

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEOS DE AMENDOIM E
GIRASSOL PARA VACAS LEITEIRAS A PASTO NO INÍCIO
DA LACTAÇÃO

Autor: Marcelo de Oliveira Alves Rufino
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Coorientadora: Dra. Márcia Saladini Vieira Salles

MARINGÁ
Estado do Paraná
Julho – 2016

SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEOS DE AMENDOIM E GIRASSOL PARA VACAS LEITEIRAS A PASTO NO INÍCIO DA LACTAÇÃO

Autor: Marcelo de Oliveira Alves Rufino
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos
Coorientadora: Dra. Márcia Saladini Vieira Salles

“Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração Produção Animal”.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Julho – 2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

R926s Rufino, Marcelo de Oliveira Alves, 1982-
Suplementação com óleos de amendoim e girassol
para vacas leiteiras a pasto no início da lactação /
Marcelo de Oliveira Alves Rufino. -- Maringá, 2016.
xi, 72 f. : figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos.
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Márcia Saladini Vieira
Salles.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, 2016.

1. Ácido linoleico. 2. Ácido oleico. 3. Balanço
de energia. 4. Genes antioxidantes. 5. Genes
lipogênicos. 6. Leite - Gordura. 7. Leite -
Produção. 8. Vaca leiteira - Suplementação com óleos
de amendoim e girassol. I. Santos, Geraldo Tadeu
dos, orient. II. Salles, Márcia Saladini Vieira,
coorient. III. Universidade Estadual de Maringá.
Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-
Graduação em Zootecnia. IV. Título.

CDD 23.ed. 636.2

GVS-003683



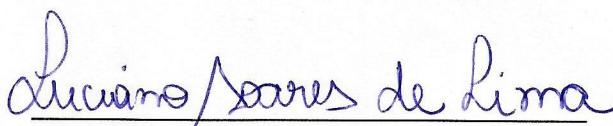
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

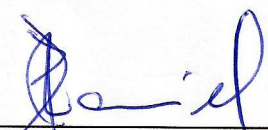
**SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEOS DE AMENDOIM E
GIRASSOL PARA VACAS LEITEIRAS A PASTO NO
INÍCIO DA LACTAÇÃO**

Autor: Marcelo de Oliveira Alves Rufino
Orientador: Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos

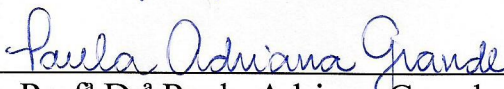
TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

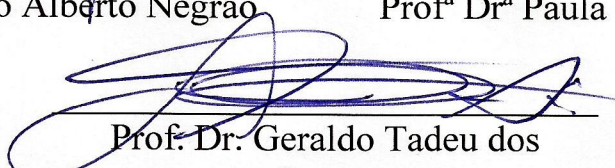
APROVADO em 29 de julho de 2016.


Prof. Dr. Luciano Soares de Lima


Prof. Dr. João Luiz Pratti Daniel


Prof. Dr. João Alberto Negrão


Prof^ª Dr^ª Paula Adriana Grande


Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos
Santos
(Orientador)

*“Mas aqueles que esperam no Senhor
renovam as suas forças,
voam alto como águias,
correm e não ficam exaustos,
andam e não se cansam.”*

(Isaiás 40:31)

A **Deus**, que tudo pode e que brinda a minha vida todos os dias com Tua presença constante, Teu amor e força incondicionais, guiando e iluminando sempre os meus passos no caminho da fé e da verdade,

OFEREÇO!

Aos meu amados pais **João Henrique Alves Rufino e Curdulina de Oliveira Rufino**, pelo exemplo de vida, amor incondicional, dedicação e por nunca medir esforços para a realização deste e de outros sonhos, a quem devo tudo o que hoje sou.

Aos meus irmãos **André Rufino e Renata Rufino** pelo carinho e admiração.

A minha esposa **Aline Mendes Ribeiro Rufino** pelo companheirismo, amor, carinho, cuidado, paciência, dedicação e incentivo.

A toda minha família (**avós, tios, primos e sobrinhas**) e **amigos** pelo estímulo, dedicação, convivência e amor a mim dispensados,

DEDICO!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por cuidar de mim, mantendo-me firme na fé.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade e ensinamentos proporcionados.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, pela oportunidade, pela orientação dada, pela disponibilidade e consideração ao longo desta caminhada.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, pelos ensinamentos repassados.

Aos servidores Programa de Pós Graduação em Zootecnia, do Departamento de Zootecnia e do Laboratório de Nutrição Animal da UEM, pelas contribuições sempre que necessárias.

À Agência de Tecnologia dos Agronegócios na pessoa de Dra. Márcia Salles e Dr. Luiz Júnior, por disponibilizar a estrutura física e animais da fazenda para condução do experimento de campo. Aos técnicos João Paulo e Esteca e funcionários da fazenda Rodrigo e Baltazar, pela ajuda sempre que solicitados.

Ao Prof. João Alberto Negrão e sua técnica Giovana do laboratório de Fisiologia Animal/FZEA/USP, pelos conhecimentos repassados e pela colaboração nas análises químicas, de fundamental importância para esta tese.

Ao grupo NUPEL, pela colaboração nas análises com participação fundamental para a realização deste trabalho.

Aos poucos e valiosos amigos conquistados nessa breve passagem por Maringá e a quem serei eternamente grato: Luciano Soares de Lima, Francilaine Eloise de Marchi, Milene Osmari, Silvana Teixeira Carvalho, Paulo Levi de Oliveira Carvalho, Fernanda Granzotto, Murilo Carmo, Diogo Silva, Fernando Jacovaci e Dheyne Cristina.

À minha querida orientadora da graduação, Profa. Dra. Maria Elizabete de Oliveira, e do mestrado, Prof. Dr. Arnaud Azevedo Alves, pelas oportunidades, ensinamentos, incentivo e amizade;

Aos colegas da Universidade Federal do Piauí, Marcônio Rodrigues e Miguel Moreira Filho, pelos momentos de descontração, pelas palavras de incentivo e por acreditarem em mim.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que eu chegasse até aqui...

OBRIGADO!

BIOGRAFIA

Marcelo de Oliveira Alves Rufino, filho de João Henrique Alves Rufino e Curdulina de Oliveira Rufino, nasceu em Teresina, capital do estado do Piauí, no dia 29 de dezembro de 1982.

Em março de 2001, ingressou na Universidade Federal do Piauí (UFPI), no curso de Medicina Veterinária, concluindo o mesmo em 2008.

Em 2009, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFPI, em nível de Mestrado, na área de concentração Exigências Nutricionais de Animais de Interesse Econômico, sob orientação do Prof. Dr. Arnaud Azevedo Alves. Aos 29 de março de 2011, submeteu-se à banca examinadora para a Defesa da Dissertação de Mestrado intitulada: “*Produção e Qualidade do Leite de Cabras em Pasto de Capim-tanzânia com Suplementação*”.

Em março de 2013, iniciou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de doutorado, na área de concentração Produção e Nutrição de Ruminantes, na Universidade Estadual de Maringá, sob orientação do Prof. Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, concluindo o doutorado com defesa de Tese em 29 de julho de 2016.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
I - INTRODUÇÃO GERAL	1
Literatura citada	15
II - OBJETIVO GERAL	21
III - Desempenho e balanço de energia em vacas Jersey a pasto no início da lactação suplementadas com óleos de amendoim e girassol	22
Resumo	22
Introdução	23
Materiais e Método	24
Resultados	30
Discussão	31
Conclusões	36
Referências	36
IV - Expressão gênica de enzimas lipogênicas e antioxidantes em vacas Jersey a pasto no início da lactação suplementadas com óleos de amendoim e girassol	47
Resumo	47
Introdução	48
Materiais e Método	49
Resultados	54
Discussão	56
Conclusões	61
Referências	61
V - CONSIDERAÇÕES FINAIS	72

RESUMO

Objetivou-se com esta pesquisa avaliar o efeito da suplementação com óleos de amendoim e girassol sobre a produção e composição química do leite, balanço de energia e variação do peso e escore corporal, composição de ácidos graxos e a estabilidade oxidativa do leite, metabolitos sanguíneos e expressão gênica de enzimas lipogênicas e antioxidantes em vacas mestiças Jersey mantidas em pasto de capim-tanzânia no início da lactação. O óleo de amendoim foi escolhido por ser uma fonte rica em ácido graxo *n*-9 e o óleo de girassol como fonte rica em *n*-6. Foram utilizadas 24 vacas distribuídas em delineamento em blocos ao acaso com quatro tratamentos e seis repetições. Foram utilizados os tratamentos (1) concentrado controle sem adição de óleo, (CONT); (2) concentrado mais de 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim, (AME); (3) concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol, (GIR); e (4) concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol, (MIX). As amostragens de leite, alimentos e fezes foram realizadas aos 30 e 60 dias em leite (DEL) e as avaliações do peso e escore corporal nos dias 0, 30 e 60 DEL. O controle leiteiro foi realizado duas vezes ao dia até os 237 DEL. A suplementação com óleo não teve efeito sobre a ingestão de matéria seca total e de forragem. A suplementação lipídica aumentou a ingestão e digestibilidade do EE. A digestibilidade do FDN reduziu com a suplementação com óleo. O tratamento GIR reduziu a produção diária de leite, a produção de leite corrigida para 4% de gordura e a gordura do leite com resultados semelhantes entre tratamentos CONT, AME e MIX. O tratamento GIR reduziu a produção de leite no período residual e na lactação total. A suplementação com óleo aumentou a ingestão de EL_L . O tratamento GIR reduziu a EL do leite, a eficiência de utilização da EL_L da dieta, VPC e VECC. O GIR melhorou o BE até os 60 DEL. O tratamento GIR aumentou a proporção de AGPI enquanto o tratamento AME aumentou a proporção de AGMI, AGPI *n*-3 na gordura do leite. Maior produção de

dienos conjugados no leite foi observada para o GIR. O GIR reduziu a abundância de RNAm das enzimas ácido graxo sintetase e estearoil CoA dessaturase. Para o tratamento MIX observou-se maior atividade de enzimas lipogênicas, exceto para PPAR α . Menor abundância relativa de RNAm para SOD1 foi observada nos tratamentos GIR e MIX. A suplementação com óleo apresentou tendência a reduzir a abundância relativa de RNAm de GPX1. A suplementação com óleo de girassol aumenta a proporção de AGPI da gordura do leite e reduz a estabilidade oxidativa do leite e a expressão gênica de enzimas lipogênicas e antioxidantes. A suplementação com óleos não resultou em melhor desempenho na lactação de vacas mantidas em pastagem tropical. A suplementação com óleo de girassol reduz a produção e o teor de gordura do leite e melhora o balanço de energia no início da lactação quando comparada ao óleo de amendoim. A suplementação com óleo de girassol, rico em *n*-6 AGPI, aumenta a proporção de AGPI da gordura do leite e reduz a estabilidade oxidativa do leite e a expressão gênica de enzimas lipogênicas e antioxidantes. A suplementação com óleo de amendoim, rico em *n*-3AGMI, aumenta o índice promotor da saúde por aumentar a proporção de AGMI e AGPI *n*-3 ao leite sem, no entanto, ter efeitos negativos sobre a expressão gênica de enzimas lipogênicas e antioxidantes e a estabilidade oxidativa da gordura do leite.

Termos para indexação: ácido linoleico, ácido oleico, balanço de energia, genes antioxidantes, genes lipogênicos, gordura, produção de leite

ABSTRACT

This study was performed to evaluate the effect of supplementation with peanut and sunflower oils on milk yield and composition, energy balance and variation in body weight and body condition score, fatty acids profile and oxidative stability of milk, blood metabolites and mRNA abundance of antioxidant and lipogenic-related genes in crossbred Jersey cows fed tropical pasture in the early lactation. Peanut oil was chosen to be a rich source of *n*-9 fatty acid and sunflower oil as a rich source of *n*-6. Twenty four cows were used in a completely randomized block design. Animals were assigned to four dietary treatments, (1) concentrated with no oil (CONT), (2) concentrated with 5.6 g/kg DM peanut oil (AME), (3) concentrated with 59.6 g/kg DM sunflower oil (GIR) and (4) concentrated with 59.6 g/kg DM of a 1: 1 mixture (MIX) of peanut oil and sunflower oil simulating an oil with the *n*-6:*n*-9 ratio balanced. Milk feed and faces samples were performed at 30 and 60 days in milk (DIM) and the variation in weight and body condition score were performed at 0, 30 and 60 DIM. Milk yield was recorded until 237 DIM. Dry matter, forage and nutrients intakes and nutrients digestibility were similar in all treatments. Cows fed oil increases the intake and digestibility of EE. The oil supplementation decreased the FDN digestibility. The GIR treatment decreased the daily and total milk yield and milk fat percentages. The oil supplementation increase the NE_L intake. The GIR treatment decreased NE excreted in milk, the efficiency of use of diet NE_L for milk production, the variation in weight and body condition score and improved the EB until 60 DIM. The GIR treatment increase the proportion of PUFAs while AME treatment increases the proportion of MUFA, *n*-3 PUFA in milk fatty. Higher production of conjugated diene was observed for the GIR treatment. The GIR treatment decreased the gene expression of the enzyme fatty acid synthetase and stearoyl CoA desaturase. For MIX treatment there was increased activity of lipogenic enzymes, except for PPAR α .

