. 2, pp. 31–75, 1974.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annu. Rev. of Nutr.**, 23:203-27, 2003.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: Low-fat milk syndrome. **Livest. Prod. Sci.**, v. 70:15–29, 2001.

BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; DWYER, D. A.; SÆBØ, A.; BAUMAN, D. E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 278:R179–R184, 2000.

BYERS, F. M.; SCHELLING, G. T. Los lípidos en la nutrición de los rumiantes. In: CHURCH, C. D. **El rumiante: fisiología y nutrición**. Zaragoza: Acribia. p.339-356, 1993.

CHURCH, D. C. **El ruminante: fisiología digestiva y nutrición. Metabolismo de la proteína en lo ruminantes**. Zaragoza: ACRIBIA, p. 255-258, 1993.

CORL, B. A.; BAUMGARD, L. H.; GRIINARI, J.M.; DEL-MONTE, P.; MOREHOUSE, K. M.; et al. *Trans-7, cis-9* CLA is synthesized endogenously by delta9-desaturase in dairy cows. **Lipids**, 37:681–88, 2002.

CORL, B. A.; et al. The role of Δ 9-desaturase in the production of *cis-9, trans-11* CLA. **J. Nutr. Bioch.**, v.12, n.11, p.622-630, 2001.

CZERKAWSKI, J. W. Microbial fermentation in the rumen. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 43, p. 101-180, 1984.

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

DAWSON, P.L.; CARL, G.D.; ACTON, J.C.; HAN, I.Y. Effect of lauric acid and nisin-impregnated soy-based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. **Poult Sci.**, 81:721–6, 2002.

DHIMAN, T. R.; SATTER, L. D. Yield response of dairy cows fed different proportions of alfalfa silage and corn silage. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 2069-2087, 1997.

DILS, R. R. Comparative aspects of milk fat synthesis. **J. Dairy Sci.**, 69:904–10, 1986.

DOHME, F.; MACHMÜLLER, A.; SUTTER F.; KREUZER, M. Digestive and metabolic utilization of lauric, myristic and stearic acid in cows, and associated effects on milk fat quality. **Arch. Anim. Nutr.**, 58:99–116, 2004.

DOHME, F.; MACHMÜLLER, A.; WASSERFALLEN, A.; KREUZER M. Ruminant methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. **Let. Appl. Microbiol.**, 32:47–51, 2001.

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

DOREAU, M.; CHILLIARD, Y.; RULQUIN, H.; DEMEYER, D. I. Manipulation of milk fat in dairy cows. In **Recent Advances in Animal Nutrition**, ed. PC Garnsworthy, J Wiseman, Nottingham, UK: Nottingham Univ. Press, p. 81–109, 1999.

DRACKLEY, J. K.; KLUSMEYER, T. H.; TRUSK, A. M.; CLARK, J. K. Infusion of long-chain fatty acids varying in saturation and chain length into the abomasum of lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 75:1517–1526, 1992.

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

ERDMAN R. *Trans* fatty acids and fat synthesis in milk. **Proc. South west Nutr. Mgt. Conf.**, Univ. Arizona, Tucson, pp. 113–25, 1999.

ERDMAN, R. Milk fat depression: some new insights. *Proc. Tri-State Dairy Nutr. Conf.*, Fort Wayne, Ind., pp. 1–16, 1996.

FACIOLA, A. P.; BRODERICK, G. A.; HRISTOV, A. N.; LEÃO, M. I. Effect of feeding different levels of lauric acid on ruminal protozoa, and milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 88(Suppl. 1):178, 2005.

FACIOLA, A. P.; BRODERICK, G. A.; HRISTOV, A. N.; PIRES, J. A. Effect of four levels of lauric acid on ruminal protozoa, milk production and composition in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 91(Suppl. 1):76, 2008.

GERMAN, J. B. et al. A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *Eur. J. Nutr.*, 48:191–203, 2009.

GERMAN, J. B.; DILLARD, C. J. Saturated fats: what dietary intake? *Am. J. Clin. Nutr.*, 80:550–9, 2004.

GIVENS, D. I.; COTTRILL, B. R.; DAVIES, M.; LEE, P. A.; MANSBRIDGE, R. J.; MOSS, A. R. Sources of n-3 polyunsaturated fatty acids additional to fish oil for livestock diets - A review. *Nutr. Abstr.*, Rev. 70:4–59, 2000.

GOEL, G. K. et al. Effects of capric acid on rumen methanogenesis and biohydrogenation of linoleic and α -linolenic acid. *Animal*, 3:810–816, 2009.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C., **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, p. 66, 2003.

GRIINARI, J. M.; BAUMAN, D. E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In **Advances in Conjugated Linoleic Acid Research**, ed. MP Yurawecz, MM Mossoba, JKG Kramer, MW Pariza, GJ Nelson, Champaign, IL: AOCS Press, Vol. 1, pp. 180–200, 1999.

GRIINARI, J. M.; DWYER, D. A., MCGUIRE, M. A.; BAUMAN, D. E.; PALMQUIST, D. L.; NURMELA, K. V. V. *Trans*-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 81:1251–61, 1998.

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

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

HARFOOT, C. G.; HAZLEWOOD, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed.). **The rumen microbial ecosystem**. London, UK: Chapman & Hall, p.382-426, 1997.

HARVATINE, K. J. & ALLEN, M. S. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 89:1081–1091, 2006.

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

HODSON, L.; SKEAFF, C. M.; CHISHOLM, W. A. The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults. **Eur. J. Clin. Nutr.**, 55:908–915, 2001.

HOOK S. E.; WRIGHT A. D. G.; MCBRIDE B. W. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. **Archaea**, 11 p. doi: 10.1155/2010/945785. 2010.

HORNUNG, B.; AMTMANN, E.; SAUER, G. Lauric acid inhibits the maturation of vesicular stomatitis virus. **J. Gen. Virol.**, 75:353–61, 1994.

HRISTOV, A. N. et al. Effect of lauric acid and coconut oil on ruminal fermentation, digestion, ammonia losses from manure, and milk fatty acid composition in lactating cows. **J. Dairy Sci.**, 92:5561–5582, 2009.

HRISTOV, A. N. et al. Effects of lauric and myristic acids on ruminal fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 94:382–395, 2011.

HRISTOV, A. N., ROPP, J. K.; GRANDEEN, K. L.; ETTER, R. P.; FOLEY, A.; MELGAR, A.; PRICE, W. Efficiency of utilization of ruminal ammonia N for milk protein synthesis in dairy cows. Pages 601–604 in **Progress in Research on Energy and Protein Metabolism**, EAAP publication No. 109, W. B. Souffrant and C. C. Metges, ed., Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands. 2003.

HRISTOV, A. N.; GRANDEEN, K. L.; ROPP, J. K.; MCGUIRE, M. A. Effect of sodium laurate on ruminal fermentation and utilization of ruminal ammonia nitrogen for milk protein synthesis in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 87:1820–1831, 2004b.

HRISTOV, A. N.; IVAN, M.; MCALLISTER, T. A. *In vitro* effects of individual fatty acids on protozoal numbers and on fermentation products in ruminal fluid from cattle fed a high concentrate, barley-based diet. **J. Anim. Sci.**, 82:2693–2704, 2004a.

HRISTOV, A. N.; IVAN, M.; RODE, L. M.; MCALLISTER, T. A. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high-concentrate barley-based diets. **J. Anim. Sci.**, 79:515–524, 2001.

JENKINS, T. C.; MCGUIRE, M. A. Major advances in nutrition: Impact on milk composition. **J. Dairy Sci.** 89:1302–1310, 2006.

JENKINS, T.C. Lipid metabolism in the rumen. **J. Dairy Sci.**, v.76 , n.12, p.3851-3863, 1993.

JENSEN, R. G. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. **J. Dairy Sci.**, 85:295–350, 2002.

- JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v.73, p.2483-2492, 1995.
- KADEGOWDA, A. K. G.; PIPEROVA, L. S.; DELMONTE, P.; ERDMAN, R. A. Abomasal infusion of butterfat increases milk fat in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 91:2370–2379, 2008.
- KALSCHEUR, K. F.; TETER, B. B.; PIPEROVA, L. S.; ERDMAN, R. A. Effect of fat source on duodenal flow of *trans*-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 80:2115–26, 1997.
- KEMP, P.; LANDER, D. J. Hydrogenation *in vitro* of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. **J. Gen. Microb.**, v. 130, p. 527-533, 1984.
- KEPLER, C. R.; TUCKE, W. P.; TOVE, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. IV. Substrate specificity and inhibition of linoleic delta-12-*cis*, delta-11-*trans*-isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. **J. Biol. Chem.**, v. 245, p. 3612–3820, 1970.
- 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. **J. Appl. Microb.**, 92:976-982, 2002.
- KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 2 ed. Santa Maria: UFSM. 2009.
- LOCK, A. L. & BAUMAN, D. E. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. **Lipids**, 39:1197–1206, 2004.
- LUCCI, C. S., **Nutrição e manejo de bovinos leiteiros**. São Paulo: Manole, p.298, 1997.
- MACHMÜLLER, A. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. **Agric. Ecos. and Envir.**, 112:107–114, 2006.
- MACHMÜLLER, A., SOLIVA, C.R.; KREUZER, M. *In vitro* ruminal methane suppression by lauric acid as influenced by dietary calcium. **Can. J. Anim. Sci.**, 82, 233–239, 2002.
- MACHMÜLLER, A.; KREUZER, M. Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. **Can. J. Anim. Sci.**, 79:65–72, 1999.
- MACHMÜLLER, A.; SOLIVA, C. R.; KREUZER, M. Methane-suppressing effect of myristic acid in sheep as affected by dietary calcium and forage proportion. **Br. J. Nutr.**, 90:529–540, 2003.
- McGUIRE, M. A.; BAUMAN, D. E. Milk biosynthesis and secretion. **J. Dairy Sci.**, v.3, 1826-1834, 2002.

MENSINK, R. P.; ZOCK, P. L.; KESTER, A. D. M.; KATAN, M. B. Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: A meta-analysis of 60 controlled trials. **Am. J. Clin. Nutr.**, 77:1146–1155, 2003.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA - MCT. **Convenção sobre Mudança do Clima**. 2000.

MOHAMMED, N.; ONODERA, R.; ITABASHI, H. et al. Effects of ionophores, vitamin B6 and distiller's grains on in vitro tryptophan biosynthesis from indolepyruvic acid, and production of other related compounds by ruminal bacteria and protozoa. **Anim. Feed Sci. and Tech.**, v.116, n.3, p.301-311, 2004.

MORAIS, J. A. S.; BERCHIELLI, T. T.; REIS, R. A. Aditivos. In: **BERCHIELLI, T.T. et al. Nutrição de ruminantes 2ª ed.** Jaboticabal: FUNEP. Cap.18, p.565-599, 2011.

MURPHY, M. R.; BALDWIN, R. L.; KOONG, L. J. Estimation of stoichiometric NAGARAJA, T. G.; TITGEMEYER, E. C., Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. **J. Dairy Sci.**, v. 90 (Supl. E):E17-E38, 2007.

NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th ed. Natl. **Acad. Sci.**, Washington, DC., 2001.

ODONGO, N. E.; OR-RASHID, M. M.; KEBREAB, E.; FRANCE, J.; McBRIDE, B W. Effect of supplementing myristic acid in dairy cow rations on ruminal methanogenesis and fatty acid profile in milk. **J. Dairy Sci.**, 90:1851–1858, 2007.

ONETTI S, G.; GRUMMER, R. R. Response of lactating cows to three supplemental fat sources as affected by forage in the diet and stage of lactation: A meta-analysis of literature. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v.115, n.1/2, p.65-82, 2004.

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

PALMQUIST, D. L. & JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: Review. **J. Dairy Sci.**, v.63, n.1, p.1, 1980.

PALMQUIST, D. L. & MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídeos. In: **BERCHIELLI, T.T. et al. Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP. Cap.10, p.287-310, 2006.

PALMQUIST, D. L. & MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídeos. In: **BERCHIELLI, T.T. et al. Nutrição de ruminantes 2ª ed.** Jaboticabal: FUNEP. Cap.10, p.299-322, 2011.

PALMQUIST, D. L. The feeding value of fats. In: ORSKOV, E. R. (Ed.). World animal science.B. Disciplinary approach. 4. **Feed Science**. Amsterdam: Elsevier, p.293-311, 1988.

PALMQUIST, D. L.; BEAULIEU, A. D.; BARBANO, D. M. Feed and animal factors influencing milk fat composition. **J. Dairy Sci.**, v. 76, 1753-1771, 1993.

parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v. 55, p. 411, 1982.

PARIZA, M.W. et al. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, Kidlington, v.40, n.4 , p.283 –298, 2001.

PARODI, P. W. Conjugated linoleic acid. **J. Dairy Sci.**, p1587–1594, 2002.

PEDREIRA, M.S. Estimativa da produção de metano de origem ruminal por bovinos tendo como base a utilização de alimentos volumosos: utilização da metodologia do gás traçador hexafluoreto de enxofre (SF₆). 2004. 136f. **Tese (Doutorado, em Zootecnia)** – Faculdade de Ciência Agrônômica e Veterinária – UNESP, Jaboticabal, 2004.

PEDREIRA, S.M; PRIMAVESI, O. Impacto da produção animal sobre o ambiente. **In: BERCHIELLI, T. T. et al. Nutrição de ruminantes. 1.ed.** Jaboticabal: Funep, p.497-511. 2006.

PERES, J.R. O leite como ferramenta do monitoramento nutricional. **In: Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras.** Porto Alegre: Gráfica da UFRGS, p.30-45, 2001.

PETERSON, D. G.; MATITASHVILI, E. A.; D. E. BAUMAN D. E. Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. **J. Nutr.**, 133:3098–3102, 2003.

PINEDO, L. A., JACOMINI, A., VENDRAMIN, D. et al. Inventário de emissões de gás metano provenientes da fermentação entérica e óxido nitroso do manejo de dejetos animais - período 1990 a 2005. **PUBVET, Londrina**, V. 3, N. 11, Mar 4, 2009.

PIPEROVA, L. S.; SAMPUGNA, J.; TETER, B. B.; KALSCHEUR, K. F.; YURAWECZ, M.P.; et al. Duodenal and milk *trans* octadecenoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that post absorptive synthesis is the predominant source of *cis*-9-containing CLA in lactating dairy cows. **J. Nutr.**,132:1235–41, 2002.

PIPEROVA, L. S.; TETER, B. B.; BRUCKENTAL, I.; SAMPUGNA, J.; MILLS, S. E.; et al. Mammary lipogenic enzyme activity, *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. **J. Nutr.**, 130:2658–74, 2000.

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. **Anim. Sci.**, v. 77:165-179, 2003.

SJOGREN, P. et al. Milk-derived fatty acids are associated with a more favorable LDL particle size distribution in healthy men. **J. Nutr.**, 34:1729–1735, 2004.

SOLIVA, C. R.; HINDRICHSEN, I. K.; MEILE, L.; KREUZER, M., MACHMÜLLER, A. Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen methanogens and methanogenesis *in vitro*. **Lett. Appl. Microbiol.**, 37, 35–39, 2003.