Lower relative abundance of mRNA for SOD1 was observed in GIR and MIX treatments. The oil supplementation has a tendency to reduce the relative abundance of mRNA GPX1. Supplementation with oils did not result in better performance in lactating cows kept in tropical pasture. Sunflower oil reduces production and milk fat content and improve the energy balance in early lactation compared to the peanut oil. Supplementation with sunflower oil, rich on *n*-6 PUFA, increases the proportion of milk fat and reduces the oxidative stability of milk and the gene expression of lipogenic enzymes and antioxidants. Supplementation with peanut oil, rich on *n*-9 MUFA, increases the health promoter index by increasing the proportion of MUFAs and *n*-3 PUFA in milk without, however, have negative effects on the gene expression of lipogenic enzymes and antioxidants and oxidative stability of fat milk.

Index terms: antioxidants genes, energy balance, fat, linoleic acid, lipogenic genes, milk yield, oleic acid

I - INTRODUÇÃO GERAL

O rebanho bovino brasileiro tem na pastagem a base da sua dieta em virtude do alto potencial produtivo e da adaptação das variadas espécies forrageiras, aos diversos ecossistemas encontrados no território nacional. Devido à redução dos custos com alimentação do rebanho, a produção de leite em pastagens tem sido apontada como uma das principais ferramentas para reduzir os custos de produção e aumentar a rentabilidade dos sistemas leiteiros (Vilela et al. 2006). De acordo com Silva et al. (2008) sistemas de produção de leite em pastagens mais dependentes da forragem, ou seja, com menor inclusão de concentrado, apresentam os melhores resultados econômicos. Nos sistemas de produção de leite a pasto, os custos de produção são sensivelmente reduzidos quando se consegue manter os rebanhos produtivos à base de pastagem, utilizando recursos forrageiros de boa qualidade.

Pastos bem manejados são capazes de sustentar níveis modestos de produção de leite. Sob diferentes manejos adotados, foram registrados níveis de produção de leite entre 11 e 14 kg/vaca/dia em pastagens de clima tropical sem fornecimento de concentrado (Deresz 2001; Deresz et al. 2006; Silva et al. 2009). De acordo com Deresz (2001), esses níveis de produção de leite em pastagens tropicais estão próximos do limite máximo de produção obtidos com vacas mestiças de bom potencial genético. No entanto, estes valores estão aquém dos registrados para vacas mantidas em pastagens temperadas e confinadas (Kolver e Muller 1998; Bargo et al. 2002).

Entre os principais fatores que contribuem para os baixos níveis de produção de leite em pastagens tropicais estão a qualidade nutricional da forragem. De modo geral, as gramíneas tropicais apresentam baixa densidade energética e lenta taxa de degradação e passagem pelo rúmen, o que limita a ingestão de forragem, resultando em baixa ingestão de matéria seca total (Carvalho et al. 2006; Branco et al. 2011). Mesmo em pastagens

temperadas, com forragem de qualidade superior às tropicais (Archimède et al. 2011), o baixo nível de consumo de matéria seca praticado pelas vacas tem sido apontado como a principal limitação para a produção de leite em sistemas a pasto (Bargo et al. 2003).

Como consequência do baixo nível de consumo, vacas especializadas na produção de leite não conseguem obter no pasto todos os nutrientes necessários para alcançar níveis mais elevados de produção. Mesmo em pastos bem manejado e corretamente adubados a energia será o nutriente limitante à produção de leite (Vilela et al. 2002). Kolver e Muller (1998) observaram que a energia metabolizável foi mais limitante para a produção de leite de vacas consumindo forragem em pastagem temperada, que o fornecimento de proteína ou aminoácidos metabolizáveis.

No início da lactação esta situação pode ser agravada, pois no início do período de transição, pode ser observado um declínio gradual de 20 a 40% na ingestão de matéria seca, comprometendo a capacidade de vacas leiteiras em se adaptar às mudanças fisiológicas neste período (Hayirli et al. 2002).

Em razão do aumento das exigências para a produção de leite não compensada pelo baixo nível de ingestão de energia, o início da lactação é caracterizado por um balanço energético negativo (BEN) com mobilização de reservas corporais para atender à demanda por energia para produção de leite (Kolver e Muller 1998; Vargas et al. 2002). Distúrbios metabólicos, má condição corporal, baixa produção e redução da eficiência reprodutiva são bem conhecidos por estarem associados a este evento (Busato et al. 2002).

Iniciada a produção de leite após o parto, há aumento na demanda por glicose para a síntese da lactose do leite. No entanto, em ruminantes a maioria dos carboidratos provenientes da dieta são fermentados no rúmen e pouca glicose é absorvida diretamente do trato digestivo. Desta forma, vacas leiteiras dependem muito da gliconeogênese hepática para atender a demanda por glicose (Drackley et al. 2005). Como a produção de propionato, substrato primário para gliconeogênese, está reduzida pela baixa ingestão de matéria seca, os aminoácidos da dieta e os oriundos da mobilização dos tecidos musculares e o glicerol oriundo da mobilização de gordura corporal fornecem o restante da glicose necessária à manutenção dos processos fisiológicos (Reynolds et al. 2003).

Com o aumento da demanda por energia com o início da produção de leite, a lipólise é rapidamente aumentada pela ativação da lipase hormônio-sensível (LHS), mediada por vários hormônios como epinefrina, norepinefrina, corticoides, hormônio da tireoide, glucagon e, indiretamente, pelo aumento na concentração de somatropina. Por ser um hormônio antilipolítico primário, a insulina é sensível ao equilíbrio de energia, sendo alta

durante a deposição lipídica nos tecidos e baixa no balanço energético negativo (Palmquist e Mattos 2006).

A mobilização dos ácidos graxos de cadeia longa de triglicérides do tecido adiposo tem por objetivo suprir o déficit de energia no início da lactação. Ácidos graxos liberados do tecido adiposo circulam como ácidos graxos não esterificados (AGNE) ligados à albumina e constituem a principal fonte de energia para vaca no início da lactação (Drackley et al. 2005). Portanto, as concentrações de AGNE refletem a magnitude da lipólise dos triglicérides armazenados no tecido adiposo e sua concentração no sangue aumenta à medida que aumenta a mobilização de gordura corporal (LeBlanc 2010; Contreras e Sordillo 2011).

No fígado, os AGNE podem ser: completamente oxidados a CO_2 e H_2O para fornecimento de energia para o tecido hepático; parcialmente oxidados para produção de corpos cetônicos (acetona, acetoacetato e β -hidroxibutirato) que são liberados no sangue e servem com fontes de energia para outros tecidos; ou re-esterificados na molécula de glicerol e reconvertidos para triglicérides (Palmquist e Mattos 2006). Como ruminantes possuem baixa capacidade de exportar os triglicérides do fígado por meio de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), vacas com intensa mobilização de reservas possuem um aumento nas concentrações de triglicérides no fígado (Dann et al. 2005). A partir de uma determinada condição fisiológica, o acúmulo de triglicérides no fígado leva o animal a ter um fígado engordurado ou também conhecida como esteatose hepática (NRC 2001).

Devido à produção de corpos cetônicos a partir dos AGNE, altas concentrações destes, estão diretamente correlacionadas com altas concentrações de β -hidroxibutirato (β -OHB) (Dann et al. 2005) e refletem a adaptação do animal ao BEN. As concentrações sanguíneas de AGNE e β -OHB, juntamente com as concentrações de glicose, colesterol e triglicérides, servem como indicador do metabolismo energético do rebanho ou animal (Payne et al. 1970; Duffield et al. 2009).

Uma forma prática de avaliar o manejo nutricional visando minimizar os efeitos do BEN é monitorar o grau de mobilização das reservas corporais através da avaliação do Escore da Condição Corporal (ECC) (Busato et al. 2002). O ECC permite, de forma prática e quantitativa, avaliar o grau de deposição ou mobilização da gordura corporal ou reservas de energia. Seu objetivo é avaliar as reservas de tecido adiposo de vacas leiteiras, utilizando uma escala que varia de 1 (um) a 5 (cinco) pontos, em que o escore 1 representa a vaca excessivamente magra e o escore 5 a vaca demasiadamente obesa (Wildman et al.

1982). Como mencionado anteriormente, vacas durante o BEN mobilizam gordura corporal. Na avaliação do ECC, isto significa que estas vacas perdem pontos de ECC. Desta forma, perdas de unidades no ECC durante o BEN estão diretamente relacionadas às concentrações de AGNE e β -OHB. De fato, perda excessiva ECC após o parto aumenta as concentrações sanguíneas de AGNE e β -OHB (Roche et al. 2013b) e a maioria das doenças metabólicas (Roche et al. 2013a).

Assim, para maximizar o consumo de energia por vacas leiteiras no início de lactação, com a finalidade de alcançar níveis mais elevados de produção de leite e reduzir os efeitos prejudiciais do balanço energético negativo, é fundamental que se recorra à suplementação com concentrados.

Os grãos de cereais (milho, sorgo, trigo) constituem os suplementos energéticos mais utilizados para vacas mantidas em pastagens. No entanto, altas quantidades de grãos constituídos por alta proporção de carboidratos rapidamente fermentáveis podem reduzir o pH ruminal e a degradação da fibra e aumentar a incidência de distúrbios metabólicos. Diante disso, a suplementação com fontes lipídicas tem sido a principal alternativa adotada para elevar a densidade energética da dieta sem que haja a necessidade de elevar a quantidade de carboidratos rapidamente fermentáveis (Nörnberg et al. 2006; Bu et al. 2007). A suplementação lipídica ainda resulta em aumento da eficiência energética devido ao menor incremento calórico e perdas de energia em forma de calor e metano. Com a suplementação lipídica, os ácidos graxos pré-formados de origem dietética são incorporados diretamente na gordura do leite, sem a perda de calor associada à síntese de ácidos graxos, poupando energia para outras funções produtivas da glândula mamária (Onetti e Grummer 2004).

A suplementação lipídica pode ser benéfica especialmente para vacas no início da lactação, visto que estas apresentam limitada capacidade de ingestão de matéria seca em um período de grande demanda por nutrientes (NRC 2001). Em virtude disso, vários estudos (Vilela et al. 2002; Nörnberg et al. 2006; Santos et al. 2009; Petit e Côrtes 2010; Rennó et al. 2014) têm sido conduzidos com a finalidade de avaliar o uso de lipídios na dieta de vacas leiteiras no início da lactação, para atender suas demandas energéticas. No Brasil, as fontes lipídicas mais estudadas são as de origem vegetal, como grãos e óleos de soja, palma, girassol, canola, linhaça; e os sais de cálcio que, por interferirem em menor extensão sobre os microrganismos ruminais, são denominados de gordura protegida ou inerte (Palmquist e Mattos 2006).

Em revisão sobre o efeito da suplementação lipídica sobre o desempenho de vacas leiteiras em pastagens temperadas, Schroeder et al. (2004) observaram aumentos de aproximadamente 1,0 kg/vaca/dia na produção de leite e produção de leite corrigida para 4% de gordura quando se adicionou lipídios à dieta. Em pastagem tropical, Vilela et al. (2002) observaram aumentos de aproximadamente 1,6 kg de leite/vaca/dia, aumento na persistência, na produção no pico e na lactação total ao adicionar 700 g/vaca/dia de sais de cálcio de óleo de palma ao concentrado na fase inicial da lactação. De acordo com Schroeder et al. (2004), aumentos registrados na produção de leite com a suplementação com lipídios podem ser relacionados à melhor eficiência na utilização de energia, além do aumento no consumo de energia.

Outro ponto positivo relacionado à suplementação com lipídios é a melhora do BEN em vacas no início da lactação. De fato, Santos et al. (2009) observaram que vacas suplementadas com óleo de soja apresentaram melhor balanço de energia em comparação àquelas mantidas com a ração sem adição de óleo. Estes autores ainda observaram que vacas do grupo com óleo começaram a melhorar o balanço de energia a partir da terceira semana de lactação, enquanto aquelas do grupo controle, somente tiveram alteração da intensidade do balanço de energia a partir da quarta semana, porém com balanço energético negativo mais severo que o das vacas do grupo suplementado com óleo.