SOLIVA, C. R.; MEILE, L.; CIEŚLAK, A.; KREUZER, M.; MACHMÜLLER, A. 2004. Rumen simulation technique study on the interactions of dietary lauric and myristic acid supplementation in suppressing ruminal methanogenesis. **Br. J. Nutr.**, 92:689–700, 2004.

STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; THATCHER, W. W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.856-871, 1998.

STORRY, J. E.; BRUMBY, P. E.; HALL, A. J.; JOHNSON, V. W. Response of the lactating cow to different methods of incorporating casein and coconut oil in the diet. **J. Dairy Sci.**, 57:61–67, 1974.

SUN, Y. et al. Supplementing different ratios of short- and medium-chain fatty acids to long-chain fatty acids in dairy cows: Changes of milk fat production and milk fatty acids composition. **J. Dairy Sci.**, 96:2366–2373, 2013.

SUTTON, J. D. Altering milk composition by feeding. **J. Dairy Sci.**, 72:2801–14, 1989.

TEIXEIRA, J. C.; TEIXEIRA, L. F. A. C. **Princípios de nutrição de bovinos leiteiros**, textos acadêmicos. Lavras: UFLA/FAEP, 245p., 2001.

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

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. Evaluating Ruminant Livestock Efficiency Projects and Programs **In: PEER REVIEW DRAFT**. Washington, D.C, 2000, 48p.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Lipolysis and biohydrogenation of soybean oil in the rumen *in vitro*: Inhibition by antimicrobials. **J. Dairy Sci.**, v. 78:2797-2806, 1995.

VAN ZIJDERVELD, S. M. et al. Dietary inclusion of diallyl disulfide, yucca powder, calcium fumarate, an extruded linseed product, or medium-chain fatty acids does not affect methane production in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 94 :3094–3104, 2011.

VYAS, D.; TETER, B. B.; ERDMAN, R. A. Milk fat responses to dietary short and medium chain fatty acids in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 95:5194–5202, 2012.

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 J. Nutr.**, v. 88:697–709, 2002.

WASOWSKA, I.; MAIA M. R. G.; NIEDZWIEDZKA, K. M.; CZAUDERNA, M.; RIBEIRO, J. M. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. **Br. J. Nutr.**, 95:1199–1211, 2006.

WHEELER, D. M.; LEDGARD, S. F.; de KLEIN, C. A. Using the overseer nutrient budget model to estimate on-farm greenhouse gas emissions. **Austr. J. Exper. Agric.**, v.48, p.99-103, 2008.

ZEITZ, J. O.; BUCHER, S.; ZHOU, X.; MEILE, L.; KREUZER, M.; SOLIVA, C. R. Inhibitory effects of saturated fatty acids on methane production by methanogenic *Archaea*. **J. Anim. Feed Sci.**, v. 22:44–49, 2013.

ZHANG, C. M. et al. Effect of octadeca carbon fatty acids on microbial fermentation, methanogenesis and microbial flora *in vitro*. **Anim. Feed Sci. Tech.**, 146, 259–269, 2008.

5 CAPÍTULO 1

EFEITO DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA SOBRE A FERMENTAÇÃO RUMINAL E PRODUÇÃO DE METANO

RESUMO

Um dos enfoques da pesquisa com ruminantes na atualidade é encontrar estratégias sustentáveis para redução da emissão de gás metano (CH₄) causador do efeito estufa, além de evitar perdas econômicas pela redução da eficiência energética da dieta em ruminantes através de alterações no padrão fermentativo do rúmen. Com o objetivo de avaliar os efeitos do uso de AGCM contendo C6:0, C8:0, C10:0, C12:0 e C14:0 na produção de AGCC, gás e metano, foi desenvolvido um experimento com quatro tratamentos: CTL (controle, sem suplementação AGCM), AGCM20 (0,016 gramas de AGCM), AGCM40 (0,03 gramas de AGCM) e AGCM80 (0,06 gramas de AGCM) através do método *in vitro* gás. O delineamento foi o inteiramente casualizado com medidas repetidas no tempo. Ocorreu redução significativa na produção total de gás e metano (P<0,001) com os tratamentos AGCM40 e 80 em comparação com o grupo controle. A produção de AGCC apresentou comportamento distinto durante o período de incubação até às 12hs e das 24hs até 48hs de incubação, onde houve aumento (P<0,05) de AGCC totais, acetato, propionato, butirato, valerato e do ácido isovalérico até 12 horas de incubação no tratamento AGCM80 em comparação com o grupo controle. Após esse período ocorreu um decréscimo (P<0,05) de AGCC totais, acetato, propionato, valerato, ácido isovalérico e isobutírico no período de 24hs até 48hs de incubação no tratamento AGCM80 em relação ao CTL. A relação acetato:propionato (C2:C3) teve uma redução (P<0,05) até às 24hs de incubação com o grupo AGCM80 em comparação com o controle. Assim, AGCM possuem efeito sobre a fermentação ruminal dos AGCC reduzindo as produções totais de gás e metano, sendo uma alternativa sustentável na redução na emissão de gases de efeito estufa.

Palavras-chave: Efeito estufa. *In vitro* gás. Lipídeos saturados. Óleos vegetais.

EFFECT OF MEDIUM CHAIN FATTY ACIDS ON RUMINAL FERMENTATION AND METHANE PRODUCTION

ABSTRACT

One of the research focuses with ruminants nowadays is finding sustainable strategies for reducing emissions of methane (CH₄) cause of the greenhouse, and prevent economic losses by reducing the energy efficiency of the diet in ruminants through changes in the fermentation pattern of rumen. The aim of this study was to assess the effects of MCFA use containing C6:0, C8:0, C10:0, C12:0 and C14:0 in the production SCFA, gas and methane, an experiment was conducted with four treatments: CTL (control, without supplementation MCFA), AGCM20 (0.016g MCFA) AGCM40 (0.03g MCFA) and AGCM80 (0.06g MCFA) using *in vitro* gas method. The design was completely randomized with repeated measures. There was significant reduction in total gas production and methane ($P<0.001$) with treatments AGCM40 and 80 compared with the control group. The production of SCFA showed different behavior during the incubation period of up to 12 h and 24 h until 48 h of incubation, which increased ($P<0.05$) of total SCFA, acetate, propionate, butyrate, valerate and isovaleric acid to 12 hours of incubation in AGCM80 treatment compared with the control group. After this time there was a decrease ($P<0.05$) of total SCFA, acetate, propionate, valerate, isobutyric and isovaleric acid in the period of 24 h until 48 h of incubation in AGCM80 treatment compared to the CTL. The acetate:propionate ratio (C2:C3) was reduced ($P<0.05$) to the incubation of 24 hours with AGCM80 group compared with the control. Thus, MCFA have effect on ruminal fermentation of SCFA reducing total production and natural gas being a sustainable alternative to reduce the greenhouse gases emissions.

Keywords: Greenhouse effect. *In vitro* gas. Lipids saturated. Vegetable oils.

5.1 INTRODUÇÃO

No rúmen, os micro-organismos fermentam carboidratos e proteínas formando produtos finais como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e a proteína microbiana, que são as principais fontes de nutrientes (energia e nitrogênio), metano, dióxido de carbono, amônia e células bacterianas. Os ácidos graxos voláteis constituem a maior fonte de energia para ruminantes, em torno de 65 a 75% da energia metabolizável ingerida (LANA et al., 1998). Além disso, durante a fermentação anaeróbica das hexoses é produzido o hidrogênio. Este pode ser usado na síntese dos AGCC e também eliminado na formação de metano (BAKER, 1999).

Um dos enfoques da pesquisa com ruminantes na atualidade é encontrar estratégias sustentáveis para redução da emissão de gás metano (CH_4) causador do efeito estufa. Além disso, aspectos econômicos devem ser levados em conta no sentido de reduzir a metanogênese em ruminantes, uma vez que, até 12% da energia consumida pode ser perdida na forma de metano (BAKER, 1999). Embasado em aspectos de mercado, o Brasil, por ser detentor do maior rebanho comercial de bovinos do mundo está em evidência em relação a ser um importante produtor de gases de efeito estufa.

Mesmo que o gás que mais se relaciona com o efeito estufa seja o dióxido de carbono (CO_2), o metano contribui 25 vezes mais para o efeito estufa que o CO_2 (MOSS, 2000). Mesmo que todos os ruminantes produzam apenas 10% a 15% do total de metano no mundo (VAN SOEST, 1994), essa emissão pode ser reduzida através de manipulações da dieta e uso de aditivos.

Para buscar a redução nas emissões de metano, além da substituição de carboidratos estruturais por não estruturais (KREUZER et al., 1986), o uso de lipídeos na dieta são alternativas com potencial como inibidores na produção de metano em ruminantes. Além do que, o padrão fermentativo do rúmen pode ser alterado tornando-o mais eficiente energeticamente. Dentre os diferentes tipos de gordura, alguns fatores são importantes para promoverem resultados satisfatórios, como o grau de insaturação dos lipídeos fornecidos (HARVATINE; ALLEN, 2006).

Óleos vegetais, como os oriundos do óleo de coco e óleo de palma, ricos em ácidos graxos de cadeia média (AGCM), foram identificados como possíveis

substitutos de fontes lipídicas de origem animal, devido à preocupação crescente com a encefalopatia espongiforme bovina em países que proíbem o uso de produtos de origem animal. Esses ácidos graxos saturados possuem propriedades antiprotozoárias potentes, e igualmente uma variedade de efeitos sobre a formação de produtos finais de fermentação, sobretudo na produção de metano (CH₄) ruminal. Onde foram estudados com a intenção de verificar a supressão na formação desses gases *in vivo* e *in vitro* (HRISTOV et al., 2004a, b; SOLIVA et al., 2004). Esta supressão ocorreria através da redução desses protozoários ruminais e também através da inibição direta da metanogênese ruminal que é realizada pelas *Archaeobacterias* metanogênicas (MACHMÜLLER, 2006).

Em vista disso, tem-se por objetivo avaliar os efeitos da adição de ácidos graxos de cadeia média, incluindo os ácidos caprótico (C6:0), ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), ácido láurico (C12:0) e ácido mirístico (C14:0) na técnica *in vitro* gás para reduzir as emissões de gás metano tendo impacto na fermentação ruminal.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Local e época

O experimento foi conduzido no período de janeiro de 2014 a maio de 2015 no Núcleo de Pesquisa e Extensão na Cadeia Leiteira (NUPECLE) e no Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes (LABRUMEN) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) no município de Santa Maria, RS, situado na região fisiográfica denominada Depressão Central, tendo como coordenadas, 29° e 43' de Latitude Sul e 53° e 42' de Longitude Oeste.

5.2.2 Tratamentos e procedimento experimental

Foram avaliados quatro tratamentos, manualmente misturados aos alimentos conforme os níveis: CTL (controle, sem suplementação AGCM), AGCM20 (0,016 gramas de AGCM), AGCM40 (0,03 gramas de AGCM) e AGCM80 (0,06 gramas de AGCM) em cada frasco de fermentação. Foi utilizado como fonte de ácidos graxos de cadeia média um produto comercial contendo os ácidos capríco (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0) e ácido mirístico (C14:0), extraídos de óleo de palma e óleo de coco, na forma livre com aditivo aromatizante e palatabilizante a base de essência de baunilha, farelo de soja transgênico (*Agrobacterium sp.*) e veículo q.s.p. A dose recomendada pelo fabricante é de 40g/animal/dia com o nível mínimo garantido de 10 gramas de AGCM para cada 40g de produto.

Como base de cálculo proporcional ao frasco de incubação de 50 mL de solução, foi considerado um bovino com peso médio de 500Kg e volume ruminal de 75L (15% do peso vivo), sendo que para a dose recomendada pelo fabricante de 40g de produto foi utilizado 0,03g do produto a base de AGCM.

5.2.3 Determinação de ácidos graxos de cadeia curta e metano pela técnica *in vitro* gás

Foi utilizada a técnica *in vitro* de produção de gás (THEODOROU et al., 1994) adaptada ao sistema semiautomático (MAURÍCIO et al., 1999) usando transdutor de pressão e armazenador de dados (Pressure Press Data 800, LANA, CENA/USP, Piracicaba-SP), para estimar a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) e metano (CH₄).

5.2.3.1 Preparo dos alimentos para incubação

Os alimentos utilizados consistiram de feno de tifton e silagem de milho (volumoso), e milho moído (concentrado) foram pré-secos em estufa (55-60°C/72h) sob ar forçado, moídos em peneira de 1 mm tipo Willey. Esses alimentos foram misturados, obedecendo a relação volumoso:concentrado de 60:40 para utilização como substrato de fermentação. Amostras da mistura de alimentos, pesando 0,5g, foram colocadas dentro de frascos de fermentação, juntamente com a adição do aditivo, com capacidade de 100 mL de volume. Estes receberam a adição de 40 mL de meio de cultura (tampão), conforme descrito por Theodorou et al. (1994) e foram mantidos em geladeira a 4°C no período de 8-12h que antecedeu a inoculação.

5.2.3.2 Inoculação com líquido ruminal

Os frascos contendo a mistura dos alimentos e meio de cultura foram removidos da geladeira e colocados em estufa a 39°C cinco horas antes da inoculação. O líquido ruminal foi obtido de um bovino fistulado e alimentado com a mesma dieta experimental à base de volumoso e concentrado. O material foi coletado e armazenado conforme a técnica descrita por Senger (2005). O líquido ruminal foi filtrado por duas camadas de gazes de algodão sob injeção contínua de

CO₂ e mantido em banho-maria a 39°C. Volumes de 10 mL do líquido ruminal filtrado foram injetados nos frascos. Frascos contendo líquido ruminal e meio de cultura (tampão) foram utilizados como controle negativo, para descontar a produção de gás obtida do líquido ruminal. Após a inoculação do líquido ruminal, os frascos foram vedados e colocados em banho-maria a 39°C com agitação constante por 48 horas, em uma sala com temperatura controlada.

5.2.3.3 Leitura e interpretação

A pressão originada pelos gases, acumulados na parte superior dos frascos, foi medida por intermédio de um transdutor de pressão conectado em sua extremidade a uma agulha (0,6 mm). As leituras de pressão foram tomadas nos tempos 0, 6, 12, 24, e 48h após incubação. A partir da inserção da agulha na tampa de borracha a pressão produzida no interior dos frascos foi lida no leitor digital. Para interpretação das leituras de pressão (psi= pressão por polegada quadrada) foi utilizada a seguinte equação $V = 4,9515p + 0,656$, onde V= volume de gás (mL); p= pressão mensurada (psi), desenvolvida por Maurício et al. (1999). A equação matemática permite transformar cada psi para o equivalente de 4,48 mL de gás.

5.2.3.4 Determinação da proporção dos AGCC e metano

Para análise da relação de produção de AGCC e metano, frascos foram incubados em quadruplicata com cada tratamento descrito anteriormente, e coletados nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48h. Em cada momento a fermentação foi cessada, e 2mL de gás em cada período foi coletado no mesmo frasco extainer, completando 10mL de gás ao final do período de incubação, formando um pool de gás para análise de metano ao final das 48h de incubação. Após a coleta do gás, foi retirado 1mL do líquido com seringa de 1mL, através de uma agulha (0,6 mm), e armazenadas em tubos eppendorfs, posteriormente as amostras devidamente identificadas foram congeladas para medição da produção de AGCC e CH₄.

As amostras para análise dos AGCC (incluindo os ácidos acético, propiônico, isobutírico, butírico, isovalérico e valérico) foram enviadas ao Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia/UNESP-Jaboticabal, SP. Primeiramente foram centrifugadas a 30.000 rpm por 30 minutos a 10°C, após ao sobrenadante de 0,5mL, foi adicionado 0,1 mL de ácido fórmico, para análise em Cromatógrafo gasoso (SHIMADZU, modelo GC-2014) equipado com detector de ionização de chama (DIC) e injetor automático modelo AOC - 20i, utilizando coluna capilar HP INNOWax - 19091N (30m de comprimento; 0,32mm ID; 0,50µm de filme). A temperatura do injetor foi de 200°C, do detector de 250°C e da coluna de 80°C por 3min até 240°C (20°C/min). A injeção foi no modo "split", com relação 1:30, utilizando o nitrogênio como gás de arraste com fluxo de 3,18mL/min. A curva de calibração externa foi feita com padrões cromatográficos (Chem Service, West Chester, PA, EUA) de ácido acético (99,5%; CAS 64-19-97), propiônico (99%; CAS 79-09-4), isobutírico (99%; CAS 79-31-2), butírico (98,7%; CAS 107-92-6), isovalérico (99%; CAS 503-74-2) e valérico (99%; CAS 109-52-4).

Os tubos a vácuo do tipo "extainer" foram enviados ao Laboratório de Biogeoquímica Ambiental, do Departamento de Solos da UFRGS -RS, onde as análises para determinação de metano foram realizadas por cromatografia gasosa (GC-2014 mod. "Greenhouse") em detector FID operando a 250°C a partir da amostragem de 1 mL e utilizando N₂ com o gás de arraste (MOTERLE et al., 2013).

Para calcular a quantidade de metano produzido, foi utilizada a equação " $CH_4 = (GP + HS) \times Conc$ "; em que CH_4 é o volume (mL) de metano, GP é o volume (mL) de gás produzido no final de cada período de incubação, HS é o volume (mL) do "headspace" da garrafa e Conc é a concentração de CH_4 no gás da amostra analisada (TAVENDALE et al., 2005). Os resultados de volume de gás produzido e da concentração de CH_4 por cromatografia foram adicionados à equação, e com isso, foi determinada a produção total de CH_4 nas 48 horas de incubação.

5.2.4 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental para produção "*in vitro*" gás foi o inteiramente casualizado com 4 tratamentos, 4 repetições (frascos) e medidas repetidas no

tempo. Os dados de produção de gás, AGCC e metano foram submetidos à análise de variância e teste F, pelo procedimento PROC MIXED. Quando o teste F foi significativo a 5%, as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, através do pacote estatístico SAS.

O modelo matemático utilizado foi: $Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \alpha_j + R_k(\beta_i) + \beta_{\alpha ij} + \epsilon_{ijk}$ onde Y_{ijk} =variáveis dependentes; μ =média geral das observações; β_i =efeito do i -ésimo tratamento; α_j =efeito do j -ésima medida de tempo; $R_k(\beta_i)$ =efeito da repetição aninhada em tratamento - erro a; $\beta_{\alpha ij}$ = interação entre tratamento de índice i e medida de tempo de índice j .; ϵ_{ijk} = erro residual - erro b.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi observada redução na produção de gás a partir das 24 horas de incubação, como apresentado na Tabela 1 de acordo com o tratamento. Quando se compara o grupo controle com o tratamento AGCM80 a partir das 24 horas de incubação, pode-se observar que o aditivo inibiu ($P < 0,05$) a produção total de gás. Considerando o acumulado em 48 horas os tratamentos AGCM40 e AGCM80 apresentaram redução significativa ($P < 0,05$) na produção de gás em comparação com o controle. Esse fato deve-se a diminuição na produção de gás proporcionada pelos AGCM principalmente pela sua ação na atividade metabólica das bactérias metanogênicas (MACHMÜLLER, 2006), bem como na população de protozoários ciliados que são conhecidos por fornecer um habitat ideal para a metanogênese ruminal (FINLAY et al., 1994), e conseqüentemente menor produção total de gás.

Em média a redução na produção de gás, nas 48hs de incubação, foi de 9% e 18%, nos tratamentos AGCM40 e AGCM80, respectivamente, em relação ao controle. Chai et al. (2004) sugeriram que, os gases produzidos nas primeiras horas de incubação são correspondentes da fermentação dos carboidratos não estruturais. Com o aumento do tempo de incubação o volume de gás produzido é maior, efeito da fermentação de carboidratos estruturais (THEODOROU et al., 1994). Esse fato pode explicar a não redução na produção de gás até às 12hs de incubação, pois esses ácidos graxos se ligam às superfícies hidrofóbicas das partículas dos alimentos (PALMQUIST & MATTOS, 2006), agindo em menor proporção nos carboidratos não estruturais devido à relação 60:40 (volumoso:concentrado). Após esse período de incubação, ocorreu maior degradação do alimento fibroso, e redução na produção de gás pela ação tóxica dos AGCM sobre os micro-organismos ruminais.

No presente estudo houve uma redução na produção de metano que variou de 9% a 16%, como se pode observar na Tabela 1. Essa redução está diretamente relacionada com a menor produção total de gás nas 48hs de incubação *in vitro* gás. Resultados semelhantes foram obtidos por Dohme et al. (2001) que utilizaram diversos óleos ricos em AGCM através de técnica de simulação ruminal utilizando como substrato feno a vontade, silagem de milho e concentrado comercial a base de

cereais. No entanto em alguns estudos os AGCM não inibiram as produções de metano (SOLIVA et al., 2004; VAN ZIJDERVELD et al., 2011). A divergência de resultados perante os inúmeros estudos referentes à ação dos AGCM é decorrente, principalmente, da composição destes ácidos e da quantidade utilizada.

Tabela 1. Produção de gás (mL) e produção de metano CH₄ (mL) acumulado nas 48 horas de incubação pela técnica *in vitro* gás após inoculação com a adição de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) no substrato.

Tempo de incubação (horas)	Tratamentos ¹ (mL)				P>f	CV%
	CTL	AGCM20	AGCM40	AGCM80		
6	17,44 ^b	17,10 ^b	18,60 ^{ab}	20,05 ^a	0,003	5,13
12	34,72	33,53	34,92	34,73	0,40	3,58
24	54,39 ^a	51,87 ^a	52,23 ^a	47,53 ^b	0,001	3,39
48	65,86 ^a	62,05 ^{ab}	60,44 ^b	54,12 ^c	<0,001	3,59
CH ₄	18,85 ^a	17,59 ^{ab}	17,37 ^b	15,90 ^c	<0,001	2,96

¹ Tratamentos: CTL = Controle; AGCM20 = 5 gramas AGCM; AGCM40 = 10 gramas AGCM; AGCM80 = 20 gramas AGCM.

Letras diferentes na mesma linha diferem entre si (P≤0,05), de acordo com o teste Tukey.

Segundo Eugene et al. (2008), essa redução significativa de CH₄ pode ser consequência da diminuição na IMS proveniente da reduzida digestibilidade de FDN da dieta. Mas alguns autores defendem que há uma direta na inibição da população de protozoários ciliados e das *Archaeobacterias* metanogênicas que são produtoras de CH₄ (DOHME et al., 2001; SOLIVA et al., 2003). Van Zijderveld et al., (2011) foram os primeiros a investigar os efeitos *in vivo* de C8:0 e C10:0 na metanogênese com concentrações de 10mg/Kg de MS na dieta e não obtiveram nenhuma redução na produção de CH₄. No entanto, Ajisaka et al., (2002) demonstraram reduções na metanogênese de 40% e 60% com o fornecimento apenas de ácido cáprico nas concentrações de 20 e 40mg respectivamente em estudos *in vitro*. Estas observações foram confirmadas mais tarde por Goel et al. (2009), com reduções de metano de 45 e 88% com 20 e 30mg de ácido cáprico.

Dohme et al. (2000) testou *in vitro* os efeitos de diferentes fontes de lipídeos com elevado teor de AGCM - C8:0 até C16:0. Concluíram que o óleo de coco e óleo de palma reduziram as populações das *Archaeas* metanogênicas e protozoários ciliados, além de suprimir a produção de CH₄. Neste mesmo experimento os autores verificaram que os tratamentos eficazes prejudicaram significativamente a

degradação da fibra em relação ao controle. Experimento realizado comparando ácido láurico e óleo de coco reduziu substancialmente a contagem de protozoários para ambos os tratamentos em relação ao controle, e a taxa de produção de metano foi reduzida apenas com a adição do óleo de coco (HRISTOV, et al., 2009). Assim, os resultados confirmam que o efeito de supressão de CH_4 do óleo de coco não é dependente apenas da inibição de protozoários. Em vez disso, os dados indicam que os AGCM inibem diretamente as *Archaeas* metanogênicas no rúmen, alterando sua atividade metabólica, bem como a composição da população metanogênica do rúmen (MACHMÜLLER, 2006).

Os tratamentos apresentaram comportamento distinto nos tempos de coleta de 6 e 12hs de incubação, se comparados com os períodos de 24 e 48hs (Tabelas 2 e 3). Houve aumento ($P<0,05$) de AGCC totais, acetato, propionato, butirato, valerato e do ácido isovalérico até 12 horas de incubação. Após esse período ocorreu decréscimo ($P<0,05$) de AGCC totais, acetato, propionato, valerato, ácido isovalérico e isobutírico no período de 24hs até 48hs de incubação *in vitro* gás. A relação acetato:propionato (C2:C3) teve uma redução ($P<0,05$) até às 24hs de incubação (Tabela 2).

Esse comportamento distinto da produção de AGV's no rúmen pode ser devido à ação das bactérias e protozoários ruminais, que nas primeiras horas de incubação fermentam alimento não fibroso e com o aumento do tempo de incubação há maior fermentação de alimentos fibrosos (CHAI et al., 2004). No início da incubação *in vitro* gás, os AGCM estão ligados às estruturas dos alimentos (PALMQUIST & MATTOS, 2006), com o passar do tempo e com a degradação do alimento os ácidos graxos possuem efeito mais tóxico sobre os micro-organismos ruminais, alterando a produção dos AGV's. No entanto, não se sabe se esse comportamento ocorreria da mesma forma em estudos *in vivo*, pois a dieta é fornecida mais vezes ao dia, evitando o efeito deletério que os AG causam aos micro-organismos ruminais.

Tabela 2. Concentração total de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), ácido acético, ácido propiônico e relação acetato:propionato (C2:C3) observados pela técnica *in vitro* gás após inoculação com a adição de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) no substrato em função do tempo.

ITEM	Tratamentos ¹ (Mm/mol)	Tempo (horas)				
		0 ²	6	12	24	48
AGCC, total	CTL	22,71	43,84 ^b	58,13 ^b	75,86 ^{ab}	97,91 ^a
	AGCM20	23,14	44,85 ^{ab}	60,94 ^{ab}	79,48 ^a	98,20 ^a
	AGCM40	23,47	46,08 ^{ab}	63,04 ^{ab}	79,79 ^a	92,44 ^{ab}
	AGCM80	23,11	47,88 ^a	64,32 ^a	73,31 ^b	81,29 ^b
	P>f	0,70	0,04	0,02	0,001	0,004
	CV%	3,83	4,02	4,04	2,55	6,14
Acético	CTL	15,48	29,44	36,75 ^b	47,10 ^a	58,90 ^a
	AGCM20	15,74	29,98	38,49 ^{ab}	48,27 ^a	57,81 ^a
	AGCM40	15,92	30,89	39,90 ^{ab}	48,27 ^a	54,52 ^a
	AGCM80	15,56	31,65	40,58 ^a	44,23 ^b	46,88 ^b
	P>f	0,75	0,14	0,03	0,002	<0,001
	CV%	3,92	4,33	4,33	2,71	5,72
Propiônico	CTL ²	4,43	8,51 ^b	11,87 ^b	15,79	20,94 ^a
	AGCM20	4,49	8,66 ^b	12,16 ^b	16,16	20,71 ^a
	AGCM40	4,56	8,91 ^{ab}	12,81 ^{ab}	16,49	19,45 ^{ab}
	AGCM80	4,58	9,58 ^a	13,70 ^a	15,73	17,41 ^b
	P>f	0,57	0,003	0,003	0,10	0,005
	CV%	3,64	3,69	4,46	2,75	6,17
C2:C3	CTL	3,491	3,459 ^a	3,09 ^{ab}	2,98 ^a	2,82
	AGCM20	3,506	3,460 ^a	3,17 ^a	2,99 ^a	2,79
	AGCM40	3,472	3,464 ^a	3,12 ^{ab}	2,93 ^{ab}	2,80
	AGCM80	3,414	3,301 ^b	2,96 ^b	2,81 ^b	2,69
	P>f	0,18	<0,001	0,01	0,02	0,18
	CV%	1,69	1,27	2,40	2,56	2,98

¹ Tratamentos: CTL = Controle; AGCM20 = 5 gramas AGCM; AGCM40 = 10 gramas AGCM; AGCM80 = 20 gramas AGCM.

² Após 2 horas de incubação.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P \leq 0,05$), de acordo com o teste Tukey.

Foi observado aumento da ordem de 10% na produção total de AGV's até às 12hs de incubação ($P < 0,05$), após esse período os AGCM causaram uma redução de 17% (Tabela 2). Ambas as diferenças ocorreram no tratamento AGCM80 em relação ao controle. Moreira et al. (2009) relataram acentuada correlação positiva entre a produção de AGV's e o volume de gases produzidos *in vitro*, dados esses semelhantes aos encontrados no presente estudo. No entanto, Hristov et al. (2009) reduziu ($P < 0,05$) a produção total de AGV's no líquido ruminal em 24hs com a adição de 530g de óleo de coco, na dieta de vacas em lactação, que contém 240g de ácido láurico em sua composição. Em trabalho mais recente, o óleo de coco não

afetou a produção total de AGV's em 24hs de incubação *in vitro*, portanto não havendo alterações na funcionalidade da comunidade microbiana e nos padrões de fermentação ruminal (PANYAKAEW et al., 2013).

As respostas do uso de AGCM relativas a protozoários são diferentes do que ocorre em outras populações microbianas envolvidas na transferência de hidrogênio, esse fato explica as respostas variadas em relação à produção de AGV's no rúmen (HRISTOV et al., 2009). Conclusões de Reveneau et al. (2012), evidenciaram que as mudanças no perfil de produção de AGV's estão associadas com uma tendência na diminuição da digestibilidade ruminal.