No entanto, resultados de pesquisa sobre desempenho produtivo e balanço de energia de vacas em início da lactação recebendo lipídios suplementar ainda são conflitantes. A variabilidade na resposta está relacionada, entre outros fatores, ao grau de instauração do lipídio. Schroeder et al. (2004) relataram aumento da produção de leite com a adição de fontes saturadas de gordura, porém não observaram diferença significativa com utilização de fontes insaturadas. Harvatine e Allen (2005) não observaram diferenças na produção de leite e produção de leite corrigida para 4% com o aumento da instauração dos lipídios da dieta. De acordo com Harvatine e Allen (2006a) a suplementação com fontes saturadas de lipídios tem pouco benefícios sobre a produção de leite e o balanço de energia, enquanto fontes insaturadas reduzem a ingestão de energia e a energia secretada no leite. Neste mesmo estudo, os autores ainda observaram que o peso corporal e a energia líquida de ganho aumentaram com o aumento linear da instauração da fonte lipídica suplementar, no entanto, a eficiência de utilização da energia para produção de leite teve tendência a reduzir com o fornecimento de fontes mais insaturadas de ácidos graxos.

A composição do leite, quanto aos teores de gordura, também pode ser alterada em razão do grau de instauração da fonte lipídica. Fontes saturadas estão correlacionadas a aumentos dos teores de gordura do leite (Schroeder et al. 2004). Enquanto, fontes insaturadas podem causar a depressão dos teores de gordura do leite (Bauman et al. 2011). No entanto, fontes insaturadas de lipídios são responsáveis por melhorar a composição de ácidos graxos da gordura do leite, tornando-o de melhor qualidade.

Tipicamente, a gordura do leite é composta por 5% de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), 25% de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e 70% de ácidos graxos saturados (AGS) (Grummer 1991). No entanto, é possível incorporar ácidos graxos insaturados à gordura do leite pela inclusão de óleos vegetais e grãos de oleaginosas, ricos em ácidos graxos insaturados, na dieta de vacas leiteiras. De fato, a transferência de AGI para o leite foi observada quando vacas foram alimentadas com grãos de oleaginosas como canola (Neves et al. 2009), soja (Neves et al. 2007), linhaça (Lima et al. 2014) e girassol (dos Santos et al. 2011).

Entre os AGI incorporados ao leite pelo fornecimento de fontes lipídicas insaturadas está o ácido linoleico conjugado (CLA), cujo consumo vem sendo relacionado a benefícios à saúde humana (Rabiee et al. 2012). O termo CLA refere-se a um grupo de isômeros posicionais e geométricos dieno conjugados do ácido linoleico (18:2 *n*-6), encontrado em produtos de ruminantes. De forma geral, a manipulação da dieta por meio da suplementação com fontes de AGI resulta em aumento de AGI de cadeia longa em detrimento do C14:0 e C16:0, o que pode ser considerado desejável do ponto de vista da saúde humana em razão dos possíveis efeitos hipercolesterolêmicos atribuídos aos ácidos graxos C14:0 e C16:0 (Kennelly 1996).

Ao passo que pode trazer benefícios, a suplementação lipídica também pode causar impactos negativos sobre o desempenho de vacas leiteiras. Doses elevadas de lipídios (acima de 7% base na MS, (NRC 2001)) ou fontes ricas em ácidos graxos insaturados podem reduzir a fermentação ruminal da fibra e diminuir a degradação dos carboidratos da dieta reduzindo assim, a digestibilidade ruminal (Beauchemin et al. 2009). De fato, Harvatine e Allen (2005) observaram redução no consumo de matéria seca (0,8 kg/d) com a suplementação com AGI em comparação à saturada. De acordo com Jenkins (1993) a redução da degradação da fibra com a suplementação com fontes insaturadas de lipídios se deve à dificuldade de aderência microbiana às partículas de alimento e ao efeito tóxico dos ácidos graxos insaturados sobre a membrana plasmática microbiana. No entanto, os efeitos da suplementação com lipídios sobre o consumo ainda são conflitantes. Enquanto

Rabiee et al. (2012) relataram tendência à redução do consumo, Schroeder et al. (2004) não observaram efeito da suplementação lipídica sobre o consumo de vacas mantidas em pastejo.

A inclusão de AGPI à dieta também pode ter efeitos negativos sobre a digestibilidade pós-ruminal (Avila et al. 2000; Harvatine e Allen 2006b). De acordo com Bradford et al. (2008) fontes insaturadas de ácidos graxos estimulam a liberação de colecistoquinina (CCK) e de peptídeo semelhante a glucagon 1 (GLP-1), potentes reguladores da saciedade. Estes autores também observaram tendência à redução da liberação de grelina, hormônio produzido pelo abomaso e que estimula o consumo.

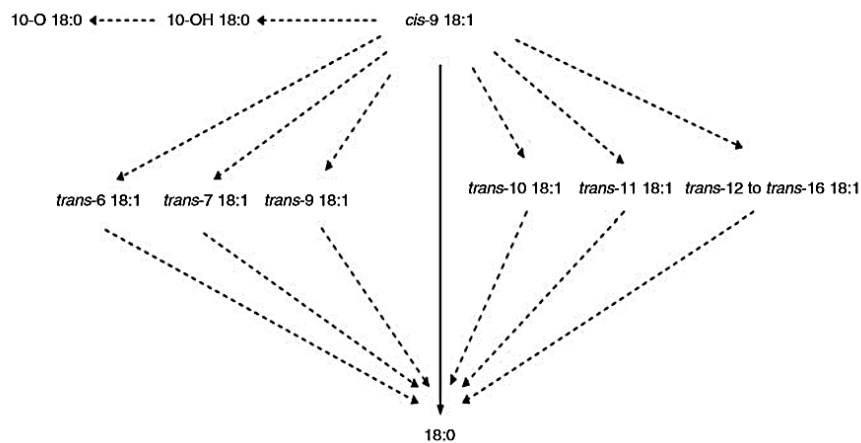
Como forma de proteção ao efeito tóxico dos ácidos graxos insaturados, os microrganismos realizam a biohidrogenação, processo que consiste em converter ácidos graxos insaturados em saturados, menos tóxicos, por meio de isomerizações e hidrogenações (Shingfield et al. 2010). Após ação das lipases microbianas que hidrolisam as ligações éster, os ácidos graxos livres são isomerizados e hidrogenados para formar ácidos graxos saturados. Portanto, o processo de biohidrogenação é o que determina o alto grau de saturação dos produtos de ruminantes (Lock e Bauman 2004).

A biohidrogenação dos ácidos graxos oleico (*cis*9-18:1), linoleico (*cis*9,*cis*12-18:2) e linolênico (*cis*9,*cis*12,*cis*15-18:3) (Figura 1) inicia-se pela hidrólise das ligações ésteres por lipases microbianas, seguida de isomerizações e hidrogenações até a redução a ácido esteárico (18:0). No entanto, alguns fatores dietéticos (dieta rica em carboidratos rapidamente fermentáveis, alta proporção de óleo na dieta, monensina) podem afetar a fermentação ruminal, modificando o metabolismo dos ácidos graxos através de complexos efeitos associativos que resultam em alteradas populações microbianas ruminais e diferentes rotas de biohidrogenação (Shingfield et al. 2010). Como consequência, a biohidrogenação pode ocorrer de forma incompleta, originando produtos intermediários, como ácidos graxos monoenos e dienos e vários isômeros de CLA (Palmquist et al. 2005).

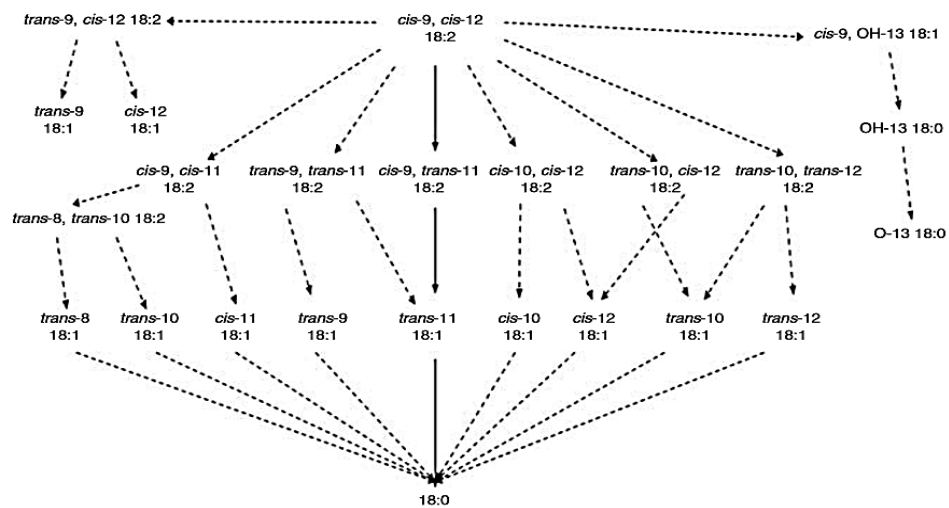
A taxa de biohidrogenação é proporcional ao grau de insaturação dos ácidos graxos. Beam et al. (2000) observaram que a taxa de biohidrogenação *in vitro* do ácido graxo oleico (18:1 *n*-9) foi geralmente mais baixa, com média de 3,6%/h, comparada ao do ácido graxo linoleico (18:2 *n*-6) de 14,3%/h. Estes autores também observaram relação inversa entre a quantidade de ácidos graxos e a taxa de biohidrogenação. A taxa de biohidrogenação declinou em 1,2%/h para cada aumento de unidade no percentual no C18:2 adicionado ao substrato. Diante disto, o fornecimento de altas concentrações de

ácidos graxos insaturados no ambiente ruminal podem resultar em processo incompleto de biohidrogenação, com acúmulo de produtos intermediários, que posteriormente serão absorvidos e incorporados diretamente à gordura do leite.

a)



b)



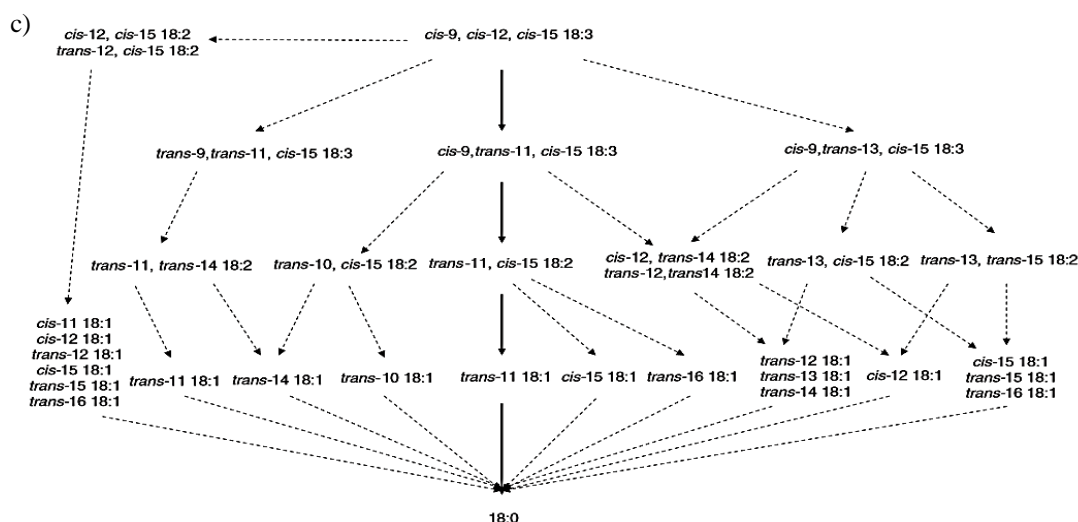


Figura 1 Rotas da biohidrogenação dos ácidos graxos oleico (a), linoleico (b) e linolênico (c). As setas com linhas cheias destacam a principal rota de biohidrogenação, ao passo que as setas com linhas tracejadas descrevem a formação de intermediários da biohidrogenação. Fonte: Shingfield et al. (2010).

A incompleta biohidrogenação gera alguns ácidos graxos *trans* que são apontados como fatores para a inibição da síntese de ácidos graxos na glândula mamária, diminuindo os teores de gordura do leite. O primeiro a ser reconhecido nesse processo foi o *trans*10,*cis*12-18:2 CLA (Baumgard et al. 2002). Posteriormente outros ácidos monoeno *trans* e CLAs (*trans*10-18:1, *trans*9,*cis*11-18:2 e *cis*10,*trans*12-18:2) também foram apontados como promotores da redução da síntese de gordura do leite (Shingfield et al. 2010).