A produção de ácido acético e propiônico aumentaram em 10% e 14% até às 12hs de incubação ($P < 0,05$) e após esse período houve uma redução ($P < 0,05$) de acetato e propionato de 17 e 20%, respectivamente, do grupo AGCM80 em relação ao controle (Tabela 2). As proporções de ácido acético e propiônico tiveram variação entre 57,67 a 67,34% e 19,31 a 21,45% em todo o período de incubação *in vitro* gás, respectivamente, dentro da normalidade de 54 a 74%, para o acetato, e 16 a 27% para o propionato (BERCHIELLI et al., 2006; GOULARTE et al., 2011). Aumentos na concentração de propionato no rúmen devido à adição de AGCM foram relatados anteriormente (AJISAKA et al., 2002; YABUUCHI et al., 2006; HRISTOV et al., 2009).

Em contraste, a utilização de ácido láurico em estudo de Hristov et al., (2004b) *in vivo* não promoveu o aumento de propionato no rúmen. Trabalho realizado por Panyakaew et al., (2013) usando diferentes níveis de óleo de coco em 24 horas de incubação *in vitro*, resultaram em aumentos de 33% em média de propionato e redução de 11 a 17% de acetato. Dados semelhantes à Reveneau et al. (2012) que obteve aumentos em propionato e redução em acetato utilizando 5% de óleo de coco infundido diretamente no rúmen de vacas em lactação.

Incremento na participação de propionato tem sido associado à menor produção de H_2 , ao ser transformado em succinato, pela ação da fumarato redutase, enzima que se encontra em bactérias gram negativas (BERGEN & BATES, 1984). Segundo JOHNSON & JOHNSON, (1995), a maior produção de propionato está relacionada diretamente com a metanogênese ruminal, ou seja, a redução na produção de CH_4 . Essa relação não pode ser feita no presente estudo pois a mensuração do CH_4 foi realizada apenas no total das 49hs de incubação.

Henderson (1973) não relataram efeitos inibitórios de ácido láurico em bactérias do gênero *Selenomonas ruminantium*, bactéria importante do rúmen envolvida na descarboxilação de succinato em propionato (WOLIN & MILLER, 1988). É provável que o aumento da concentração de propionato, como ocorreu no presente estudo até às 12hs de incubação, ocorreu devido à inibição dos AGCM em bactérias e protozoários que não estão envolvidos na produção de propionato, assim, indiretamente, promovendo o crescimento de espécies, tais como *Selenomonas ruminantium* que é importante para a produção de ácido propiônico no rúmen.

A relação C2:C3 foi menor no tratamento AGCM80 em relação aos demais em todo período de incubação ($P < 0,05$). Apesar disso, é necessário salientar que a produção total de AGV's foi reduzida a partir das 12hs de incubação. Segundo Teixeira & Teixeira (2001) a proporção ideal da relação C2:C3 está entre 2:1 e 4:1, onde no presente trabalho se manteve dentro desta faixa considerada ideal. A redução na relação acetato:propionato se deve ao aumento percentual do ácido propiônico em detrimento do ácido acético, tornando o rúmen mais eficiente energeticamente. Reveneau et al. (2012) também observaram menor proporção C2:C3 com a adição de 5% de óleo de coco, juntamente com Hristov et al. (2011) e Sutton et al. (1983) com o uso de ácido láurico e óleo de coco, respectivamente. Este fato favorece a lipólise, contribuindo para presença de ácidos graxos livres no meio ruminal (BALIEIRO-NETO & MELLOTTI, 2007). No entanto, Hristov et al. (2009) não encontrou queda na relação C2:C3 com o uso de óleo de coco na dieta de vacas em lactação, apenas com a adição de ácido láurico.

Da mesma forma que os outros AGV's, houve aumento dos ácidos valérico e butírico ($P < 0,05$) até 12hs, e no período posterior até 24hs de incubação ocorreu decréscimo ($P < 0,05$) (Tabela 3). Além do propionato, o valerato é consumidor de hidrogênio, o que resulta da redução de CH_4 quando há aumento desses AGV's (REVENEAU et al., 2012). Nas 24hs de incubação ocorreu aumento de ácido valérico em todos os grupos de AGCM em comparação com o controle ($P < 0,05$). Da mesma forma, não podemos associar a produção de CH_4 com a redução de ácido valérico, pois as coletas para análise de CH_4 foram realizadas somente no total das 48hs de incubação.

Tabela 3. Concentração total de ácido butírico, ácido isobutírico, ácido valérico e ácido isovalérico observados pela técnica *in vitro* gás após inoculação com a adição de ácidos graxos de cadeia media (AGCM) no substrato em função do tempo.

ITEM	Tratamentos ¹ (Mm/mol)	Tempo (horas)				
		0 ²	6	12	24	48
Butírico	CTL	2,34	5,18 ^b	8,35	10,98 ^b	14,40
	AGCM20	2,42	5,46 ^{ab}	9,09	12,74 ^a	16,02
	AGCM40	2,43	5,46 ^{ab}	9,04	12,68 ^a	15,10
	AGCM80	2,48	5,71 ^a	8,68	11,45 ^b	14,15
	P>f	0,25	0,02	0,17	<0,001	0,22
	CV%	3,91	3,63	5,59	3,94	8,67
Isobutírico	CTL	0,10	0,17	0,25	0,45 ^b	0,81 ^a
	AGCM20	0,11	0,17	0,27	0,51 ^a	0,79 ^{ab}
	AGCM40	0,10	0,17	0,27	0,48 ^{ab}	0,69 ^b
	AGCM80	0,10	0,17	0,24	0,34 ^c	0,49 ^c
	P>f	0,15	0,79	0,10	<0,001	<0,001
	CV%	3,77	3,92	6,99	5,24	7,65
Valérico	CTL	0,16	0,32 ^c	0,49 ^b	0,75 ^b	1,25
	AGCM20	0,16	0,34 ^{bc}	0,49 ^b	0,86 ^a	1,28
	AGCM40	0,16	0,37 ^b	0,56 ^{ab}	0,92 ^a	1,26
	AGCM80	0,15	0,42 ^a	0,62 ^a	0,84 ^a	1,25
	P>f	0,42	<0,001	0,003	<0,001	0,97
	CV%	4,62	3,78	7,61	4,44	7,82
Isovalérico	CTL	0,20	0,24 ^c	0,41 ^b	0,79 ^b	1,61 ^a
	AGCM20	0,22	0,25 ^c	0,43 ^b	0,93 ^a	1,59 ^a
	AGCM40	0,23	0,28 ^b	0,47 ^{ab}	0,94 ^a	1,43 ^a
	AGCM80	0,23	0,35 ^a	0,50 ^a	0,71 ^b	1,10 ^b
	P>f	0,09	<0,001	0,008	<0,001	<0,001
	CV%	5,01	4,44	7,01	5,77	8,11

¹ Tratamentos: CTL = Controle; AGCM20 = 5 gramas AGCM; AGCM40 = 10 gramas AGCM; AGCM80 = 20 gramas AGCM.

² Após 2 horas de incubação.

Letras diferentes na mesma coluna diferem entre si ($P \leq 0,05$), de acordo com o teste Tukey.

Estudos realizados por Reveneau et al. (2012) e Eugene et al. (2004) fornecendo óleo de coco *in vivo* e *in vitro*, respectivamente, causaram aumento de valerato, e redução de butirato. A concentração de butirato também foi reduzida quando comparada à ação tanto do óleo de coco como do ácido láurico em relação a um controle (HRISTOV et al., 2009). Panyakaew et al., (2013) usando diferentes níveis de óleo de coco em 24 horas de incubação *in vitro*, obtiveram redução na produção de butirato de 23 a 32%, resultados mais elevados dos que encontrados no presente estudo no mesmo período de incubação. Os efeitos tóxicos dos lipídeos causam queda no número ou na atividade de alguns micro-organismos, o que está

relacionado com reduções nas concentrações de ácido butírico, principalmente com altas proporções de concentrado na dieta (EIFERT et al., 2005; BALIEIRO-NETO & MELOTTI, 2007). Hristov et al. (2009) verificou o efeito dos AGCM na redução de butirato, e conclui que ocorreu inibição de protozoários importantes produtores de ácido butírico no rúmen, como o *Butyrivibrio fibrisolvens*. A atividade carboximetilcelulase no rúmen foi reprimida pela adição de ácido láurico (HRISTOV et al., 2004b).

Concentrações de isovalerato e isobutirato são indicativos de fermentação de aminoácidos, principal fator de redução do pH ruminal quando há altas concentrações desses AGV's (VARGAS et al., 2001). No entanto, Christensen et al. (1994) observaram tendência de redução de isovalerato em dietas suplementadas com sebo bovino sem efeitos sobre o pH ruminal. Na Tabela 3 é possível observar que houve aumento de 18% ($P < 0,05$) na produção de isovalerato no grupo AGCM80 até às 12hs de incubação, e após esse período ocorreu uma redução ($P < 0,05$) tanto de isovalérico de 32% no tratamento AGCM80, quanto de isobutírico de 15 e 40% nos tratamentos AGCM40 e 80, respectivamente nas 48hs de incubação. Dados esses semelhantes à Reveneau et al. (2012) que adicionou 5% de óleo de coco infundido diretamente no rúmen de vacas em lactação.

5.4 CONCLUSÃO

A adição *in vitro* de ácidos graxos de cadeia média reduz a produção total de gases e a metanogênese ruminal e seu uso na atividade leiteira apresenta potencial em reduzir a emissão de gases de efeito estufa. Os AGCM apresentam ação como aditivos nutricionais modificando o padrão de fermentação ruminal pela técnica *in vitro* gás, alterando a proporção dos ácidos graxos de cadeia.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJISAKA, N.; MOHAMMED N.; HARA K.; MIKUNI K.; HARA K.; HASHIMOTO H.; KUMATA T.; KANDA S.; ITABASHI H. Effects of medium-chain fatty acid-cyclodextrin complexes on ruminal methane production *in vitro*. **J. Anim. Sci.** 73:479–484, 2002.
- BAKER, S. K. Rumen methanogens, and inhibition of methanogenesis. **Aust. J. Agric. Res.**, 50:1293, 1999.
- BALIEIRO-NETO, G.; MELLOTI, L. Produção de ácidos graxos voláteis e contagem de protozoários ruminais em bovinos suplementados com gordura. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 44, p. 115-121, 2007.
- BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. **Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: Funep, v.2, 583p, 2006.
- BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **J. Anim. Sci.**, v. 58, n. 6, p. 1465-1483, 1984.
- CHAI, W. Z.; GELDER, A. H.; CONE, J. W. Relationship between gas production and starch degradation in feed samples. **Anim. Feed Sci. Techn.**, v.114, n.2, p. 195-204, 2004.
- CHRISTENSEN, R. A.; CAMERON, M. R.; CLARK, J. H.; et al. Effects of amount of protein and ruminally protected amino acids in the diet of dairy cows fed supplemental fat. **J. Dairy Sci.**, v.77, p.1618-1629, 1994.
- DOHME, F.; MACHMÜLLER, A.; WASSERFALLEN, A.; KREUZER M. Ruminal methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. **Let. Appl. Microbiol.** 32:47–51, 2001.
- DOHME, F.; MACHMÜLLER, A.; WASSERFALLEN, A.; KREUZER, M. Comparative efficiency of various fats rich in medium-chain fatty acids to suppress ruminal methanogenesis as measured with RUSITEC. **Can. J. Anim. Sci.**, 80, 473–482, 2000.
- EIFERT, E. C.; LANA, 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 em vacas lactantes. **Rev. Bras. Zootec.**, v.34, p.297-308, 2005.
- EUGENE, M.; MASSE, D.; CHIQUETTE, J.; BENCHAAAR, C. Short communication: Meta-analysis on the effects of lipid supplementation on methane production in lactating dairy cows. **Can. J. Anim. Sci.**, 88:331–334, 2008.

FINLAY, B. J.; ESTEBAN, G.; CLARKE, K. J., WILLIAMS, A. G.; EMBLEY, T. M.; HIRT, R. P. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. **FEMS Microbiol. Lett.** 117, 157–162, 1994.

GOEL, G. K. et al. Effects of capric acid on rumen methanogenesis and biohydrogenation of linoleic and α -linolenic acid. **Animal** 3:810–816, 2009.

GOULARTE, S. R.; ÍTALO, L. C. V.; SANTOS, G. T.; ÍTAVO, C. C. B. F.; OLIVEIRA, L. C. S.; et al. Ácidos graxos voláteis no rúmen de vacas alimentadas com diferentes teores de concentrado na dieta. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.63:1479-1486, 2011.

HARFOOT, C. G. Lipid metabolism in the rumen. **Prog. Lipid Res.** 17, 21–55, 1978.

HARVATINE, K. J. & ALLEN, M. S. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 89:1081–1091, 2006.

HENDERSON, C. The effects of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. **J. Agric. Sci.** 81:107–112, 1973.

HRISTOV, A. N. et al. Effect of lauric acid and coconut oil on ruminal fermentation, digestion, ammonia losses from manure, and milk fatty acid composition in lactating cows. **J. Dairy Sci.** 92:5561–5582, 2009.

HRISTOV, A. N.; GRANDEEN, K. L.; ROPP, J. K.; MCGUIRE, M. A. Effect of sodium laurate on ruminal fermentation and utilization of ruminal ammonia nitrogen for milk protein synthesis in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 87:1820–1831, 2004b.

HRISTOV, A. N.; IVAN, M.; MCALLISTER, T. A. *In vitro* effects of individual fatty acids on protozoal numbers and on fermentation products in ruminal fluid from cattle fed a high concentrate, barley-based diet. **J. Anim. Sci.**, 82:2693–2704, 2004a.

JOHNSON, K. A.; JOHNSON, D. E. Methane emissions from cattle. **J. Anim. Sci.**, Champaign, v. 73, p. 2483-2492, 1995.

JORDAN, E.; LOVETT, D. K.; MONAHAN, F. J.; CALLAN, J.; FLYNN, B.; O'MARA, F.P. Effect of refined coconut oil or copra meal on methane output and on intake and performance of beef heifers. **J. Anim. Sci.**, 84, 162–170, 2006.

KREUZER, M.; KIRCHGESSNER, M.; MÜLLER, H. L. Effect of defaunation on the loss of energy in wethers fed different quantities of cellulose and normal or steamflaked maize starch. **Anim. Feed Sci. Technol.** 16, 233–241, 1986.

LANA, R.P.; RUSSELL, J.B.; Van AMBURGH, M.E. The role of pH in regulating ruminal methane and ammonia production. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.2190-2196, 1998.

MACHMÜLLER, A. Medium-chain fatty acids and their potential to reduce methanogenesis in domestic ruminants. **Agric., Ecos. and Envir.** 112:107–114, 2006.

MACHMÜLLER, A., DOHME, F.; SOLIVA, C. R.; WANNER, M.; KREUZER, M. Diet composition affects the level of ruminal methane suppression by medium-chain fatty acids. **Aust. J. Agric. Res.**, 52, 713–722, 2001.

MACHMÜLLER, A., SOLIVA, C.R.; KREUZER, M. *In vitro* ruminal methane suppression by lauric acid as influenced by dietary calcium. **Can. J. Anim. Sci.**, 82, 233–239, 2002.