Na glândula mamária há intensa atividade lipogênica. A síntese *de novo* é feita a partir de acetato e β -OHB, sendo que este último contribuiria com cerca de 15% do carbono fixado como gordura (Chilliard et al. 2000). As principais enzimas desta rota metabólica são: a Acetil-CoA carboxilase (ACACA) e a Ácido graxo sintetase (FASN). A primeira é responsável por transformar acetato em malonil-CoA, uma etapa limitante na síntese de gordura do leite. Existe alta correlação entre a atividade da ACACA e a taxa de síntese lipídica durante a lactogênese e a lactação. A FASN, um complexo enzimático de alto peso molecular que possui sete atividades diferentes, todas necessárias para efetuar o alongamento da cadeia de ácido graxo em formação, catalisa os ciclos de condensação do malonil-CoA com acetil-CoA ou butiril-CoA, originados do metabolismo do acetato ou do β -OHB (Chilliard et al. 2007).

A lipogênese se inicia com os substratos malonil-CoA e acetil-CoA. As reações enzimáticas implicadas no mecanismo de ação da FASN consistem em reduzir o

grupamento malonil de 3 C a 2 C e adicionar ao grupamento acetil, para fazer um grupamento butiril com 4 C. Isto representa um ciclo de reações e a cada vez que se repete, a cadeia de ácidos graxos aumenta em 2 C. No total, sete ciclos são necessários para conduzir a formação do produto final, o palmitato (16 C). O palmitato e seus derivados são os constituintes de base dos triglicerídeos.

Os ácidos graxos com mais de 16 carbonos não são sintetizados pela glândula mamária de ruminantes, pois o sistema enzimático (Tioestearase I) de terminação dos ciclos de condensação da síntese de ácidos graxos produz C14:0 e, predominantemente, C16:0 e a glândula mamária lactante, ao contrário de outros tecidos do ruminante, não é capaz de alongar C16:0 para C18:0 (Chilliard et al. 2000). Por esta razão, os ácidos graxos com mais de 18 carbonos são de origem exógena à glândula mamária, oriundos da mobilização das reservas corporais ou de ácidos graxos absorvidos da dieta.

Os ácidos graxos pré-formados têm sua origem nos AGNE ou de lipoproteínas ricas em triglicerídeos (TGA) (quilomícron e lipoproteínas de muito baixa densidade, VLDL). A retirada de AGNE do sangue depende basicamente da sua concentração circulante. No caso dos TGA, é necessária a ação da lipoproteína lipase (LPL). Essa enzima se apresenta em alta atividade na glândula mamária e a absorção de TGA é bem correlacionada com sua concentração plasmática (Harvatine et al. 2009).

A absorção de ácidos graxos de lipoproteínas de alta densidade (HDL) plasmáticas pela glândula mamária é baixa e ajuda a explicar o baixo conteúdo de AGPI no leite. Para compensar esse fato e não comprometer a fluidez do leite, a atividade da Esteroil CoA dessaturase (SCD) é elevada na glândula mamária, particularmente transformando o C18:0 em C18:1, sendo que outros ácidos graxos de cadeia média também podem ser insaturados. Todavia, a SCD tem pouca atividade sobre ácidos graxos com menos de 18 carbonos, motivo pelo qual a maioria dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) são saturados (Chilliard et al. 2000). Já no caso do esteárico, cerca de 40% do que é absorvido pela glândula mamária é reduzido a oleico, portanto, mais de 50% do oleico no leite é originado da atividade da SCD. Uma elevada proporção de 18:1 é típico da gordura do leite. Além de gerados a partir da SCD, eles provêm de intermediários da biohidrogenação dos AGPI que se acumularam no rúmen e foram absorvidos no epitélio intestinal (Corl et al. 2001).

Desta forma, os mecanismos pelos quais os ácidos graxos *trans* promovem a redução da gordura do leite estão diretamente relacionados à atividade das enzimas lipogênicas. Os ácidos graxos *trans* atuam na redução da expressão de genes que

codificam as enzimas ACACA, FASN, SCD e a LPL que atuam na lipogênese mamária (Piperova et al. 2000; Baumgard et al. 2002). Estudos mostraram que a suplementação com fontes ricas em linoleico *n*-6 reduz a expressão dos genes que codificam as enzimas FASN, SCD1 e SREBF-1 na glândula mamária de vacas leiteiras (Kadegowda et al. 2009; Jacobs et al. 2011). De Marchi et al. (2015) observaram tendência à redução da expressão gênica das enzimas FASN, LPL e SCD quando vacas receberam 250 g/dia de óleo de girassol via perfusão abomasal. Em revisão sobre o papel dos ácidos graxos *trans* na regulação nutricional da lipogênese mamária em ruminantes, Shingfield et al. (2010) relataram que administrações de *trans*10,*cis*12 CLA, intermediário da biohidrogenação, em quantidades de 1,25 a 5,0 g/dia tipicamente resultam em diminuição na síntese de ácidos graxos muitas vezes na ausência de alterações na SCD. No entanto, quantidades de 7,0 a 14,0 g/dia provocam desproporcionalmente grande redução na secreção de ácidos graxos sintetizados na síntese *de novo*, efeito que também é acompanhado por diminuições significativas nos índices de SCD. Ao avaliar diferentes razões oleico/linoleico na dieta de vacas leiteiras, He et al. (2012) relataram que dietas com maior proporção de linoleico são mais efetivas em deprimir a gordura do leite comparativamente à dieta com maior proporção de oleico. De acordo com Harvatine et al. (2009), a capacidade lipogênica da glândula mamária pode ser regulada em vários níveis, incluindo a transcrição, tradução, *turnover* de proteínas e pela atividade enzimática.

A maior concentração de AGPI no leite também aumenta sua susceptibilidade à oxidação e contribui para a menor durabilidade do produto (Havemose et al. 2006). O termo oxidação de lipídios se refere a uma série de reações químicas, que envolve ácidos graxos insaturados e oxigênio. As reações de auto-oxidação de lipídios no leite, assim como em outros alimentos, são relacionadas com a composição de ácidos graxos, concentração de oxigênio, calor, luz, presença de íons metálicos e antioxidantes (Schaich 2005).

O processo de oxidação consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo insaturado para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH). A oxidação lipídica pode ocorrer por catálise enzimática, por ação da lipoxigenase que atua sobre os ácidos graxos poli-insaturados catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poli-insaturada (Silva et al. 1999). Assim como também, pode ocorrer a peroxidação não enzimática, que envolve a participação de substâncias reativas ao oxigênio (ROS), metais de transição e outros radicais livres (Al-Mehdi et al. 1993; Porter et al. 1995).

A oxidação de lipídios pode ser dividida em três fases, iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação, o ácido graxo insaturado sofre o ataque de uma espécie que é suficientemente reativa para abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno (-CH₂-), formando um radical lipídico (L•). Essa reação ocorre por ação de catalisadores, ou seja, da interação do oxigênio com alguma fonte externa de energia (luz, calor, íons metálicos) (Lima e Abdalla 2001).

Formado o radical livre, este reage com oxigênio para formar o radical peróxil (LOO•), estabilizado por um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado, ou seja, duas duplas ligações intercaladas por uma ligação simples (Halliwell e Gutteridge 2007). Estes são altamente reativos, capazes de remover átomos de hidrogênio de outros ácidos graxos insaturados, formando um novo radical L• e um hidroperóxido lipídico (LOOH), promovendo assim a fase de propagação. Os LOOH produzidos são chamados de produtos primários da oxidação (Silva et al. 1999).

Na fase de terminação dois radicais formados nas duas fases iniciais reagem e formam os chamados produtos secundários da oxidação, tais como aldeídos, cetonas e ácidos, originando produtos não radicais (Schaich 2005). Os produtos secundários da lipoperoxidação são considerados potencialmente tóxicos e responsáveis pelo surgimento de odores e sabores indesejáveis e reduzem a qualidade e segurança alimentar (Moure et al. 2001). Entre os aldeídos produzidos na fase de terminação estão o malonaldeído (MDA) e o 4 hidroxi-2-nonenal (HNE). Enquanto o MDA é documentado como agente mutagênico para as células em mamíferos, o HNE, por sua vez, não possui ação mutagênica tão intensa como o MDA, mas é apresentado como o maior produto tóxico da peroxidação lipídica (Valko et al. 2007).

A formação de radicais livres e, conseqüentemente, a oxidação lipídica é proporcional ao grau de instauração do ácido graxo. Quanto maior o número de duplas ligações presentes em um ácido graxo, mais fácil é a remoção de átomos de hidrogênio e, conseqüentemente, mais fácil é a formação de um radical. Assim, os ácidos graxos saturados e monoinsaturados são mais resistentes aos radicais livres que ácidos graxos poli-insaturados (Lima e Abdalla 2001).

Devido a maior susceptibilidade à produção de radicais livres, a suplementação com AGPI também pode ter impactos nos processos celulares e afetar vários sistemas fisiológicos. Tendo em vista que a produção de radicais livres em vacas leiteiras no início da lactação é intensa e constante (Castillo et al. 2005) e que se encontram com sistema antioxidante endógeno naturalmente deprimido (Bernabucci et al. 2005), a suplementação

com AGPI pode intensificar o estresse oxidativo em vacas em início de lactação. De fato, estudos mostraram que a suplementação com AGPI aumentou a susceptibilidade do plasma à lipoperoxidação em vacas leiteiras (Cortes et al. 2012; Lima et al. 2015) fato que está relacionado à maior produção de radicais livres com a suplementação com fontes poli-insaturadas.

Os sistemas antioxidante endógeno têm por finalidade interromper as reações em cadeia eliminando os radicais livres intermediários e inibindo outras reações de oxidação (Halliwell e Gutteridge 2007). Este sistema pode ser encontrado em todas as células dos organismos vivos (Sordillo e Aitken 2009) e é composto pelas enzimas Catalase (CAT), Superóxido dismutase (SOD) e Glutathione peroxidase (GPX). Estas enzimas constituem o sistema de defesa antioxidante primário (Carocho e Ferreira 2013), sendo, portanto, de crucial importância (Alia et al. 2003). As enzimas do sistema antioxidante catalisam diretamente a redução de diferentes tipos de ROS (Sordillo e Aitken 2009). Por exemplo, a CAT está envolvida na detoxificação do peróxido de hidrogênio (Chelikani et al. 2004). A GPX catalisa a redução de hidroperóxidos lipídicos e peróxidos de hidrogênio pela glutathione reduzida (Ursini et al. 1985). A SOD é uma metaloenzima que catalisa a dismutação do O_2^\bullet para oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio (Zelko et al. 2002).

Além da possibilidade de aumentar o estresse oxidativo, a suplementação com AGPI também pode modular a expressão dos genes que codificam as enzimas antioxidantes endógenas. Embora a base fisiológica para esta resposta ainda não seja totalmente compreendida, falhas no sistema antioxidante endógeno que previne a peroxidação lipídica pode ser envolvida. Por exemplo, Cortes et al. (2012) relataram que a infusão abomasal com óleo rico em *n*-3 reduziu a abundância de RNAm de catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX1 e GPX3) e superóxido dismutase (SOD3) no tecido mamário de vacas em lactação. No entanto, De Marchi et al. (2015) relataram tendência a aumento da expressão do gene que codifica a enzima SOD2 com infusão abomasal de óleo rico em *n*-6. Estes resultados mostram que a suplementação com AGPI pode aumentar ou reduzir a atividade de enzimas do sistema antioxidante endógeno e evidenciam a necessidade de realização de mais estudos para elucidar tal resposta.

Diante do exposto, observa-se que a suplementação com fontes de ácidos graxos poli-insaturados ricos em linoleico *n*-6 e linolênico *n*-3 ao mesmo tempo tornam o leite um alimento de melhor qualidade para a saúde humana e promovem melhorias no balanço energético em vacas leiteiras no início de lactação, porém podem causar efeitos deletérios

sobre a ingestão de alimentos, desempenho leiteiro, estabilidade oxidativa do leite, atividade lipogênica da glândula mamária e a capacidade antioxidante.

No entanto, poucos trabalhos foram conduzidos com fontes ricas em ácidos graxos monoinsaturados para vacas leiteiras sobre tais parâmetros. Neste sentido, estudos que utilizem fontes ricas em ácido graxo oleico *n-9* podem ser de grande utilidade na busca pela produção de um leite com melhor composição em ácidos graxos e com menor impacto sobre a atividade lipogênica da glândula mamária, estabilidade oxidativa do leite e a capacidade antioxidante em vacas em início de lactação manejadas em pastagem tropical.

Diante do exposto, nossa hipótese é que óleos com diferentes proporções de ácidos graxos oleico (18:1 *n-9*) e linoleico (18:2 *n-6*), fornecidos de forma desprotegida da biohidrogenação, podem promover respostas distintas no desempenho leiteiro, balanço de energia, composição de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite e expressão gênica de enzimas lipogênicas e antioxidantes em vacas em início de lactação manejadas em pastagem tropical. Ademais, o óleo de amendoim, fonte rica em ácido graxo oleico (18:1 *n-9*), é pouco explorado na nutrição animal sendo de suma importância a investigação deste alimento como fonte energética para vacas leiteiras em início de lactação.