MACHMÜLLER, A.; DOHME, F.; SOLIVA, C. R.; WANNER, M.; KREUZER, M. Diet composition affects the level of ruminal methane suppression by medium-chain fatty acids. **Aust. J. Agric. Res.**, 52, 713–722, 2001.

MOREIRA, P. C.; REIS, R. B.; REZENDE, P. L. P.; MENDONÇA, A. C.; WASCHECK, R. C.; MARTINS, A. F. Produção de ácidos graxos voláteis, avaliada pela técnica semiautomática *in vitro*, na dieta de ruminantes com diferentes fontes de carboidratos na fração volumosa. **Ciênc. Anim. Bras.**, v. 10:413-424, 2009.

MOSS, A. R.; JOUANY, J. P.; NEWBOLD, J. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Ann. Zootech.** 49, 231–253, 2000.

MOTERLE, D. F. et al . Methane efflux in rice paddy field under different irrigation managements. **Braz. J. Soil Sci.**, 37: 431-437, 2013.

NEWBOLD, C. J.; LASSALAS, B.; JOUANY, J. P. The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. **Let. Appl. Microbiol.**, 21:230–234, 1995.

PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídeos. **In: BERCHIELLI, T.T. et al. Nutrição de ruminantes.** Jaboticabal: FUNEP. Cap.10, p.287-310, 2006.

PANYAKAEW, P.; GOEL, G.; LOURENÇO, M.; YUANGKLANG, C.; FIEVEZ, V. Medium-chain fatty acids from coconut or krabok oil inhibit *in vitro* rumen methanogenesis and conversion of non-conjugated dienoic biohydrogenation intermediates. **Anim. Feed Sci. Tech.**, 180:18–25, 2013.

REVENEAU, C.; KARNATI, S. K. R.; OELKER, E. R.; FIRKINS, J. L. Interaction of unsaturated fat or coconut oil with monensin in lactating dairy cows fed 12 times daily. I. Protozoal abundance, nutrient digestibility, and microbial protein flow to the omasum. **J. Dairy Sci.** 95 :2046–2060, 2012.

SENGER, C. C. D. **Comparação de técnicas na avaliação da qualidade de silagens de milho.** 126f. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.

SIT, V.; POULIN-COSTELLO, M. Catalogue of curves for fitting. Biometrics Information. Handbook nº 4. **Ministry of Forest Research Program.** British Columbia, Canada, p. 1-10, 1994.

SOLIVA, C. R.; HINDRICHSEN, I. K.; MEILE, L.; KREUZER, M., MACHMÜLLER, A. Effects of mixtures of lauric and myristic acid on rumen metha-nogens and methanogenesis *in vitro*. **Lett. Appl. Microbiol.**, 37, 35–39, 2003.

SOLIVA, C. R.; MEILE, L.; CIEŚLAK, A.; KREUZER, M.; MACHMÜLLER, A. 2004. Rumen simulation technique study on the interactions of dietary lauric and myristic acid supplementation in suppressing ruminal methanogenesis. **Br. J. Nutr.** 92:689–700. 2004.

TAVENDALE, M. H.; MEAHGER, L. P.; PACHECO, D.; WALKER, N.; ATTWOOD, G. G.; SIVAKUMARAN, S. Methane production from *in vitro* rumen incubations with Lotus pedunculatus and Medicago sativa, and effects of extractable condensed tannin fractions on methanogenesis. **Anim. Feed Sci. Tech.**, 123-124, p.403-419, 2005.

TEIXEIRA, J. C.; TEIXEIRA, L. F. A. C. **Princípios de nutrição de bovinos leiteiros**, textos acadêmicos. Lavras: UFLA/FAEP, 245p, 2001.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S.; McALLAN, A. B.; FRANCE, J. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetic of ruminant feeds. **Anim. Feed Sci. Tech.**, v.48, n. 2, p. 185-197, 1994.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. Ithaca, NY: Cornell Univ. Press. 476 pp, 1994.

VAN ZIJDERVELD, S. M. et al. Dietary inclusion of diallyl disulfide, yucca powder, calcium fumarate, an extruded linseed product, or medium-chain fatty acids does not affect methane production in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 94 :3094–3104, 2011.

VARGAS, L. H.; LANA, R. P.; MÂNCIO, A. B. et al. Influência de Rumensin®, óleo de soja e níveis de concentrado sobre o consumo e os parâmetros fermentativos ruminais em bovinos. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 30, p.1650-1658, 2001.

WOLIN, M. J.; MILLER, T. L. Microbe-microbe interactions. Page 527 in **The Rumen Microbial Ecosystem**. P. N. Hobson, ed. Elsevier Scientific Publishers, London, UK, 1988.

YABUUCHI, Y., MATSUSHITA, Y.; OTSUKA, H.; FUKAMACHI, K.; KOBAYASHI, Y. Effects of supplemental lauric acid-rich oils in high-grain diet on *in vitro* rumen fermentation. **J. Anim. Sci.** 77:300–307, 2006.

6 CAPÍTULO 2

ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE EM VACAS EM LACTAÇÃO

RESUMO

Nos últimos anos a pesquisa foi voltada para a compreensão da biossíntese da gordura do leite e os fatores que influenciam a composição dos ácidos graxos da gordura do leite. Assim com o objetivo de avaliar o uso de ácidos graxos de cadeia média (AGCM) contendo ácido capróico (C6:0), ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), ácido láurico (C12:0) e ácido mirístico (C14:0) na dieta de vacas em lactação foi conduzido um experimento com 12 vacas da raça holandesa (DEL 42±20). Os tratamentos foram os seguintes: 1) CTL (controle, sem suplementação AGCM), 2) AGCM20 (5g de AGCM), 3) AGCM40 (10g de AGCM) e 4) AGCM80 (20g de AGCM). O delineamento experimental foi um triplo quadrado latino 4x4, com quatro animais, quatro tratamentos e quatro períodos experimentais. Não houve diferenças ($P>0,05$) com relação aos dados produtivos, entretanto ocorreu uma tendência de aumento ($P<0,10$) no peso corporal nos tratamentos AGCM40 e AGCM80 em relação ao controle. A produção individual de ácidos graxos não sofreu alterações, no entanto, houve aumento linear significativo ($P<0,05$) de C17:0 e C18:3n6, e uma tendência de aumento ($P<0,10$) de C18:1n7, CLA n10,c12, C20:0, C20:2n3, C24:0 e na produção total de AGMI. Deste modo, o uso de ácidos graxos de cadeia média não afeta a produção modificando a qualidade através do perfil de ácidos graxos do leite em vacas em lactação.

Palavras-chave: Aditivos. Gordura do leite. Lipídeos saturados. Perfil de ácidos graxos.

MEDIUM CHAIN FATTY ACIDS IN PRODUCTION AND QUALITY IN MILK COWS IN LACTATION

ABSTRACT

In recent years the research was focused on the understanding of fat biosynthesis of milk and factors that influence the fatty acid composition of milk fat. The aim of the present study was to evaluate the use of medium chain fatty acids (MCFA) containing caproic acid (C6: 0), caprylic acid (C8: 0), capric acid (C10: 0), lauric acid (C12: 0) and myristic acid (C14: 0) in the diet of lactating cows an experiment was conducted with 12 holstein cows (DEL 42 ± 20). The treatments were: 1) Control (CTL, without supplementation MCFA), 2) AGCM20 (5g MCFA), 3) AGCM40 (10g MCFA) and 4) AGCM80 (20g MCFA). The experimental design was a 4x4 latin square triple, four animals, four treatments and four experimental periods. There were no differences ($P > 0.05$) with respect to production rate, however there was an increasing trend ($P < 0.10$) in body weight in AGCM40 and AGCM80 treatments compared to the control. The individual production of fatty acids did not change, however there was significant linear increase ($P < 0.05$) of C17:0 and C18: 3n6, and an increasing trend ($P < 0.10$) of C18: 1t11 CLA t10, c12, C20:0, C20:2n3, C24:0 and the total production of MUFA. Thereby, the use of medium chain fatty acids does not affect production quality by through of modifying the fatty acids in milk cows.

Keywords: Additives. Fatty acids profile. Milk fat. Saturated lipids.

6.1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a pesquisa foi voltada para a compreensão da biossíntese da gordura do leite e os fatores que influenciam a composição dos ácidos graxos da gordura do leite. Estas investigações têm sido de valor especial, pois identificaram a regulação dos processos de síntese do leite bem como, as vias bioquímicas e fisiológicas da síntese da gordura do leite. Teor e composição dos componentes lácteos podem ser marcadamente afetados pela dieta, onde a gordura e o perfil de ácidos graxos do leite têm sido amplamente investigados em ruminantes devido a alterações dietéticas (GRUMMER, 1991; JENSEN, 2002). No entanto a fase de lactação, o balanço energético, o nível de alimentação, a proporção de concentrado, o pH do rúmen e a utilização de tampões e aditivos são fatores importantes que influenciam os componentes lácteos (PALMQUIST et al., 1993).

A crescente conscientização das propriedades metabólicas dos ácidos graxos individuais do leite na saúde humana (MCGUIRE & BAUMAN, 2002; PARODI, 2002; BAUMAN & GRINARI, 2003) é parte da motivação por trás da tentativa de modelar a produção do perfil de ácidos graxos do leite. Estudos clínicos e epidemiológicos têm fornecido provas de que o consumo de alguns compostos presentes na gordura do leite possui características benéficas para saúde humana, com efeitos na concentração de lipoproteínas de alta densidade (HDL), antivirais, antibacterianos, anticarcinogênicos, antidiabéticos, modulação do sistema imune e partição de energia (HORNUNG et al., 1994; BAUMAN et al., 2000; DAWSON et al., 2002).

Vacas leiteiras de alta produção têm grandes necessidades energéticas que podem exceder a sua capacidade de consumir energia da dieta, resultando em menor produção de leite e de seus constituintes. A adição de lipídeos aumenta a densidade de energia da dieta, se tornando uma ferramenta prática para alterar a produção de gordura do leite e a composição dos ácidos graxos (SUTTON, 1989). No entanto, certas alterações dietéticas incluindo dietas ricas em lipídeos, por exemplo, podem induzir a depressão da gordura do leite (PIPEROVA et al., 2000), dependendo do nível e do tipo de lipídeo utilizado e da extensão da biohidrogenação

ruminal. Aditivos lipídicos oriundos de óleos vegetais, como os ácidos graxos de cadeia média têm sido utilizados para aumentar a energia dietética de ruminantes, modificando o perfil de ácidos graxos da gordura do leite com incrementos na produção e gordura do leite (PALMQUIST & MATTOS, 2006; HRISTOV et al., 2009; VAN ZIJDERVELD et al., 2011).

Assim, objetivou-se avaliar os efeitos da suplementação oral de ácidos graxos de cadeia média, contendo ácido capróico (C6:0), ácido caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0), ácido láurico (C12:0) e ácido mirístico (C14:0) na dieta de vacas em lactação sobre concentração de gordura do leite, o perfil de ácidos graxos do leite e nível de produção leiteira.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 Local e época

O experimento foi conduzido pelo Núcleo de Pesquisa e Extensão da Cadeia Leiteira (NUPECLE) na Agropecuária Acatrolli, localizada no município de Palmeira das Missões no estado do Rio Grande do Sul, 27°53'58" latitude sul e 53°18'49" longitude oeste, com altitude média de 639 m acima do nível do mar, com temperatura média anual inferior a 20°C, clima subtropical úmido e precipitação pluviométrica média de 1838 mm, no período de maio de 2014 a julho de 2014.

6.2.2 Animais, tratamentos e procedimento experimental

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) em seus aspectos éticos e metodológicos, conforme o parecer número 027/2014.

Doze vacas da raça holandesa em início de lactação (42 ± 20 DEL) com peso médio de 654 Kg foram submetidas aos seguintes tratamentos: 1) CTL (controle, sem suplementação AGCM), 2) AGCM20 (5g de AGCM), 3) AGCM40 (10g de AGCM) e 4) AGCM80 (20g de AGCM). Foi utilizado como fonte de AGCM um produto comercial contendo os ácidos capríco (C6:0), caprílico (C8:0), cáprico (C10:0), láurico (C12:0), e mirístico (C14:0) extraídos de óleo de palma e óleo de coco, na forma livre com aditivo aromatizante e palatilizante a base de essência de baunilha, farelo de soja transgênico (*Agrobacterium* sp.) e veículo q.s.p. A dose recomendada pelo fabricante é de 40g/animal/dia com o nível mínimo garantido de 10 gramas de AGCM para cada 40g de produto.

Os animais foram alojados em um sistema semiconfinado, com água *ad libitum*, onde recebiam dieta totalmente misturada (TMR) com uma sobra de no mínimo 5% do volume diário, confeccionada por vagão misturador e acesso livre a

pastagem de trigo duplo propósito (cv. BRS Umbu). A mistura da TMR era realizada por 5 minutos para garantir uma mistura homogênea, que continha 60% de volumoso e 40% de concentrado na base de matéria seca para atender as especificações do NRC (2001) para vacas de 650Kg de peso vivo produzindo 40 litros/dia com 3,3% de gordura e 2,9 de proteína. A dieta foi fornecida duas vezes ao dia às 06:00hs e 16:00hs e a ordenha realizada as 5:00hs e 15:00hs. Cada ingrediente da dieta foi coletado separadamente anterior ao experimento, bem como da dieta oferecida para os animais durante cada período experimental. Ao longo do período experimental as sobras de cocho foram recolhidas e ao final do período uma amostra representativa foi coletada. Estas amostras foram congeladas em freezer a -20°C, para posterior análise bromatológica e perfil de ácidos graxos no Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL) da UFSM.

O período experimental teve duração de 56 dias, dividido em quatro períodos de 14 dias: os dez primeiros dias de cada período foram destinados à adaptação dos animais às dietas e os quatro últimos dias para a coleta de dados, considerada fase experimental. Foi realizada a pesagem dos animais e avaliação do escore de condição corporal na escala de 1 a 5 (onde, 1=muito magra e 5=muito gorda) segundo Edmonson et al. (1989), no início e no final de cada período experimental. Os animais receberam colar digital (Heatime[®] HR), onde foi avaliada a atividade ruminal, através dos minutos ruminados por dia durante a fase experimental. Na mesma fase, em cada período, foi registrada a produção leiteira, mediante pesagens diárias do leite através de sistema automatizado de ordenha, e realizada pesagem do alimento ofertado e recusado. A produção de leite foi corrigida para 4% de gordura (PLC4%) conforme NRC (2001) pela fórmula: PLC4% = (0,4 x kg leite) + (15 x kg de gordura do leite). Para avaliação da ingestão de matéria seca, além da pesagem do alimento fornecido no cocho, foi realizada a estimativa do consumo agrônômico através da diferença entre a massa de forragem residual e inicial, dividindo-se o resultado pela carga animal instantânea (BURNS et al., 1994) e posteriormente comparada segundo o NRC (2001) pela fórmula: IMS (kg/d) = (0.372 x PLC + 0.0968 x Pc) + (1 - e^{(- 0.192 x (WOL + 3.67))}), onde PLC é a produção de leite corrigida para 4% de gordura, Pc é o peso corporal e WOL é o mês de lactação. O termo e^{(- 0.192 x (WOL + 3.67))} é referente ao ajuste da depressão dos dias em lactação.