LITERATURA CITADA

(Normas: Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition)

- Al-Mehdi, A.B.; Dodia, C.; Jain, M.K.; Fisher, A.B., 1993: A phospholipase A2 inhibitor decreases generation of thiobarbituric acid reactive substance during lung ischemia-reperfusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1167**, 56-62.
- Alia, M.; Horcajo, U.; Bravo, L.; Goya, L., 2003: Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nutrition Research* **23**, 1251-1267.
- Archimède, H.; Eugène, M.; Marie Magdeleine, C.; Boval, M.; Martin, C.; Morgavi, D.P.; Lecomte, P.; Doreau, M., 2011: Comparison of methane production between C3 and C4 grasses and legumes. *Animal Feed Science and Technology* **166–167**, 59-64.
- Avila, C.D.; DePeters, E.J.; Perez-Monti, H.; Taylor, S.J.; Zinn, R.A., 2000: Influences of saturation ratio of supplemental dietary fat on digestion and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **83**, 1505-1519.
- Bargo, F.; Muller, L.D.; Delahoy, J.E.; Cassidy, T.W., 2002: Performance of High Producing Dairy Cows with Three Different Feeding Systems Combining Pasture and Total Mixed Rations. *Journal of Dairy Science* **85**, 2948-2963.
- Bargo, F.; Muller, L.D.; Kolver, E.S.; Delahoy, J.E., 2003: Invited Review: Production and Digestion of Supplemented Dairy Cows on Pasture. *Journal of Dairy Science* **86**, 1-42.
- Bauman, D.E.; Harvatine, K.J.; Lock, A.L., 2011: Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition* **31**, 299-319.
- Baumgard, L.H.; Corl, B.A.; Dwyer, D.A.; Bauman, D.E., 2002: Effects of conjugated linoleic acids (CLA) on tissue response to homeostatic signals and plasma variables associated with lipid metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science* **80**, 1285-1293.
- Beam, T.M.; Jenkins, T.C.; Moate, P.J.; Kohn, R.A.; Palmquist, D.L., 2000: Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *Journal of Dairy Science* **83**, 2564-2573.
- Beauchemin, K.A.; McGinn, S.M.; Benchaar, C.; Holtshausen, L., 2009: Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *Journal of Dairy Science* **92**, 2118-2127.
- Bernabucci, U.; Ronchi, B.; Lacetera, N.; Nardone, A., 2005: Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* **88**, 2017-2026.

- Bradford, B.J.; Harvatine, K.J.; Allen, M.S., 2008: Dietary unsaturated fatty acids increase plasma glucagon-like peptide-1 and cholecystokinin and may decrease premeal ghrelin in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **91**, 1443-1450.
- Branco, R.H.; Rodrigues, M.T.; Silva, M.; Rodrigues, C.; Queiroz, A.; Araújo, F., 2011: Desempenho de cabras em lactação alimentadas com dietas com diferentes níveis de fibra oriundas de forragem com maturidade avançada. *Revista Brasileira de Zootecnia* **40**, 1061-1071.
- Bu, D.P.; Wang, J.Q.; Dhiman, T.R.; Liu, S.J., 2007: Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *Journal of Dairy Science* **90**, 998-1007.
- Busato, A.; Faissler, D.; Küpfer, U.; Blum, J.W., 2002: Body condition scores in dairy cows: associations with metabolic and endocrine changes in healthy dairy cows. *Journal of Veterinary Medicine Series A* **49**, 455-460.
- Carocho, M.; Ferreira, I.C., 2013: A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* **51**, 15-25.
- Carvalho, S.; Rodrigues, M.T.; Branco, R.H.; Rodrigues, C.A.F., 2006: Comportamento ingestivo de cabras Alpinas em lactação alimentadas com dietas contendo diferentes níveis de fibra em detergente neutro proveniente da forragem. *Revista Brasileira de Zootecnia* **35**, 562-568.
- Castillo, C.; Hernandez, J.; Bravo, A.; Lopez-Alonso, M.; Pereira, V.; Benedito, J., 2005: Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *The Veterinary Journal* **169**, 286-292.
- Chelikani, P.; Fita, I.; Loewen, P.C., 2004: Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences* **61**, 192-208.
- Chilliard, Y.; Ferlay, A.; Mansbridge, R.M.; Doreau, M., 2000: Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Annales de Zootechnie* **49**, 181-205.
- Chilliard, Y.; Glasser, F.; Ferlay, A.; Bernard, L.; Rouel, J.; Doreau, M., 2007: Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology* **109**, 828-855.
- Contreras, G.A.; Sordillo, L.M., 2011: Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **34**, 281-289.
- Corl, B.A.; Baumgard, L.H.; Dwyer, D.A.; Griinari, J.M.; Phillips, B.S.; Bauman, D.E., 2001: The role of Delta(9)-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *The Journal of Nutritional Biochemistry* **12**, 622-630.
- Cortes, C.; Palin, M.F.; Gagnon, N.; Benchaar, C.; Lacasse, P.; Petit, H.V., 2012: Mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes and concentration of the mammalian lignan enterolactone in milk and plasma of dairy cows fed flax lignans and infused with flax oil in the abomasum. *British Journal of Nutrition* **108**, 1390-1398.
- Dann, H.M.; Morin, D.E.; Bollero, G.A.; Murphy, M.R.; Drackley, J.K., 2005: Parturition Intake, Postpartum Induction of Ketosis, and Periparturient Disorders Affect the Metabolic Status of Dairy Cows*. *Journal of Dairy Science* **88**, 3249-3264.
- De Marchi, F.E.; Palin, M.F.; dos Santos, G.T.; Lima, L.S.; Benchaar, C.; Petit, H.V., 2015: Flax meal supplementation on the activity of antioxidant enzymes and the expression of oxidative stress- and lipogenic-related genes in dairy cows infused with sunflower oil in the abomasum. *Animal Feed Science and Technology* **199**, 41-50.

- Deresz, F., 2001: Influência do período de descanso da pastagem de capim-elefante na produção de leite de vacas mestiças Holandês x Zebu. *Revista Brasileira de Zootecnia* **30**, 461-469.
- Deresz, F.; Paim-Costa, M.L.; Cóser, A.C.; Martins, C.E.; ABREU, J.d., 2006: Composição química, digestibilidade e disponibilidade de capim-elefante cv. Napier manejado sob pastejo rotativo. *Revista Brasileira de Zootecnia* **35**, 863-869.
- dos Santos, W.B.R.; Santos, G.T.D.; da Silva-Kazama, D.C.; Cecato, U.; de Marchi, F.E.; Visentainer, J.V.; Petit, H.V., 2011: Production performance and milk composition of grazing dairy cows fed pelleted or non-pelleted concentrates treated with or without lignosulfonate and containing ground sunflower seeds. *Animal Feed Science and Technology* **169**, 167-175.
- Drackley, J.K.; Dann, H.M.; Douglas, G.N.; Guretzky, N.A.J.; Litherland, N.B.; Underwood, J.P.; Loor, J.J., 2005: Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Growth* **7**.
- Duffield, T.F.; Lissemore, K.D.; McBride, B.W.; Leslie, K.E., 2009: Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production. *Journal of Dairy Science* **92**, 571-580.
- Grummer, R.R., 1991: Effect of feed on the composition of milk fat. *Journal of Dairy Science* **74**, 3244-3257.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C., 2007: *Free radicals in biology and medicine*. 4th edn. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Harvatine, K.; Boisclair, Y.; Bauman, D., 2009: Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. *Animal* **3**, 40-54.
- Harvatine, K.J.; Allen, M.S., 2005: The Effect of Production Level on Feed Intake, Milk Yield, and Endocrine Responses to Two Fatty Acid Supplements in Lactating Cows*. *Journal of Dairy Science* **88**, 4018-4027.
- Harvatine, K.J.; Allen, M.S., 2006a: Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **89**, 1081-1091.
- Harvatine, K.J.; Allen, M.S., 2006b: Fat supplements affect fractional rates of ruminal fatty acid biohydrogenation and passage in dairy cows. *The Journal of nutrition* **136**, 677-685.
- Havemose, M.S.; Weisbjerg, M.R.; Bredie, W.L.P.; Poulsen, H.D.; Nielsen, J.H., 2006: Oxidative Stability of Milk Influenced by Fatty Acids, Antioxidants, and Copper Derived from Feed. *Journal of Dairy Science* **89**, 1970-1980.
- Hayirli, A.; Grummer, R.; Nordheim, E.; Crump, P., 2002: Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *Journal of Dairy Science* **85**, 3430-3443.
- He, M.; Perfield, K.L.; Green, H.B.; Armentano, L.E., 2012: Effect of dietary fat blend enriched in oleic or linoleic acid and monensin supplementation on dairy cattle performance, milk fatty acid profiles, and milk fat depression. *Journal of Dairy Science* **95**, 1447-1461.
- Jacobs, A.A.A.; van Baal, J.; Smits, M.A.; Taweel, H.Z.H.; Hendriks, W.H.; van Vuuren, A.M.; Dijkstra, J., 2011: Effects of feeding rapeseed oil, soybean oil, or linseed oil on stearoyl-CoA desaturase expression in the mammary gland of dairy cows. *Journal of Dairy Science* **94**, 874-887.
- Jenkins, T.C., 1993: Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* **76**, 3851-3863.
- Kadegowda, A.; Bionaz, M.; Piperova, L.; Erdman, R.; Loor, J., 2009: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation and long-chain fatty acids alter lipogenic

- gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. *Journal of Dairy Science* **92**, 4276-4289.
- Kennelly, J.J., 1996: The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. *Animal Feed Science and Technology* **60**, 137-152.
- Kolver, E.S.; Muller, L.D., 1998: Performance and Nutrient Intake of High Producing Holstein Cows Consuming Pasture or a Total Mixed Ration1. *Journal of Dairy Science* **81**, 1403-1411.
- LeBlanc, S., 2010: Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development* **56**, S29-S35.
- Lima, E.; Abdalla, D., 2001: Lipid peroxidation: Mechanisms and evaluation in biological samples. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **37**, 293-303.
- Lima, L.S.; Palin, M.F.; Santos, G.T.; Benchaar, C.; Lima, L.C.R.; Chouinard, P.Y.; Petit, H.V., 2014: Effect of flax meal on the production performance and oxidative status of dairy cows infused with flax oil in the abomasum. *Livestock Science* **170**, 53-62.
- Lima, L.S.; Palin, M.F.; Santos, G.T.; Benchaar, C.; Petit, H.V., 2015: Effects of supplementation of flax meal and flax oil on mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes in mammary tissue, plasma and erythrocytes of dairy cows. *Livestock Science* **176**, 196-204.
- Lock, A.L.; Bauman, D.E., 2004: Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids* **39**, 1197-1206.
- Moure, A.; Cruz, J.M.; Franco, D.; Domínguez, J.M.; Sineiro, J.; Domínguez, H.; José Núñez, M.a.; Parajó, J.C., 2001: Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry* **72**, 145-171.
- Neves, C.A.; dos Santos, W.B.R.; Santos, G.T.D.; da Silva, D.C.; Jobim, C.C.; Santos, F.S.; Visentainer, J.V.; Petit, H.V., 2009: Production performance and milk composition of dairy cows fed extruded canola seeds treated with or without lignosulfonate. *Animal Feed Science and Technology* **154**, 83-92.
- Neves, C.A.; Santos, G.T.; Matsushita, M.; Alves, E.M.; Oliveira, R.L.; Branco, A.F.; Silva, D.C.; Furlan, A.C.; Petit, H.V., 2007: Intake, whole tract digestibility, milk production, and milk composition of Holstein cows fed extruded soybeans treated with or without lignosulfonate. *Animal Feed Science and Technology* **134**, 32-44.
- Nörnberg, J.L.; López, J.; Stumpf Júnior, W.; Costa, P.B.; Schafhäuser Júnior, J., 2006: Desempenho de vacas Jersey suplementadas com diferentes fontes lipídicas na fase inicial da lactação. *Revista Brasileira de Zootecnia* **35**, 1431-1438.
- NRC (ed.), 2001: *Nutrients requirements of dairy cattle*. The National Academies Press, Washington, D.C.
- Onetti, S.G.; Grummer, R.R., 2004: Response of lactating cows to three supplemental fat sources as affected by forage in the diet and stage of lactation: a meta-analysis of literature. *Animal Feed Science and Technology* **115**, 65-82.
- Palmquist, D.L.; Lock, A.L.; Shingfield, K.J.; Bauman, D.E., 2005: Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Advances in Food and Nutrition Research* **50**, 180.
- Palmquist, D.L.; Mattos, W.R.S., 2006: Metabolismo de lipídeos, In: BERCHIELLI, T.T. (ed.), *Nutrição de Ruminantes*. FUNEP, Jaboticabal. 287-310.
- Payne, J.; Dew, S.M.; Manston, R.; Faulks, M., 1970: The use of a metabolic profile test in dairy herds. *Veterinary Record* **87**, 150-157; 158.
- Petit, H.V.; Côrtes, C., 2010: Milk production and composition, milk fatty acid profile, and blood composition of dairy cows fed whole or ground flaxseed in the first half of lactation. *Animal Feed Science and Technology* **158**, 36-43.

- Piperova, L.S.; Teter, B.B.; Bruckental, I.; Sampugna, J.; Mills, S.E.; Yurawecz, M.P.; Fritsche, J.; Ku, K.; Erdman, R.A., 2000: Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. *The Journal of Nutrition* **130**, 2568-2574.
- Porter, N.A.; Caldwell, S.E.; Mills, K.A., 1995: Mechanisms of free radical oxidation of unsaturated lipids. *Lipids* **30**, 277-290.
- Rabiee, A.R.; Breinhild, K.; Scott, W.; Golder, H.M.; Block, E.; Lean, I.J., 2012: Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production and components: A meta-analysis and meta-regression. *Journal of Dairy Science* **95**, 3225-3247.
- Rennó, F.P.; Freitas Júnior, J.E.d.; Gandra, J.R.; Maturana Filho, M.; Verdurico, L.C.; Rennó, L.N.; Barletta, R.V.; Vilela, F.G., 2014: Effect of unsaturated fatty acid supplementation on digestion, metabolism and nutrient balance in dairy cows during the transition period and early lactation. *Revista Brasileira de Zootecnia* **43**, 212-223.
- Reynolds, C.; Aikman, P.; Lupoli, B.; Humphries, D.; Beever, D., 2003: Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *Journal of Dairy Science* **86**, 1201-1217.
- Roche, J.R.; Kay, J.K.; Friggens, N.C.; Loor, J.J.; Berry, D.P., 2013a: Assessing and Managing Body Condition Score for the Prevention of Metabolic Disease in Dairy Cows. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **29**, 323-336.
- Roche, J.R.; Macdonald, K.A.; Schütz, K.E.; Matthews, L.R.; Verkerk, G.A.; Meier, S.; Loor, J.J.; Rogers, A.R.; McGowan, J.; Morgan, S.R.; Taukiri, S.; Webster, J.R., 2013b: Calving body condition score affects indicators of health in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science* **96**, 5811-5825.
- Santos, A.D.F.; Torres, C.A.A.; Rennó, F.P.; Drumond, M.R.S.; Freitas Júnior, J.E.d., 2009: Utilização de óleo de soja em rações para vacas leiteiras no período de transição: consumo, produção e composição do leite. *Revista Brasileira de Zootecnia* **38**, 1363-1371.
- Schaich, K.M., 2005: *Lipid Oxidation: Theoretical Aspects*, Bailey's Industrial Oil and Fat Products. John Wiley & Sons, Inc.
- Schroeder, G.F.; Gagliostro, G.A.; Bargo, F.; Delahoy, J.E.; Muller, L.D., 2004: Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. *Livestock Production Science* **86**, 1-18.
- Shingfield, K.J.; Bernard, L.; Leroux, C.; Chilliard, Y., 2010: Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* **4**, 1140-1166.
- Silva, C.; LANA, R.d.P.; CAMPOS, J.d.S.; QUEIROZ, A.d.; Leão, M.I.; ABREU, D.d., 2009: Consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes e desempenho de vacas leiteiras em pastejo com dietas com diversos níveis de concentrado e proteína bruta. *Revista Brasileira de Zootecnia* **38**, 1372-1380.
- Silva, F.A.; Borges, M.F.M.; Ferreira, M.A., 1999: Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova* **22**, 94-103.
- Silva, H.A.d.; Koehler, H.S.; Moraes, A.d.; Guimarães, V.D.A.; Hack, E.C.; Carvalho, P.C.d.F., 2008: Análise da viabilidade econômica da produção de leite a pasto e com suplementos na região dos Campos Gerais-Paraná. *Ciência Rural* **38**, 445-450.
- Sordillo, L.M.; Aitken, S.L., 2009: Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **128**, 104-109.
- Ursini, F.; Maiorino, M.; Gregolin, C., 1985: The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* **839**, 62-70.
- Valko, M.; Leibfritz, D.; Moncol, J.; Cronin, M.T.; Mazur, M.; Telser, J., 2007: Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**, 44-84.

- Vargas, L.H.; Lana, R.d.P.; Jham, G.N.; Santos, F.L.; Queiroz, A.C.d.; Mancio, A.B., 2002: Adição de lipídios na ração de vacas leiteiras: parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do leite. *Revista Brasileira de Zootecnia* **31**, 522-529.
- Vilela, D.; Lima, J.; Resende, J.; Verneque, R.d.S., 2006: Desempenho de vacas da raça Holandesa em pastagem de coastcross. *Revista Brasileira de Zootecnia* **35**, 555-561.
- Vilela, D.; MATOS, L.; ALVIM, M.; Matioli, J.B., 2002: Utilização de gordura protegida durante o terço inicial da lactação de vacas leiteiras, em pastagem de coastcross. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **37**, 1503-1509.
- Wildman, E.E.; Jones, G.M.; Wagner, P.E.; Boman, R.L.; Troutt Jr, H.F.; Lesch, T.N., 1982: A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science* **65**, 495-501.
- Zelko, I.N.; Mariani, T.J.; Folz, R.J., 2002: Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* **33**, 337-349.

II - OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar os efeitos da suplementação com óleos de amendoim e girassol sobre o desempenho e variáveis produtivas, balanço de energia, produção, qualidade, composição de ácidos graxos e estabilidade oxidativa do leite do leite, metabólitos sanguíneos e abundância de RNAm de genes que codificam enzimas lipogênicas e antioxidantes endógenas em células provenientes do leite de vacas Jersey em pasto de *Panicum maximum* cv. Tanzânia.

III - Desempenho e balanço de energia em vacas Jersey a pasto no início da lactação suplementadas com óleos de amendoim e girassol

(Normas: Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition)

Resumo. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar o efeito da suplementação com óleos de amendoim e girassol sobre a produção e composição química do leite, balanço de energia (BE) e variação do peso e escore corporal (VPC e VECC) de vacas Jersey a pasto no início da lactação. Foram utilizadas 24 vacas distribuídas em delineamento em blocos ao acaso. Foram utilizados os tratamentos (1) concentrado padrão sem óleo (CONT); (2) concentrado mais de 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim (AME); (3) concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol (GIR); e (4) concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol (MIX). Os óleos foram fornecidos até os 67 dias de lactação (DEL). Após 67 DEL, o efeito residual da suplementação foi avaliado na produção de leite até os 237 DEL. Dados de ingestão, digestibilidade, produção e qualidade do leite e balanço de energia e VPC e VECC foram analisados aos 30 e 60 DEL. A suplementação com óleo não teve efeito sobre a ingestão de matéria seca total e de forragem. A suplementação lipídica aumentou a ingestão e digestibilidade do EE. A digestibilidade do FDN reduziu com a suplementação com óleo. O tratamento GIR reduziu a produção diária de leite, a produção de leite corrigida para 4% de gordura e a gordura do leite com resultados semelhantes entre tratamentos CONT, AME e MIX. A suplementação com óleo aumentou a ingestão de EL_L . O tratamento GIR reduziu a EL do leite, a eficiência de utilização da EL_L da dieta, VPC e VECC. O GIR melhorou o BE até os 60 DEL. A suplementação com óleos não resultou em melhor desempenho na lactação de vacas mantidas em pastagem tropical. A suplementação com óleo de girassol, rico em ácido graxo linoleico, reduz a produção e o teor de gordura do leite e melhorar o balanço de energia no início da lactação quando comparado ao óleo de amendoim, rico em oleico.

Palavras-chave: digestibilidade, gordura, linoleico, oleico, produção de leite

Introdução

Em razão do aumento das exigências para a produção de leite não compensada pelo baixo nível de ingestão de energia, o início da lactação é caracterizado por um balanço energético negativo (BEN) com mobilização de reservas corporais para atender à demanda por energia para produção de leite. Distúrbios metabólicos, má condição corporal, baixa produção e redução da eficiência reprodutiva são bem conhecidos por estarem associados a este evento (Olson et al. 2010; Esposito et al. 2014). Assim, para maximizar o consumo de energia por vacas leiteiras em início de lactação, com a finalidade de alcançar níveis mais elevados de produção de leite e reduzir os efeitos prejudiciais do balanço energético negativo, é fundamental que se recorra à suplementação com concentrados.

A adição de fontes lipídicas na dieta de vacas no início de lactação tem recebido atenção especial por parte dos pesquisadores nos últimos anos (Bu et al. 2007; Leiber et al. 2011; Lerch et al. 2012; Petit 2015). Entre os benefícios apontados com a suplementação lipídica estão o aumento da concentração energética da dieta, a redução do fornecimento de carboidratos rapidamente fermentáveis e melhor do desempenho produtivo e reprodutivo (Vilela et al. 2002; Salehi et al. 2016).

Contudo, resultados de pesquisa sobre desempenho produtivo e balanço de energia de vacas em início da lactação recebendo lipídios suplementar ainda são conflitantes. A variabilidade na resposta está relacionada, entre outros fatores, ao grau de instauração do lipídio utilizado. Enquanto fontes lipídicas ricas em ácidos graxos saturados (AGS) estão relacionadas a aumentos na produção de leite e teores de gordura do leite (Schroeder et al. 2004), fontes ricas em ácidos graxos poli-insaturadas (AGPI) podem reduzir a ingestão de energia e a energia secretada no leite, disponibilizando mais energia líquida para ganho de peso e melhora do balanço de energia (Harvatine e Allen 2006a; Santos et al. 2009). Ainda, fontes ricas em ácido graxo linoleico 18:2 *n*-6 (grãos e óleos de soja e girassol) também podem ter efeitos negativos sobre o teor de gordura do leite (Bauman e Griinari 2003), a digestibilidade ruminal (Beauchemin et al. 2009) e a digestibilidade pós-ruminal (Avila et al. 2000), com consequente redução na ingestão de alimentos e desempenho (Harvatine e Allen 2006b).

No entanto, existem poucas informações na literatura sobre a suplementação com fontes ricas em ácido graxo oleico 18:1 *n*-9 para vacas leiteiras no início de lactação. Nossa hipótese é que óleos com diferentes proporções de ácidos graxos oleico 18:1 *n*-9

e linoleico 18:2 *n*-6, fornecidos de forma desprotegida da biohidrogenação, podem promover respostas distintas no desempenho leiteiro e balanço de energia em vacas, em início de lactação, manejadas em pastagem tropical. Ademais, o óleo de amendoim, fonte rica em ácido graxo oleico, é pouco explorado na nutrição animal sendo de suma importância a investigação deste alimento como fonte energética para vacas leiteiras em início de lactação.

Materiais e Método

Local, animais, dietas e procedimentos experimentais

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Zootecnia da Agência de Pesquisa em Tecnologia do Agronegócio (APTA), em Ribeirão Preto/SP. Foram utilizadas 24 vacas da raça Jersey com peso corporal médio de $423 \pm 54,3$ kg, compostas de 12 primíparas e 12 multíparas. Adotou-se o delineamento em blocos ao acaso e animais foram blocados de acordo com a ordem de parto e a produção de leite na lactação anterior, para as vacas multíparas. Os animais foram manejados observando-se as normas de boa conduta ética no uso de animais para experimentação.

Antes do parto as vacas foram mantidas em pasto de capim-tanzânia e receberam concentrado composto por milho, farelo de soja, farelo de algodão e suplemento mineral vitamínico com 884 g/kg de MS; 204 g/kg de PB; 174 g/kg de FDN e 34,9 g/kg de EE.

O óleo de amendoim foi escolhido por ser uma fonte rica em ácido graxo monoinsaturado oleico e pobre em ácido graxo poli-insaturado linoleico. O óleo de girassol foi escolhido por possuir composição inversa ao do óleo de amendoim, rico em linoleico e pobre em oleico. O óleo de amendoim utilizado continha, expresso em percentual do total de ácidos graxos, 76,9 g/kg de 16:0; 27,3 g/kg de 18:0; 600 g/kg de *cis*9-18:1; 188 g/kg de *cis*9,*cis*12-18:2; 0,70 g/kg de *cis*9,*cis*12,*cis*15-18:3; 12,6 g/kg de 20:0 e 94,5 g/kg de outros ácidos graxos. O óleo de girassol utilizado continha 50,9 g/kg de 16:0; 37,9 g/kg de 18:0; 277 g/kg de *cis*9-18:1; 567 g/kg de *cis*9,*cis*12-18:2; 1,70 g/kg *cis*9,*cis*12,*cis*15-18:3; 2,73 g/kg de 20:0 e 62,7 g/kg de outros ácidos graxos. (Método 5509 - ISO (1978)).