No 13° e 14° dia de cada período experimental, uma alíquota (aproximadamente 50 mL) de leite de cada animal proporcional a ambas as

ordenhas (manhã e tarde) foi coletada e acondicionada em frasco contendo conservante Bronopol (2-bromo-2-nitro-1,3-propanediol). Os frascos com as amostras foram identificados com o número do animal e o período experimental, acondicionados em caixas isotérmicas com gelo, entre 2° e 6°C, e enviadas ao Laboratório da Universidade de Passo Fundo (UPF) SARLE, para fins de análise da composição (gordura, proteína, lactose, sólidos totais, contagem de células somáticas) e nitrogênio ureico. Para determinação do perfil de ácidos graxos da gordura do leite uma amostra de 100 mL leite de cada animal, no 13° e 14° dias, de ambas as ordenhas (manhã e tarde) foi coletada em frasco âmbar, congelada em freezer (-20°C) e armazenada para posteriores análises no Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL) da UFSM.

6.2.3 Análises bromatológicas

As determinações de matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), extrato etéreo (EE), fibra em detergente ácido (FDA), lignina em detergente ácido (LDA), proteína bruta (PB), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN) e nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) foram realizadas segundo procedimentos descritos por Silva & Queiroz (2002). Ressalta-se que a determinação da fibra em detergente neutro corrigida para cinzas (FDNc) não utilizará sulfito de sódio na solução em detergente neutro, sendo empregada α -amilase. Por isso, a proteína remanescente na FDNc será subtraída após a multiplicação do fator 6,25 pelo teor do NIDN. A abreviação FDNcp expressa o teor de fibra em detergente neutro determinada com o uso de α -amilase termoestável, descontando-se a proteína insolúvel em detergente neutro e as cinzas residuais. Os valores de nutrientes digestíveis totais (NDT) foram estimados segundo equação proposta pelo NRC (2001).

Tabela 1. Proporções dos ingredientes e composição químico-bromatológica dos alimentos utilizados na dieta basal.

Composição	Dieta basal
Ingrediente, Kg/dia	
Silagem Milho	27,78
Trigo ¹	30,00
Pré-secado aveia/azevém	1,50
Feno aveia/azevém	0,50
Casca Soja	2,25
Caroço de Algodão	1,50
Milho	8,77
Farelo de soja	6,19
Bicarbonato	0,41
Bovigold ^{®2}	0,16
Calcário	0,40
Óxido Magnésio	0,03
Sal branco	0,03
MS, % ³	59,59
Composição química, % MS ⁴	
MO	91,53
PB	17,82
EE	2,83
FDN	31,07
FDA	16,38
NIDA	0,10
NIDN	0,31
LDA	1,91
CINZAS	9,19
EN _L ⁵ (Mcal/Kg)	1,89
NDT ⁶	78,56

¹Trigo duplo propósito (cv. BRS Umbu). ²Novo núcleo Bovigold[®] (Tortuga). ³Matéria seca (%) referente apenas a dieta TMR. ⁴Composição química da dieta TMR. ⁵Energia de lactação estimado segundo NRC (2001). ⁶Nutrientes digestíveis totais estimado segundo NRC (2001).

6.2.4 Análises dos componentes do leite

A gordura, proteína, lactose e sólidos totais foram determinados por espectrofotometria com radiação infravermelha, utilizando equipamento Bentley[®] 2000 (Bentley Instruments, Chaska, MN, EUA). A CCS por citometria de fluxo utilizando equipamento Somacount[®] 300 (Bentley Instruments, Chaska, MN, EUA), enquanto o nitrogênio ureico pelo método Infravermelho - PO ANA 009.

6.2.5 Análise do perfil de ácidos graxos da dieta e do leite

A extração de lipídeos totais das amostras foi feita segundo a metodologia de Bligh & Dyer (1959) e expressos em g/100g. Os ácidos graxos foram transesterificados e metilados de acordo com a técnica descrita por Christie (1982). Os ésteres metílicos dos ácidos graxos (EMAG) foram analisados usando um cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização em chama (GC-FID) (Agilent Technologies, modelo HP6890), amostrador automático e coluna capilar Supelco SP-2560 (100m x 0,25 mm x 0,20 μ m). O gás de arraste utilizado foi o hidrogênio à pressão constante de 20 psi. As condições cromatográficas adotadas foram: injetor no modo split (razão 1:50) e temperatura de 250°C, temperatura inicial da coluna de 50°C por 1 minuto, aumentando 15°C por minuto até 185°C, depois 0,5°C por minuto até 205°C e então 5°C por minuto até 220°C, sendo esta temperatura mantida por 10 minutos.

A identificação dos ácidos graxos foi baseada na comparação dos tempos de retenção da amostra com o de ésteres metílicos de padrões, contendo os isômeros geométricos do ácido linoleico conjugado (CLA *cis*-9, *trans*-11 e CLA *trans*-10, *cis*-12), do ácido graxo vacênico (C18:1 *trans*-11) e uma mistura de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos (189-19 e O-5626, Sigma, EUA), por adição de padrão (spiking) e, pelo comprimento equivalente de cadeia (ECL). Os valores do comprimento equivalente de cadeia (ECL), para os EMAG, foram determinados conforme proposto por Visentainer & Franco (2006) e, a identificação, baseada nos valores de ECL determinados para o padrão 189-19 (Sigma, EUA). Os limites de detecção e quantificação foram estimados conforme recomendação da ACS (1980), considerando a razão sinal ruído igual a três e dez respectivamente, a partir de diluições sucessivas de uma solução padrão de araquidato de metila.

A quantificação dos ácidos graxos, em mg/g de lipídios totais, foi efetuada em relação ao padrão interno, tricosanoato de metila (23:0), Sigma. Antes da transesterificação, foi adicionado 1 mL da solução do padrão interno (1 mg/mL) em todas as amostras, para posterior evaporação do solvente sob fluxo de N₂. A quantificação dos ácidos graxos das amostras foi realizada após a verificação da concordância entre os fatores de resposta teóricos e experimentais. Os cálculos da

concentração dos ácidos graxos contidos nas amostras foram realizados conforme Visentainer & Franco (2006).

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos dos ingredientes da dieta basal.

AG	Ingredientes (%)							
	Silagem de milho	Trigo	Pré secado	Feno	Caroço de algodão	Casca de soja	Farelo de soja	Milho
C6:0	nd ¹	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C8:0	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C10:0	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C12:0	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
C14:0	19,91	0,34	23,19	21,87	43,98	28,73	16,46	3,08
C16:0	1,50	17,77	12,29	32,22	13,19	3,84	19,94	18,48
C16:1	0,49	0,24	0,49	1,43	1,54	nd	0,66	2,85
C18:0	2,54	0,98	0,28	9,16	nd	1,16	4,25	3,44
C18:1n9c	14,91	1,64	0,39	14,26	8,28	2,72	9,54	43,29
C18:2n6c	31,64	9,86	10,77	9,53	28,89	61,88	44,53	27,18
C18:3n3	29,00	64,77	52,59	11,53	3,88	1,68	4,61	1,68

¹nd = não detectado.

6.2.6 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado foi um triplo quadrado latino 4x4, cada um com quatro animais, quatro tratamentos e quatro períodos experimentais. Os dados foram submetidos ao teste de komogorov-smirnov para verificar a normalidade residual e a homogeneidade das variâncias pelo teste de Levene. As variáveis foram submetidas à análise de variância pelo procedimento PROC GLM. Em seguida, as médias dos tratamentos foram ajustadas pelo método dos quadrados mínimos ordinários com o comando LSMEANS (Least Squares Means). Após a identificação de significância de tratamento nos efeitos fixos do modelo estatístico, foi efetuada análise de regressão, com o intuito de investigar as alterações nas variáveis dependentes em função dos níveis. Os parâmetros do modelo foram estimados pelo procedimento GLM, enquanto a sua falta de ajuste, pela opção LACKFIT na declaração MODEL, sendo o coeficiente de determinação (r^2), expresso em relação à fonte tratamentos (regressão + falta de ajuste). Foram

avaliados os efeitos de tratamento, período, vaca e quadrado*tratamento. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$, com o uso do programa SAS.

O modelo estatístico usado foi $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + T_k + I_{ij} + \varepsilon_{ij}$, onde Y_{ij} = variável resposta; μ = média geral; α_i = efeito aleatório da vaca; β_j = efeito fixo do período; $T_{k(ij)}$ = efeito fixo do tratamento, I_{ij} = interação quadrado*tratamento, e ε_{ijk} = erro aleatório (resíduo).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observado efeitos dos tratamentos sobre escore de condição corporal, peso corporal e atividade ruminal ($P>0,05$). Resultados estes de acordo com outros estudos que verificaram que não houve variação no peso corporal com a adição de 1,5% na MS na dieta de ácidos graxos de cadeia média contendo C8:0, C10:0 e C12:0 (FUKUMORI et al., 2013). No entanto Harvatine & Allen (2006) observaram redução do peso corporal com a adição de ácidos graxos saturados, resultados que vão de encontro com o presente estudo. Em meta análise feita por Moate et al. (2006), verificaram que o aumento do ácido graxo C20:0 presente na gordura do leite esta negativamente relacionado com o peso corporal, o que não se verificou no presente estudo.

Não houve efeito dos níveis de AGCM na ingestão de matéria seca ($P>0,05$), o que está de acordo com os estudos de Kadegowda et al. (2008), Hristov et al. (2009) e Vyas et al. (2012). No entanto, inúmeros autores relataram que a suplementação de AGCM reduz a IMS em vacas em lactação (ODONGO et al., 2007; HRISTOV et al., 2011; FUKUMORI et al., 2013). Lipídeos de cadeia média reduzem o metabolismo ruminal, diminuindo o número de protozoários e a degradabilidade da fibra, e subsequentemente reduzindo a ingestão de alimentos (DOHME et al., 2001).

A produção de leite geralmente esta relacionada com a ingestão de matéria seca. Com isso, não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) na produção de leite e PLC4% (Tabela 3). Resultados estes semelhantes com diversos autores para produção de leite (KADEGOWDA et al., 2008; HRISTOV et al, 2009; VAN ZIJDERVELD et al., 2011; SUN et al., 2013; VYAS et al., 2013) e produção corrigida para gordura (HRISTOV et al., 2009; VYAS et al., 2012; 2013; SUN et al., 2013). Quando foi adicionado 20g/Kg MS de C8:0 e C10:0 na dieta de vacas em lactação não houve diminuição na produção de leite (VAN ZIJDERVELD et al., 2011). Dados esses semelhantes ao presente estudo, no entanto os níveis utilizados foram de 0,34, 0,68, e 1,34g/Kg de MS, quantidade inferior ao estudo citado anteriormente.

Tabela 3. Peso corporal, escore de condição corporal (ECC), atividade ruminal diária, consumo de matéria seca, produção de leite e composição do leite de vacas suplementadas com diferentes níveis de ácidos graxos de cadeia média (AGCM).

Variáveis	Tratamentos ¹				Média	CV%	P>F
	CTL	AGCM20	AGCM40	AGCM80			
Atividade ruminal, min/d	493,87	514,18	485,34	498,65	498,01	5,00	0,11
IMS ²	23,27	23,15	23,15	23,47	23,26	4,50	0,44
Produção de leite Litros/d	43,60	42,87	42,44	43,52	43,10	4,97	0,79
Corrigida ³ , l/d	40,32	37,68	39,59	40,19	39,45	8,11	0,77
Componentes do leite							
Gordura, %	3,51	3,50	3,57	3,63	3,55	9,65	0,92
Gordura, Kg/d	1,53	1,41	1,51	1,55	1,50	11,83	0,82
Proteína, %	2,91	2,86	2,92	2,91	2,90	2,83	0,57
Proteína, Kg/d	1,27	1,23	1,23	1,26	1,25	5,69	0,78
Lactose, %	4,60	4,58	4,57	4,58	4,58	1,78	0,94
Lactose, Kg/d	2,01	1,97	1,95	2,00	1,98	4,82	0,75
Sólidos Totais, %	11,98	11,90	12,01	12,99	12,22	2,71	0,91
Sólidos Totais, Kg/d	5,22	5,00	5,09	5,22	5,13	7,32	0,93
ECS ⁴	2,29	2,38	2,32	2,14	2,28	42,62	0,47
Ureia, mg/dl	19,05	19,66	19,43	18,86	19,25	6,79	0,37

¹ Tratamentos: CTL = Controle; AGCM20 = 5 gramas AGCM; AGCM40 = 10 gramas AGCM; AGCM80 = 20 gramas AGCM.

² Ingestão de matéria seca estimada segundo NRC (2001).

³ Produção de leite corrigida para 4% de gordura segundo NRC (2001).

⁴ Escore de células somáticas transformada segundo Shook (1993).

Kadegowda et al. (2008) compararam a adição de AGCM na forma de nata, AGCL e CLA infundidos diretamente do rúmen de vacas em lactação e não obtiveram aumento em produção de leite em comparação com o grupo controle, no entanto houve aumento de produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (PLC3,5%) com o uso de nata em comparação com os grupos controle e CLA. Com estudo semelhante Vyas et al. (2013) infundiu diretamente no rúmen de vacas em lactação AGCM na forma de nata e um complexo de AGCL, ambos com ou sem a adição de CLA e conclui que com a adição de CLA nos dois tratamentos houve redução significativa ($P < 0,01$) de 25% na PLC3,5%. Podendo constatar que uma possível depressão na PLC3,5% decorrente do fornecimento de CLA não é evitada pela adição AGCM. Segundo Reveneau et al. (2012a), a utilização de óleo de coco provocou um severo decréscimo na produção de leite em torno de 11% em

comparação com o controle. A variação de resultados encontrados em diversos estudos pode ser devido às diferentes doses, classes lipídicas utilizadas e alterações ruminais.

Não foi observado efeito dos tratamentos ($P > 0,05$) sobre os componentes do leite (gordura, proteína, lactose, sólidos totais e ureia). A porcentagem e produção de gordura do leite não resultaram em diferença estatística dos tratamentos ($P > 0,05$). Dados similares a Hristov et al. (2009), onde forneceram óleo coco e ácido láurico. Resultados estes distintos a Sun et al. (2013) que testaram diferentes níveis de AGCM juntamente com AGCL e verificaram uma tendência de aumento linear ($P < 0,10$) na porcentagem da gordura do leite com o incremento de AGCM na dieta. Da mesma forma, Vyas et al. (2012) relataram que a concentração de gordura do leite foi aumentada ($P < 0,01$) em até 9% pelas quantidades crescentes de AGCM adicionados a dieta de vacas em lactação. Já Van Zijderveld et al. (2011) relataram aumento de 11% ($P < 0,001$) em porcentagem de gordura do leite com a adição de C8:0 e C10:0, atribuindo esse aumento a maior digestibilidade dos AGCM no rúmen do que outros AG testados. Fato este que comprova estudos anteriores, onde Kadegowda et al. (2008), adicionando diretamente no rúmen nata, gordura rica em AGCM, obtiveram aumento de 14% ($P < 0,05$) no percentual de gordura do leite e 18% ($P < 0,05$) na produção de gordura do leite em comparação com o controle. Ácidos graxos de cadeia curta e média (AGCCeM) contribuem mais para a síntese de gordura do leite do que os AGCL, por serem melhor absorvidos, onde são transportados pelo sistema venoso portal atingindo o fígado mais rapidamente do que os AGCL, no entanto, a sua transferência para a gordura do leite pode ser reduzida devido ao extenso metabolismo pelos tecidos extra mamários (Grummer & Socha, 1989).