Foram utilizados os tratamentos (1) concentrado padrão sem adição de óleo (CONT); (2) concentrado contendo de 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim (AME); (3) concentrado contendo 59,6 g/kg MS de óleo de girassol (GIR) e (4) concentrado contendo 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol (MIX)

para simular um óleo com razão equilibrada entre oleico: linoleico (63,9 g/kg de 16:0; 32,5 g/kg de 18:0; 439,1 g/kg de *cis*9-18:1; 377,9 g/kg de *cis*9,*cis*12-18:2; 1,20 g/kg de *cis*9,*cis*12,*cis*15-18:3; 7,70 g/kg de 20:0 e 77,4 g/kg de outros ácidos graxos). Os concentrados foram compostos por milho moído, farelo de soja, farelo de algodão, bicarbonato de sódio e suplemento mineral vitamínico, formulado para atender 50% exigências nutricionais de vacas em lactação de acordo com o NRC (2001) (Tabela 1). Para equilibrar os níveis de proteína bruta e a energia líquida de lactação entre o tratamento controle e os que receberam óleo (AME, GIR e MIX), o milho moído e o farelo de soja foram substituídos parcialmente pelo farelo de algodão nestes últimos.

O concentrado foi fornecido em duas refeições iguais (08 e 16h30min) em cochos individuais após as ordenhas. Inicialmente foram fornecidos 7,0 kg de concentrado com base na MS e acrescido de 1,0 kg de concentrado com base na MS para cada 2,5 kg de leite produzido acima dos 20 kg/dia. Para garantir o consumo total da quantidade de óleo a suplementar, este foi ofertado apenas na refeição da manhã, misturado a uma pequena quantidade de concentrado, esperando o animal consumir esta pequena porção para então, fornecer o restante do concentrado.

O período experimental foi dividido em duas fases. Na primeira fase, após o parto, as vacas foram distribuídas de forma aleatória para uma das quatro dietas e permaneceram nos mesmos tratamentos até os 67 dias em lactação (DEL). Durante esta fase foram realizados dois períodos de amostragem de ingredientes, concentrados, fezes e leite, com duração de sete dias, contados a partir dos 30 e 60 DEL. Na segunda fase, foi avaliado o efeito residual da suplementação inicial com óleo na produção de leite do 68 ao 237 DEL. Durante esta fase, os mesmos animais permaneceram em um mesmo piquete, ausente de pasto, com cocho e bebedouro coletivos e receberam como dieta, concentrado padrão (884 g/kg MS; 204 g/kg MS de PB; 174 g/kg MS de FDN e 34,9 g/kg MS de EE) e silagem de milho (884 g/kg MS; 204 g/kg MS de PB; 174 g/kg MS de FDN e 34,9 g/kg MS de EE), fornecido na proporção volumoso: concentrado de 60:40.

Durante o período de suplementação lipídica, as vacas tiveram como fonte de volumoso, pasto de capim-tanzânia em área de 5,0 ha, subdividida em 12 piquetes, que é adubado anualmente com ureia e cloreto de potássio (N-P-K, 20-0-20 kg/ha) após a saída dos animais do piquete. Foi adotado o sistema de pastejo rotacionado e as vacas tiveram acesso a cada piquete quando a altura média do dossel alcançou 100 cm e foram retiradas quando a altura atingiu 30 cm. O tempo médio de permanência em cada

piquete foi de um dia e meio. A taxa de lotação durante o período experimental foi de 33,2 UA/ha/dia.

A massa de forragem no pré-pastejo foi mensurada uma vez por semana coletando-se quatro amostras em quadro de 1,0 m² (1,0 × 1,0 m) em piquetes escolhidos por sorteio. Os quadros foram posicionados em pontos representativos da altura média do dossel do piquete no momento da amostragem. A forragem contida no interior do quadro foi cortada à altura média de 30 cm, semelhante à altura definida para o resíduo pós-pastejo. O material coletado foi pesado e composto em duas amostras. Separou-se estas amostras em duas porções, uma integral e outra da qual foi separado o material morto do vivo, que, posteriormente, foi separado em lâminas foliares e colmo. As frações material integral, material morto, lâminas foliares e colmo, foram acondicionadas em sacos de papel, pesadas, identificadas e submetidas à pré-secagem em estufa com circulação forçada de ar a 55°C por 72 h, para estimar a matéria pré-seca.

Amostras do pasto, simulando-se o pastejo pelos animais, foram realizadas conforme Johnson (1978) nos mesmos piquetes utilizados para determinação da massa de forragem. Estas amostras foram submetidas à pré-secagem em estufa com circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas, moídas em moinho tipo *Willey* com peneira de malha com crivos de 1,0 mm e armazenadas para posterior análise químico-bromatológicas.

A produção de massa de forragem do capim-tanzânia durante o período experimental permitiu oferta de 13,92 kg de MS por 100 kg peso vivo (PV) (Tabela 2). As alturas do dossel no pré e pós-pastejo ficaram próximas às pretendidas de 100 e 30 cm, respectivamente. Houve maior produção e proporção do componente folha antes e após o pastejo em comparação ao colmo. Após o pastejo foram observadas reduções na produção de massa de forragem e de folhas, na proporção de folhas e razão folha: colmo, com aumentos nas proporções de colmo e material morto.

O registro da produção de leite foi realizado diariamente durante o período de suplementação com óleo (0 a 67 DEL) e a cada 15 dias durante o período residual (68 a 237 DEL). Amostras de leite foram colhidas nas duas ordenhas aos 30 e 60 DEL, compostas de acordo com a produção correspondente, armazenadas em frascos contendo bronopol-B2 e refrigeradas a 4°C para estimar a composição normal (proteína, lactose, gordura, N ureico no leite e CCS). A correção da produção de leite para 4% de gordura foi realizada adotando-se a fórmula proposta por (Gaines 1928).

A estimativa da excreção fecal foi obtida a partir do indicador externo dióxido de titânio (TiO₂) (Myers et al. 2004) fornecido aos animais em cápsulas de 10 g por via

esofágica, em duas doses diárias após as ordenhas, com 10 dias para adaptação e cinco dias para coleta de fezes. As fezes foram colhidas diretamente da ampola retal dos animais após as ordenhas durante cinco dias seguidos contados a partir dos 30 e 60 DEL e armazenadas a -20°C para posterior pré-secagem em estufa com ventilação forçada de ar a 55°C por 72h, moídas e analisadas quanto à concentração de dióxido de titânio em espectrofotômetro a 410 nm.

Análises químicas

Como indicador interno para estimar a indigestibilidade foi utilizada a fibra detergente neutro indigestível (FDNi). Para isto, foram utilizadas duas vacas fistuladas no rúmen de acordo com a metodologia empregada por Cochran et al. (1986) com algumas modificações: incubação *in situ* das amostras (ingredientes do concentrado, forragem e fezes) por 288 horas e posterior tratamento térmico com solução de detergente neutro, durante uma hora, assumindo o resíduo como indigestível.

A excreção fecal (EF) foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\text{EF (kg/dia)} = \frac{\text{Quantidade do TiO}_2 \text{ administrado}}{\text{Concentração do marcador nas fezes}}$$

A contribuição da excreção fecal a partir do consumo de concentrado (EFconc) foi determinada como sendo o produto entre a quantidade de concentrado fornecida e a sua indigestibilidade. A estimativa do consumo de forragem foi determinada descontando-se a contribuição do concentrado para a excreção fecal e o valor dividido pela indigestibilidade da forragem, seguindo-se a fórmula abaixo:

$$\text{Consumo de forragem (kg)} = \frac{\text{EF} - \text{EFconc}}{\text{Indigestibilidade da forragem}}$$

Amostras dos ingredientes, concentrados e simulado de pastejo foram analisadas quanto ao teor de matéria seca de acordo com o método 934.01 da AOAC (1998). A matéria inorgânica foi estimada por combustão de acordo com o método 942.05 da AOAC (1998). O nitrogênio total foi estimado seguindo o método 988.05 da AOAC (1998) no aparelho Tecnal TE-036/1 (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) e a proteína bruta estimada como $\text{N} \times 6,25$. O extrato etéreo foi estimado no aparelho Tecnal TE-044/1 de

acordo com o método 920.39 de AOAC (1998). A fibra em detergente neutro foi estimada conforme a técnica descrita por Mertens (2002) adaptada para utilização de um Ankom²⁰⁰ Fiber Analyzer (Ankom Technology Corp., Fairport, NY, USA) usando α -amilase.

As amostras de leite foram analisadas quanto à composição normal por meio de espectrofotometria no infravermelho (Bentley model 2000; Bentley Instrument Inc., Chaska, MN, USA). A contagem de células somáticas do leite foi realizada por meio de um contador eletrônico (Somacount 500, Chaska, MN, USA) na Clínica do Leite - ESALQ/USP.

Variação do peso e escore corporal e balanço de energia

Para análise da variação do peso corporal e do escore de condição corporal (ECC), as vacas foram pesadas e avaliadas quanto ao ECC em escala de 1 a 5 (Wildman et al. 1982) ao parto e aos 30 e 60 DEL logo após a ordenha da manhã.

Os nutrientes digestivos totais (NDT) foram calculados a partir dos resultados de composição química-bromatológica e degestibilidade dos nutrientes adotando a fórmula proposta por Weiss et al. (1992):

$$\text{NDT (\%)} = \text{CNFd} + \text{PBd} + (\text{EEd} \times 2,25) + \text{FDNd}$$

A energia líquida de lactação (EL_L) foi calculada adotando as fórmulas propostas pelo NRC (2001) para cálculo da energia digestível (ED) e energia metabolizável (EM):

$$\text{ED (Mcal/kg)} = (4,41 \times \text{NDT}) / 100$$

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

$$\text{EL}_L \text{ (Mcal/kg)} = (0,703 \times \text{EM}) - 0,19$$

O balanço de energia foi calculado estimando-se a ingestão de energia líquida de lactação (EL_L) pelas vacas e subtraindo-se deste as estimativas das exigências nutricionais diárias em EL_L para manutenção e EL_L para produção de leite adotando as equações propostas pelo o NRC (2001):

$$\text{EL}_{\text{mant}} \text{ (Mcal/dia)} = [\text{PC}^{0,75} \times 0,08] + [((((\text{Distância do pasto à ordenha em km}/1000) \times \text{Número de deslocamentos}) \times (0,00045 \times \text{PC})) + (0,0012 \times \text{PC})]$$

$EL_{\text{leite}} = [(0,0929 \times \% \text{ de gordura}) + (0,0563 \times \% \text{ de Proteína}) + (0,0395 \times \% \text{ de lactose})] \times \text{Produção de leite em kg}$

Análise estatística

Os dados de consumo e digestibilidade dos nutrientes, produção diária e composição do leite, balanço de energia e variação do peso e escore corporal foram analisados como medidas repetidas no tempo, considerando como efeitos fixos o tratamento, DEL e interação tratamento \times DEL em um delineamento em blocos ao acaso pelo procedimento PROC MIXED do logiciário estatístico SAS (2000), seguindo o modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + (T \times D)_k + B_l + e_{ijkl}$$

em que Y_{ijk} é a variável dependente, μ é a média geral, T_i é efeito fixo de tratamento ($i = 1$ a 4), D_j é o efeito fixo dos dias em lactação ($j = 30$ a 60), $(T \times D)_k$ é a interação entre tratamento e dias em lactação, B_l para efeito de bloco e e_{ijkl} é o erro aleatório do resíduo.

Valores dos ajustes estatísticos para *Akaike's information criterion* (AIC) foram usados para determinar a estrutura de covariância mais apropriada. As médias foram geradas pelo LSMEANS e comparadas pelo teste Tukey, sendo declaradas diferentes quando $P \leq 0,05$ e tendência $0,05 > P \leq 0,10$.

Os dados de parâmetros da curva de lactação e produção de leite acumulada no período de suplementação com óleo, residual e na lactação total foram realizados em apenas um período, não os considerando como medidas repetidas. O modelo incluiu o efeito fixo de tratamento e o efeito aleatório de blocos, seguindo o modelo matemático:

$$Y_i = \mu + T_i + B_j + e_{ij}$$

em que Y_i é a variável dependente, μ é a média geral, T_i é efeito fixo de tratamento ($i = 1$ a 4), B_j o efeito de bloco e e_{ij} é o erro aleatório do resíduo.

Resultados

Não houve interação tratamento \times DEL para ingestão e digestibilidade dos nutrientes (Tabela 3). A suplementação com óleo não influenciou as ingestões de matéria seca total (CMS) e em função do peso vivo (% PV), de forragem (CMSf), matéria orgânica (CMO), de proteína bruta (CPB) e da fibra insolúvel em detergente neutro (CFDN) e carboidratos não fibrosos (CCNF). A suplementação lipídica aumentou ($p < 0,0001$) a ingestão de EE em até 36%, comparativamente à dieta controle. A digestibilidade do EE ($p = 0,02$) aumentou com a adição de óleo na dieta. A digestibilidade FDN reduziu ($p = 0,02$) com a suplementação com óleo, principalmente nos tratamentos GIR e MIX. Não houve efeito dos tratamentos para a DMS ($p = 0,51$), DMO ($p = 0,52$) e DPB ($p = 0,40$). Houve efeito dos DEL, com aumentos para o IMS (14,5 vs. 15,4 kg/dia), IMSf (7,48 vs. 8,37 kg/dia), IMO (13,2 vs. 14,0 kg/dia), IPB (2,57 vs. 2,71 kg/dia), IEE (0,74 vs. 0,77 kg/dia), IFDN (6,05 vs. 6,61 kg/dia) de 30 para 60 DEL.