Em contraste com outros estudos em que houve aumento ou não ocorreu efeito na produção de gordura no leite, alguns mostraram que os AGCM provocam severa depressão na porcentagem da gordura láctea (HRISTOV et al., 2011). Comprovando este fato Reveneau et al. (2012a) observaram redução de 27% ($P < 0,01$) com a adição de óleo de coco em comparação a um grupo controle. A maior formação de C18:1 *trans* e CLA (isômero C18:2 *trans*-10, *cis*-12) inibem a síntese de gordura do leite na glândula mamária de bovinos aumentando o risco da síndrome conhecida como depressão da gordura do leite (DGL) (BAUMGARD et al., 2000; 2002; BAUMAN & GRIINARI, 2003). Embora estudos recentes não

observaram aumento de CLA *trans*-10, *cis*-12 e drástica redução na produção da gordura do leite (REVENEAU et al., 2012a; b), dados esses semelhantes com Shingfield et al. (2010) que atribuíram esse fato a outros isômeros como indicadores da DGL. Estudos de Reveneau et al. (2012a; b) observaram aumento de C18:1 *trans* e redução na gordura do leite.

Em comparação com as repostas observadas para a gordura do leite, apenas efeitos modestos são relatados na concentração da proteína do leite (Sutton, 1989), lactose, sólidos totais, CCS e NUL. Diante desse cenário, trabalhos semelhantes também não verificaram nenhuma diferença na proteína do leite com a adição de fontes de AGCM, e em nenhum dos parâmetros citados (HRISTOV et al., 2009; VYAS et al., 2013; SUN et al., 2013). Mas, Vyas et al. (2012) verificou que houve redução numérica de forma linear ($P < 0,10$) na proteína do leite quando os níveis de AGCM foram mais elevados. E Sun et al. (2013) testando proporções de AGCM com AGCL verificou que houve aumento significativo ($P < 0,05$) em sólidos totais no leite, na maior proporção de AGCM em relação as menores. Esse fato foi atribuído ao aumento numérico ($P < 0,10$) da gordura do leite referente ao mesmo tratamento.

Uma das formas de baixa eficiência dietética tendo perdas de N é na forma de NUL, no entanto no presente trabalho não houve melhoras na eficiência de utilização de N com a adição de AGCM. Resultados estes semelhantes aos de Hristov et al. (2009) que verificaram a eficiência do óleo de coco e ácido láurico na dieta de vacas em lactação e como resultados não obtiveram reduções no NUL. Apesar de ter havido melhorias aparentes no metabolismo ruminal de N nos tratamentos com óleo de coco.

A produção individual de AGCC e M se mantiveram ($P > 0,05$) com a adição de diferentes níveis de AGCM em comparação com o controle (Tabela 4). Dados semelhantes a diversos estudos (HRISTOV et al, 2009; Vyas et al., 2012; 2013). Vyas et al. (2012) que testaram diferentes proporções na dieta de AGCM em comparação a um grupo controle contendo AGPI e encontrou efeitos nos AG individuais apenas em ácido mirístico (C14:0) e miristoleico (C14:1) na gordura do leite onde foram aumentadas ($P < 0,01$) com o aumento de AGCM em comparação ao grupo controle.

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos da gordura do leite (mg/g) de vacas suplementadas com diferentes níveis de ácidos graxos de cadeia média (AGCM).

Variáveis	Tratamentos ¹ (mg/g)				R ²	CV%	P>F
	CTL	AGCM20	AGCM40	AGCM80			
C4:0	11,65	12,83	12,42	12,83	-	17,25	0,33
C6:0	9,23	9,94	9,40	10,34	-	12,97	0,45
C8:0	6,95	7,34	6,67	7,10	-	12,28	0,50
C10:0	19,39	18,56	17,80	18,63	-	11,70	0,65
C11:0	2,53	2,56	2,65	2,71	-	18,71	0,91
C12:0	24,14	23,80	22,96	23,90	-	12,36	0,78
C13:0	1,00	1,21	1,03	0,93	-	30,86	0,21
C14:0	78,50	83,25	76,54	79,04	-	9,58	0,38
C14:1 <i>n</i> -5	5,27	6,45	5,64	6,53	-	20,52	0,22
C15:0	9,94	10,18	9,07	10,09	-	20,68	0,74
C16:0	226,53	234,53	227,83	226,24	-	10,69	0,80
C16:1 <i>n</i> -7	10,56	11,61	11,11	10,96	-	12,58	0,31
C17:0 ²	5,81	6,49	5,64	5,75	0,11	10,49	0,04
C17:1 <i>n</i> -7 <i>c</i>	1,95	2,02	1,74	1,69	-	26,62	0,45
C18:0	75,11	82,92	73,67	77,35	-	14,32	0,37
C18:1 <i>n</i> - <i>t</i> 9	3,23	3,41	3,19	3,51	-	16,86	0,56
C18:1 <i>t</i> -11	14,64	18,05	17,98	15,57	-	14,73	0,10
C18:1 <i>n</i> - <i>c</i> 9	154,95	177,22	158,99	159,99	-	10,10	0,11
C18:2 <i>n</i> -6, <i>t</i> -9, <i>t</i> -12	2,23	2,29	2,06	2,53	-	28,84	0,44
C18:2 <i>n</i> -6 <i>c</i>	26,78	29,01	27,99	27,89	-	8,11	0,22
C18:3 <i>n</i> -3	3,77	4,11	3,64	4,07	-	10,83	0,17
C18:3 <i>n</i> -6 ³	0,22	0,32	0,28	0,50	0,85	47,81	0,002
CLA, <i>c</i> -9, <i>t</i> -11	4,08	4,86	4,32	4,14	-	16,38	0,24
CLA, <i>t</i> -10, <i>c</i> -12	0,30	0,40	0,28	0,36	-	33,52	0,07
CLA, <i>c</i> -11, <i>t</i> -13	0,11	0,15	0,15	0,15	-	32,59	0,20
C20:0	0,82	0,99	0,81	0,84	-	15,83	0,06
C20:1 <i>n</i> -9, <i>c</i> -11	0,34	0,40	0,38	0,41	-	18,33	0,11
C20:3 <i>n</i> -3 <i>c</i>	0,98	1,01	1,15	1,04	-	13,67	0,08
C20:4 <i>n</i> -6	1,41	1,53	1,53	1,36	-	13,55	0,15
C20:5 <i>n</i> -3	0,30	0,33	0,30	0,33	-	21,77	0,84
C22:0	0,32	0,33	0,31	0,30	-	16,56	0,92
C22:6 <i>n</i> -3 <i>c</i>	0,37	0,45	0,43	0,37	-	29,70	0,26
C24:0	0,33	0,48	0,28	0,31	-	50,37	0,08
C24:1 <i>n</i> -9	0,30	0,29	0,28	0,29	-	12,61	0,98

¹ Tratamentos: CTL = Controle; AGCM20 = 5 gramas AGCM; AGCM40 = 10 gramas AGCM; AGCM80 = 20 gramas AGCM.

² $\bar{Y} = 6,0359 - 0,0036x$; ³ $\bar{Y} = 0,2111 + 0,0033x$.

Kadegowda et al. (2008), verificaram, com o fornecimento de nata em comparação com o controle ou com o fornecimento de AGCL, aumento numérico nas produções de C10:0 e C12:0, e o rendimento de C14:0 foi significativamente ($P < 0,02$) maior na gordura do leite de vacas com a infusão de nata. Resultados semelhantes ao de Sun et al. (2013), onde as concentrações de C12:0 e C14:0 tendeu a aumentar ($P < 0,10$) de forma linear com as quantidades crescentes de AGCM. Estes AG são metabolizados em menor grau no fígado, estando em maior disponibilidade para a glândula mamária (Grummer & Socha, 1989). A possível explicação perante os resultados apresentados, onde não houve alteração nos AGCC e M individuais é dada pela absorção total e metabolização em tecidos (KADEGOWDA et al., 2008), ou pelo fato dos níveis testados estarem abaixo dos estudos anteriores.

Não ocorreu nenhuma resposta de acréscimo de C12:0 e C14:0 com o uso de AGCM no presente estudo. No entanto há transferência direta de AG da dieta para a gordura do leite em 109% e 19,5% de aumento de C12:0 e C14:0 respectivamente (HRISTOV et al., 2009; REVENEAU et al., 2012b).

Ao contrário de Hristov et al. (2009), a adição de AGCM no presente estudo aumentou a produção de C17:0 ($P < 0,05$) de forma linear em comparação ao grupo controle, dados esses de acordo com Kadegowda et al. (2008). No entanto, o tratamento AGCM20 foi o único a obter tal resultado se comparado aos demais tratamentos. Altos níveis de óxido de magnésio (MgO) na dieta foram associados positivamente com a produção de C17:0 (MOATE et al., 2008), o que não explicaria o fato devido a todos os animais receberem a mesma quantidade de MgO. Porém, em meta análise realizada por Moate et al. (2008) verificaram que as dietas TMR são associadas com baixos níveis de produção de ácidos graxos C17:0 do que os que se baseiam no pasto. Essa previsão é consistente com um estudo que mostrou um aumento linear positivo em concentrações de ácidos graxos C17:0 na gordura do leite quando a proporção de pastagem na dieta aumentou de zero para 100% (COUVREUR et al., 2006). Devido a isso, como a composição da dieta dos animais continha pastejo em pastagem natural, esse fato pode ter contribuído para o aumento de C17:0 na gordura do leite no grupo AGCM20.

Não foi encontrado efeito dos tratamentos ($P > 0,05$) maioria dos AGCL analisados na gordura do leite. Porém houve uma tendência de aumento ($P < 0,10$) no C18:1*trans*-11 (ác. vacênico), C20:0, C20:3 e C24:0. Ocorreu aumento linear

significativo ($P < 0,05$) em C18:3 n -6 (ác. gama-linolênico) no grupo AGCM80 em comparação com os demais, como podemos observar na Tabela 4. No entanto, Hristov et al. (2009) não encontrou efeito em C18:3 n -6 com a adição de ácido láurico ou óleo de coco na dieta de vacas em lactação. Sun et al. (2013) utilizando níveis de AGCM verificou poucos efeitos no perfil de AG da gordura do leite, confirmando os achados do presente estudo.

Hristov et al. (2009) verificou reduções ($P < 0,001$) em C20:0 e C24:0 com o uso tanto de ácido láurico como óleo de coco, sendo que nos outros AG analisados pelo autor não houve alterações com o uso destes aditivos. Há poucos estudos ou comentários em relação ao ácido araquídico (C20:0). Acredita-se que o C20:0 é formado pela ação de enzimas alongase em C16:0 e C18:0 (Leonard et al., 2004), mas Moate et al. (2008) não observaram relações significativas entre as quantidades de C16:0 ou C18:0 absorvido a partir do intestino e a produção de C20:0 no leite. Este autor indica que a produção de C20:0 na gordura do leite está positivamente relacionada a IMS e, surpreendentemente, com a quantidade de C18:3 absorvida a partir do intestino. E também indica que a produção de C20:0 foi negativamente relacionada com os DEL e o peso corporal. No entanto, nenhuma destas relações foram observadas no atual estudo.

Houve uma tendência de aumento ($P < 0,10$) no isômero CLA *trans*-10, *cis*-12 nos tratamentos AGCM20 e 80 se comparados ao demais, como pode ser visualizado na Tabela 4, sem efeitos na porcentagem de gordura do leite. Resultados semelhantes à Hristov et al. (2009) que não encontrou alterações na gordura do leite e aumento significativo ($P < 0,05$) em CLA *trans*-10, *cis*-12 com o uso de óleo de coco e ácido láurico. Também ocorreu uma tendência linear de aumento ($P \leq 0,10$) de C18:1 *trans*-11 (ác. vacênico) nos tratamentos AGCM20 e 40 em comparação com o controle. Em contraste ao presente estudo, a adição de óleo de coco não influenciou as produções de CLA e ácido vacênico, mas os autores obtiveram um aumento significativo ($P < 0,01$) na gordura do leite e no total de C18:1 *trans* (REVENEAU et al., 2012a; b). O aumento da concentração de lipídeos bioativos pode realimentar a taxa-limite de BH (MAIA et al., 2010), podendo explicar a acumulação de C18:1 *trans* no rúmen (WU & PALMQUIST, 1991; ENJALBERT et al., 2003).

Com relação à produção total de ácidos graxos de cadeia curta e média, ácidos graxos de cadeia longa, ácidos graxos saturados, ácidos graxos insaturados,

ácidos graxos sintetizados *de novo*, ácidos graxos poli-insaturados e total de CLA, o uso de diferentes doses de AGCM na dieta não alterou a proporção em relação ao grupo controle ($P>0,10$). No entanto, houve uma tendência de aumento ($P<0,10$) dos ácidos graxos monoinsaturados no tratamento AGCM20 em relação ao controle, conforme a Tabela 5. Em estudo de Sun et al. (2013), à medida que aumentou a proporção de AGCM em detrimento de AGCL na dieta houve uma tendência de aumento linear ($P<0,10$) na produção total de AGCCeM derivados da síntese *de novo*. Vyas et al. (2012) não encontrou efeitos na produção dos AGCCeM, mas houve um aumento de 6% em AGS ($P<0,001$) e uma redução de 12% na produção de AGMI ($P<0,001$). Já Kadegowda et al. (2008) com o uso de nata infundida diretamente no abomaso, aumentou significativamente ($P<0,05$) a produção de AGCCeM, AGCL, AGMI e AGPI sem alterações na produção de AGS. O fator primordial do aumento de 25% em AGMI é devido ao incremento de C14:1, C16:1, C17:1 e C18:1. Como foi mostrado na tabela 4 e 5, houve uma tendência de aumento na produção total de AGMI ($P<0,10$), e na produção de C18:1 *trans*-11 ($P\leq 0,10$) no tratamento AGCM20 em comparação com os demais, podendo atribuir esse aumento de AGMI ao C18:1 *trans*-11.

Tabela 5. Classes de ácidos graxos da gordura do leite (mg/g) de vacas suplementadas com diferentes níveis de ácidos graxos de cadeia média (AGCM).

Variáveis	Tratamentos ¹ (mg/g)				R ²	CV%	P>F
	CTL	AGCM20	AGCM40	AGCM80			
AGCCeM ²	403,68	433,09	404,62	409,63	-	10,82	0,60
AGCL ³	393,15	421,48	393,15	398,67	-	10,89	0,60
AGDN ⁴	300,39	340,69	315,15	310,67	-	9,44	0,15
AGS ⁵	454,99	468,46	439,26	446,17	-	7,88	0,42
AGI ⁶	234,40	259,69	243,00	243,64	-	8,20	0,29
AGMI ⁷	193,88	221,24	200,35	200,54	-	9,32	0,07
AGPI ⁸	40,52	44,29	42,65	43,10	-	9,20	0,24
CLA ⁹	4,48	5,41	4,75	4,67	-	16,97	0,23

¹ Tratamentos: CTL = Controle; AGCM20 = 5 gramas AGCM; AGCM40 = 10 gramas AGCM; AGCM80 = 20 gramas AGCM.

² Ácidos graxos de cadeia curta e média (C4:0-C16:1); ³ Ácidos graxos de cadeia longa (>C17:0); ⁴ Ácidos graxos sintetizados *de novo* (C4:0-C16:0); ⁵ Ácidos graxos saturados; ⁶ Ácidos graxos insaturados; ⁷ Ácidos graxos monoinsaturados; ⁸ Ácidos graxos poli-insaturados; ⁹ Ácido linoleico conjugado (isômeros C18:2).

Como não houve acréscimo de AGCCeM, que são sintetizados em grande parte *de novo* na glândula mamária, a produção total de AGDN não diferiu entre os tratamentos. O perfil de ácidos graxos do leite durante a DGL é caracterizada por redução da secreção e absorção de AG originários da síntese *de novo* (BAUMAN & GRIINARI, 2003). Com isso, essa relação se confirma no presente estudo, onde não foi verificada alterações na porcentagem de gordura do leite bem como nos AGDN. Resultados esses semelhantes a Vyas et al. (2013) onde não encontrou diferença na produção total de AGCCeM e AGDN.

A suplementação de AGCM estudados consiste em lipídeos saturados, que são suspeitos de aumentar doenças coronárias no ser humano através do aumento total do colesterol LDL (WILLIAMS, 2000). Com isso, estudos clínicos e epidemiológicos tem fornecido provas que a administração de C12:0 e C14:0 aumentam os riscos de doenças cardiovasculares (SHINGFIELD et al., 2008). Os efeitos negativos de C8:0 e C10:0 não foram relatados (GERMAN & DILLARD, 2004). Gordura saturada do leite, em comparação com óleos poli-insaturados, têm sido mostrado (COX et al., 1995; HODSON et al., 2001; SJOGREN et al., 2004) que aumenta a concentração de HDL plasmático, a qual está inversamente relacionado com o risco de doenças cardíacas em seres humanos. Estas evidências emergentes de que o colesterol LDL não é influenciado pela ingestão de AG saturados (SJOGREN et al., 2004), levou a uma reavaliação das recomendações nutricionais em relação ao consumo de gordura de leite (GERMAN et al., 2009). O conceito de consumo de gordura saturada atribuído a problemas de saúde pública precisa ser aperfeiçoado em termos de ingestão de AGCM específicos.

6.4 CONCLUSÃO

Nas concentrações utilizadas a suplementação de ácidos graxos de cadeia média nas diferentes concentrações não afeta a produção e qualidade do leite em vacas em lactação. Em consequência de ser o primeiro estudo realizado em animais com a associação dos ácidos graxos capróico, caprílico, cáprico, láurico e mirístico, mais estudos são necessários para esclarecer os efeitos desse grupo de AGCM na produção e qualidade do leite em animais de alta produção.

6.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUMAN, D. E. Regulation of nutrient partitioning during lactation: homeostasis and homeostasis revisited. In **Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Growth, and Reproduction**, ed. PJ Cronje, p. 311–27, 2000.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annu. Rev. of Nutri.**, 23:203-27, 2003.

BAUMGARD, L. H., MATITASHVILI, E.; CORL, B. A.; DWYER, D. A.; BAUMAN, D. E. *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 85:2155–2163, 2002.

BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; DWYER, D. A.; SÆBØ, A.; BAUMAN, D. E. Identification of the conjugated linoleic acid iso-mer that inhibits milk fat synthesis. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, 278:R179–R184, 2000.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Bioch. Phys.**, v.37, n.8, p. 911-917, 1959.

BURNS, J. C.; POND, K. R.; FISHER, D. S. Measurement of Forage Intake. In: **FAHEY jr., G.c. (Ed.) Forage quality, evaluation, and utilization**. Wisconsin: American Society of Agronomy. Section III, p.494-532, 1994.

CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol steers. **Journal of Animal Sci.**, 23: 1072-1077, 1982.

COUVREUR, S.; HURTAUD, C.; LOPEZ, C.; DELABY, L.; PEYRAUD, J. L. The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. **J. Dairy Sci.**, 89:1956–1969, 2006.

COX, C.; MANN, J.; SUTHERLAND, W.; CHISHOLM, A.; SKEAFF, M. Effects of coconut oil, butter, and safflower oil on lipid and lipoproteins in persons with moderately elevated cholesterol levels. **J. Lipid Res.**, 36:1787–1795, 1995.

DAWSON, P.L.; CARL, G.D.; ACTON, J.C.; HAN, I.Y. Effect of lauric acid and nisin-impregnated soy-based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on turkey bologna. **Poult Sci.**, 81:721–6, 2002.

DOHME, F.; MACHMÜLLER, A.; WASSERFALLEN, A.; KREUZER M. Ruminant methanogenesis as influenced by individual fatty acids supplemented to complete ruminant diets. **Let. Appl. Microbiol.**, 32:47–51, 2001.

EDMONSON, A. J.; LEAN, I. J.; WEAVER, L. D. et al. A body condition scoring chat for Holstein dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 72(1):68-78, 1989.

- ENJALBERT, F.; EYNARD, P.; NICOT, M. C.; TROEGELER-MEYNADIER, A.; BAYOURTHE, C. *In vitro* versus *in situ* ruminal biohydrogenation of unsaturated fatty acids from a raw or extruded mixture of ground canola seed/canola meal. **J. Dairy Sci.**, 86:351–359, 2003.
- FUKUMORI, R.; SUGINO, T.; SHINGU, H.; MORIYA, N.; KOBAYASHI, H.; HASEGAWA, Y.; et al. Ingestion of medium chain fatty acids by lactating dairy cows increases concentrations of plasma ghrelin. **Domest. Anim. Endoc.**, 45:216–223, 2013.
- GERMAN, J. B. et al. A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. **Eur. J. Nutr.** 48:191–203. 2009.
- GERMAN, J. B.; DILLARD, C. J. Saturated fats: what dietary intake? **Am. J. Clin. Nutr.**, 80:550–9, 2004.
- GRUMMER, R. R. & SOCHA, M. T. Milk fatty acid composition and plasma energy metabolite concentrations in lactating cows fed medium-chain triglycerides. **J. Dairy Sci.**, 72:1996–2001, 1989.
- GRUMMER, R. R. Effect of feed on the composition of milk fat. **J. Dairy Sci.**, 74:3244–3257, 1991.
- HARVATINE, K. J. & ALLEN, M. S. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 89:1081–1091, 2006.
- HODSON, L.; SKEAFF, C. M.; CHISHOLM, W. A. The effect of replacing dietary saturated fat with polyunsaturated or monounsaturated fat on plasma lipids in free-living young adults. **Eur. J. Clin. Nutr.**, 55:908–915, 2001.
- HORNUNG, B.; AMTMANN, E.; SAUER, G. Lauric acid inhibits the maturation of vesicular stomatitis virus. **J Gen Virol.**, 75:353–61, 1994.
- HRISTOV, A. N. et al. Effect of lauric acid and coconut oil on ruminal fermentation, digestion, ammonia losses from manure, and milk fatty acid composition in lactating cows. **J. Dairy Sci.**, 92:5561–5582, 2009.
- HRISTOV, A. N. et al. Effects of lauric and myristic acids on ruminal fermentation, production, and milk fatty acid composition in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 94:382–395, 2011.
- JENKINS, T. C.; MCGUIRE, M. A. Major advances in nutrition: Impact on milk composition. **J. Dairy Sci.**, 89:1302–1310, 2006.
- JENSEN, R. G. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. **J. Dairy Sci.**, 85:295–350, 2002.
- KADEGOWDA, A. K. G.; PIPEROVA, L. S.; DELMONTE, P.; ERDMAN, R. A. Abomasal infusion of butterfat increases milk fat in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 91:2370–2379, 2008.

- MAIA, M. R. G.; CHAUDHARY, L. C.; BESTWICK, C. S.; RICHARDSON, A. J.; MCKAIN, N.; LARSON, T. R.; GRAHAM, I. A.; WALLACE, R. J. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. **BMC Microbiol.**, 10:52, 2010.
- McGUIRE, M. A.; BAUMAN, D. E. Milk biosynthesis and secretion. **J. Dairy Sci.**, v.3, 1826-1834. 2002.
- MOATE, P. J.; BOSTON, R. C.; LEAN, I. J.; CHALUPA, W. Short Communication: Further validation of the fat sub-model in the Cornell-Penn-Miner Dairy model. **J. Dairy Sci.**, 89:1052–1056, 2006.
- MOATE, P. J.; CHALUPA, W.; BOSTON, R. C.; LEAN, I. J. Milk fatty acids II: Prediction of the production of individual fatty acids in bovine milk. **J. Dairy Sci.**, 91:1175–1188, 2008.
- NRC. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th ed. Natl. **Acad. Sci.**, Washington, DC, 2001.
- ODONGO, N. E.; OR-RASHID, M. M.; KEBREAB, E.; FRANCE, J.; McBRIDE, B W. Effect of supplementing myristic acid in dairy cow rations on ruminal methanogenesis and fatty acid profile in milk. **J. Dairy Sci.**, 90:1851–1858, 2007.
- PALMQUIST, D. L.; BEAULIEU, A. D.; BARBANO, D. M. Feed and animal factors influencing milk fat composition. **J. Dairy Sci.**, v. 76, 1753-1771, 1993.
- PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídeos. In: **BERCHIELLI, T.T. et al. Nutrição de ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP. Cap.10, p.287-310, 2006.
- PARODI, P. W. Conjugated linoleic acid. **J. Dairy Sci.**, p1587–1594, 2002.
- PIPEROVA, L. S.; TETER, B. B.; BRUCKENTAL, I.; SAMPUGNA, J.; MILLS, S. E.; et al. Mammary lipogenic enzyme activity, *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. **J. Nutr.**, 130:2658–74, 2000.
- REVENEAU, C.; KARNATI, S. K. R.; OELKER, E. R.; FIRKINS, J. L. Interaction of unsaturated fat or coconut oil with monensin in lactating dairy cows fed 12 times daily. I. Protozoal abundance, nutrient digestibility, and microbial protein flow to the omasum. **J. Dairy Sci.**, 95 :2046–2060, 2012a.
- REVENEAU, C.; RIBEIRO, C. V. D. M.; EASTRIDGE, M. L.; FIRKINS, J. L. Interaction of unsaturated fat or coconut oil with monensin in lactating dairy cows fed 12 times daily. II. Fatty acid flow to the omasum and milk fatty acid profile. **J. Dairy Sci.**, 95 :2061–2069, 2012b.
- SHINGFIELD, K. J., CHILLIARD, Y.; TOIVONEN, V.; KAIRENIUS, P.; GIVENS, D. I. *Trans* fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. Pages 3–65 in **Bioactive Components of Milk, Advances in Experimental Medicine and Biology**, Vol. 606, Z. Bösze, ed. Springer, New York, NY, 2008.

SHINGFIELD, K. J.; BERNARD, L.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y. Role of *trans* fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. **Animal**, 4:1140–1166, 2010.

SHOOK, G. E. Genetic improvement of mastitis through selection on somatic cell count. The Veterinary Clinics of North America: **Food Anim. Pract.**, v. 9, n. 3, p. 563-581, 1993.

SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. 3. ed. Viçosa: UFV, 235 p, 2002.

SJOGREN, P. et al. Milk-derived fatty acids are associated with a more favorable LDL particle size distribution in healthy men. **J. Nutr.**, 34:1729–1735, 2004.

SUN, Y. et al. Supplementing different ratios of short- and medium-chain fatty acids to long-chain fatty acids in dairy cows: Changes of milk fat production and milk fatty acids composition. **J. Dairy Sci.**, 96:2366–2373, 2013.

SUTTON, J. D. Altering milk composition by feeding. **J. Dairy Sci.**, 72:2801–14, 1989.

VAN ZIJDERVELD, S. M. et al. Dietary inclusion of diallyl disulfide, yucca powder, calcium fumarate, an extruded linseed product, or medium-chain fatty acids does not affect methane production in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 94 :3094–3104, 2011.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B. **Ácidos Graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação**. Ed. Varela, São Paulo, 2006.

VYAS, D.; MOALLEM, U.; TETER, B. B.; FARDIN-KIA, A. R. K.; ERDMAN, R. A. Milk fat responses to butterfat infusion during conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 96:2387–2399, 2013.

VYAS, D.; TETER, B. B.; ERDMAN, R. A. Milk fat responses to dietary short and medium chain fatty acids in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, 95:5194–5202, 2012.

WILLIAMS, C. M. Dietary fatty acids and human health. **Ann. Zootech.**, 49:165–180, 2000.

WU, Z., & PALMQUIST, D. L. Synthesis and biohydrogenation of fatty acids by ruminal microorganisms *in vitro*. **J. Dairy Sci.**, 74:3035–3046, 1991.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação de ácidos graxos de cadeia média reduziu a produção de metano, além de alterar a produção de AGCC no rúmen. Os tratamentos com 10 e 20g de AGCM na produção *in vitro* obtiveram os melhores resultados em relação ao grupo AGCM20 e ao controle na redução da produção total de gás e metano. No que diz respeito ao perfil de AGCC houve alterações com o uso dos tratamentos onde se comportaram de forma distinta nos períodos de incubação.

As concentrações utilizadas de AGCM não afetaram a ingestão de matéria seca, produção de leite, como os componentes lácteos. O perfil de ácidos graxos individuais tiveram pequena variação, com aumento significativo de C17:0 e C18:3n6.

Devido ser o primeiro estudo ser realizado com o uso combinado de ácido capróico, caprílico, cáprico, láurico e mirístico, mais estudos para elucidar as formas de atuação são necessários para averiguar o potencial dessa classe lipídica na produção e qualidade do leite, eficiência da conversão alimentar e o custo benefício de uma dieta em vacas em lactação de alta produção.

7 ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Avaliação *in vitro* e *in vivo* de ácidos graxos de cadeia média na produção e qualidade do leite, e emissão de metano em vacas em lactação."

Número do Parecer: 027/2014

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Julio Viégas

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DE APROVAÇÃO: 24/06/2014

Santa Maria, 24 de junho de 2014.

A handwritten signature in black ink, reading "Vania Lucia Loro", is written over a horizontal line.

Prof.ª Dr.ª Vania Lucia Loro
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais - UFSM