Não houve interação tratamento \times DEL para produção e qualidade do leite (Tabela 4). O tratamento GIR reduziu a produção diária de leite (PL, $p = 0,04$), a produção de leite corrigida para 4% de gordura (PLCG, $p = 0,02$) e gordura do leite ($p = 0,04$) com resultados semelhantes entre tratamentos CONT, AME e MIX. Os teores de proteína, lactose, sólidos totais, extrato seco desengordurado, nitrogênio ureico no leite e a contagem de células somáticas foram semelhantes entre os tratamentos. Houve efeito dos DEL ($p = 0,004$) para a concentração de N-ureico no leite com maior valor observado aos 30 quando comparado a 60 DEL (12,9 vs. 10,4 mg/dL).

Vacas suplementadas com óleo apresentaram o dia do pico de lactação mais tardio ($p = 0,05$) e menor produção inicial de leite ($p = 0,03$) quando comparadas às do tratamento controle (Tabela 5). Houve tendência ($p = 0,06$) à menor produção final de leite para vacas dos tratamentos GIR e MIX. Não houve efeito da suplementação com óleos para a taxa de aumento da produção até o dia do pico (TxA, $p = 0,63$) e taxa de declínio da produção após o dia do pico (TxD, $p = 0,65$).

A suplementação com diferentes óleos influenciou as produções acumuladas no período residual (60 a 237 DEL) e na produção total na lactação (237 DEL) (Tabela 6). Vacas do tratamento GIR produziram menos leite no período residual ($p = 0,01$) e na lactação total ($p = 0,02$). Houve tendência à redução ($p = 0,09$) para a produção de leite

durante período de suplementação com óleo (0 a 60 DEL) para vacas do tratamento GIR.

Não houve interação tratamento \times DEL para os parâmetros relacionados ao balanço de energia e variação do peso e escore da condição corporal (Tabela 7). A adição de óleo ao concentrado aumentou ($p = 0,005$) a ingestão de EL_L pelas vacas. Vacas do tratamento GIR apresentaram menores concentração de EL no leite ($p = 0,03$), eficiência de utilização da EL_L da dieta para a produção de leite ($p = 0,01$), variações no peso corporal ($p = 0,01$) e no escore corporal ($p = 0,001$) e balanço energético positivo ($p = 0,0007$) até os 60 DEL quando comparada às demais. As variações do peso e do escore corporal foram mais intensas aos 30 que aos 60 DEL (46,9 vs. 10,4 kg e 0,48 vs. 0,26 ud, respectivamente). As vacas apresentaram tendência ($p = 0,08$) a melhor BE aos 60 que 30 DEL (-1,69 vs. -0,42 Mcal/dia).

Discussão

A produção de massa de forragem no pré-pastejo, com oferta de 13,92 kg MS por 100 kg PV, não foi fator limitante ao consumo. Considerando apenas a produção de folhas, componente mais nutritivo da forragem (Difante et al. 2009; Reis et al. 2009), a oferta diária de folhas foi de 47,9 kg de MS por animal, 2,9 vezes superior à ingestão de matéria seca praticada pelos animais do experimento e dentro do recomendado por Hodgson et al. (1994), de 2 a 3 vezes o consumo, para maximizar o desempenho em sistemas a pasto. Pérez-Prieto et al. (2011) observaram maiores consumo de forragem e produção de leite por vacas quando a oferta diária de forragem foi de 46 kg de MO por vaca.

A altura do dossel forrageiro foi reduzida após o pastejo em aproximadamente 70%. Mesmo a altura no pré-pastejo de 100 cm ter sido superior ao recomendado na literatura para o manejo do capim-tanzânia, de 70 cm (Barbosa et al. 2007; Difante et al. 2009), o estrato pastejável apresentou boas características morfológicas caracterizado pela alta proporção e produção de folhas e elevada razão folha: colmo. Na avaliação pós-pastejo, a redução na proporção (11,58%) e produção de folhas (2.437 kg/ha) e na razão folha: colmo (42,88%), com aumento na proporção de colmos (33,41%), evidenciou a seleção do componente folha pelas vacas durante pastejo em detrimento ao colmo.

A literatura relata a redução da IMS total e de forragem quando se fornece lipídios insaturados à dieta de vacas em lactação (Harvatine e Allen 2006b; Petit e Côrtes 2010). Essa redução no consumo se deve tanto a efeitos negativos sobre a digestibilidade ruminal da fibra (Beauchemin et al. 2009) como também sobre a digestibilidade pós-ruminal (Avila et al. 2000). A suplementação com AGPI reduz a liberação de grelina, produzida pelo abomaso a qual estimula o consumo (Relling e Reynolds 2007; Bradford et al. 2008). Entretanto, em nossa pesquisa, a suplementação com fontes lipídicas insaturadas não afetou a IMS total e de forragem. Talvez a alta demanda energética no início da lactação para a produção de leite tenha determinado nível de consumo semelhante entre os tratamentos, pois a ingestão de MS é dependente, entre outros fatores, da demanda energética para suprir as exigências diárias (Remppis et al. 2011). A baixa proporção de óleo na dieta (28 g/kg de MS) também pode explicar a ausência de efeito dos tratamentos sobre a IMS, como também observado por Dai et al. (2011) ao suplementar vacas com 20 g/kg de MS de óleos de canola, amendoim e girassol. Com ausência de efeito entre os tratamentos para ingestão de MS, MS de forragem e MO, é natural que a ingestão de PB, CNF e FDN, também não apresentassem diferença entre os tratamentos.

A ingestão de EE aumentou nas dietas com maior proporção de EE (AME, GIR e MIX), o que também determinou maior DEE nestes tratamentos, comparativamente ao controle.

Assim como observado em estudos prévios (Drackley et al. 2007; Kazama et al. 2010), a digestibilidade da fibra (FDN) foi reduzida pelo fornecimento de ácidos graxos insaturados na suplementação. De acordo com Jenkins (1993) a redução da degradação da fibra com a suplementação com fontes insaturadas de lipídios se deve à dificuldade de aderência microbiana às partículas de alimento e ao efeito tóxico dos ácidos graxos insaturados sobre a membrana plasmática microbiana. A redução da DFDN foi maior nos tratamentos com maior proporção de AGPI, tratamentos GIR e MIX, quando comparada ao tratamento AME, pela sua menor proporção em AGPI.

O aumento na IMS com o avanço da lactação de 30 para 60 DEL é natural, pois após o parto vacas apresentam uma lenta taxa de aumento na ingestão de alimentos (Hayirli e Grummer 2004). O aumento na IMS, nesta pesquisa, foi devido exclusivamente ao aumento na ingestão de forragem, uma vez que apenas durante os dias do pico de produção de leite as vacas produziram acima de 22,5 kg de leite e

receberam acima 7,0 kg MS/dia de concentrado. A ingestão de MO, PB, EE e FDN acompanharam o aumento na IMS de 30 para 60 DEL.

A produção e a qualidade do leite aos 30 e 60 DEL foram influenciadas pela característica da fonte lipídica predominante na suplementação. Vacas do tratamento GIR produziram menos leite quando comparada às demais. O tratamento AME, com baixa proporção de linoleico, e MIX, que possui 50% de ambos os óleos, produziram em média 2,0 kg leite/dia a mais que o tratamento GIR e produção semelhante ao CONT. Uma possibilidade para esta menor produção de leite no tratamento GIR pode estar relacionada à menor mobilização de reservas corporais quando as vacas receberam maiores proporções de ácido graxo linoleico, uma vez que a ingestão EL_L para o tratamento GIR foi semelhante aos tratamentos AME e MIX e superior ao tratamento controle. Provavelmente, a menor produção de leite com o fornecimento de AGPI seja resposta intrínseca do início da lactação, quando as vacas estão em balanço energético negativo, uma vez que não foram observadas reduções da produção de leite quando o fornecimento de fontes ricas em AGPI teve início em outras fases da lactação (Rego et al. 2009; Dai et al. 2011). Com a redução na ingestão de alimentos no período que antecede o parto, a energia liberada pela mobilização das reservas corporais é uma fonte energética importante para manter a produção de leite no início da lactação (Remppis et al. 2011).

A gordura do leite foi reduzida no GIR em até 12,8%, em média, quando comparado aos demais tratamentos. Uma hipótese para a depressão da gordura do leite ao fornecer óleo rico em ácido graxo linoleico se deve a mudanças nas rotas de biohidrogenação dos ácidos graxos poli-insaturados no rúmen com a formação de isômeros *trans* (Bauman e Griinari 2003; Shingfield et al. 2010). De acordo com Shingfield et al. (2010) e Bauman et al. (2011), alguns isômeros *trans* (*trans*10-18:1, *trans*9,*cis*11-18:2, *trans*10,*cis*12-18:2, *cis*10,*trans*12-18:2) podem por reduzem a capacidade e transcrição de enzimas lipogênicas responsáveis pela síntese *de novo* na glândula mamária. Nos tratamentos AME e MIX, devido à menor concentração em ácido graxo linoleico, provavelmente resultou em menor formação de isômeros *trans*, e contribuiu para manter normais os teores de gordura do leite. A redução da concentração de gordura no leite no GIR também determinou menor PLCG para este tratamento, em média 2,72 kg leite/dia.

A excreção de nitrogênio na forma de NUL diminuiu de 30 para 60 DEL, fato que pode estar relacionado ao aumento da IMS com o aumento da ingestão de forragem.

Com maior disponibilidade de energia pode ter ocorrido melhor aproveitamento da amônia produzida pela digestão microbiana da proteína da dieta e consequente redução da excreção de ureia no leite (Sinclair et al. 2014).

Quando analisados os parâmetros da curva de lactação, observa-se menor produção inicial de leite (registrada no quarto dia da lactação) para vacas suplementadas com óleos. A produção de leite diária do grupo controle aumenta até quarta semana de lactação quando atinge o pico de produção (dia 30 da lactação) enquanto vacas que receberam óleo retardaram o dia do pico de produção (dia 50 da lactação, em média). No entanto, em razão da maior produção de leite inicial no grupo controle, do maior tempo para atingir o pico de lactação no grupo suplementado com óleo e da produção de leite no pico semelhante entre os tratamentos, não houve diferença entre os tratamentos para taxa de aumento da produção de leite (kg de leite/dia) até atingir o pico de lactação.

A suplementação com lipídios até os 67 DEL não resultou em resposta positiva na produção de leite no período residual. Este fato pode ser confirmado pela taxa de declínio da produção de leite após o pico ou persistência da lactação semelhante entre os tratamentos. Ainda, durante o período residual a suplementação com óleo de girassol (GIR e MIX) até os 67 DEL resultou em menor produção de leite quando comparada ao controle e à suplementação com óleo de amendoim. Estes resultados discordam aos observados por Vilela et al. (2002) que observaram aumento na persistência, no pico de produção e na lactação total em vacas lactantes mantidas em pastagem tropical e suplementadas com gordura protegida.

O efeito negativo da suplementação com óleo rico em linoleico refletiu em baixas produções acumuladas no período residual (60 a 237 DEL) e na produção total na lactação. O tratamento GIR reduziu em média, 747 kg a produção de leite no período residual e 902 kg a produção total de leite, quando comparado aos tratamentos CONT e AME. O tratamento MIX, com razão oleico: linoleico de 1,16, manteve produções de leite no período residual e na lactação total intermediárias aos tratamentos AME e GIR.

Resultados de pesquisa sobre o efeito da suplementação inicial com lipídios na lactação total ainda são conflitantes. Vilela et al. (2002) observaram aumento na produção de leite ao longo de toda a lactação quando adicionaram 700 g/vaca/dia de sais de cálcio de óleo de palma ao concentrado de vacas mantidas em pastagem tropical na fase inicial da lactação. Schingoethe e Casper (1991) relataram aumentos de até 3,6% na produção total em 305 DEL para vacas suplementadas com fonte lipídica em que, 71% da produção adicional de leite ocorreu após a interrupção da suplementação

lipídica na 16ª semana de lactação. No entanto, assim como nesta pesquisa, Salado et al. (2004) não observaram efeito na produção de leite no período residual quando suplementaram com lipídios vacas mantidas sistema de pastagem até aos 75 dias de lactação.

Como reportado anteriormente, a alta proporção de ácido graxo linoleico na dieta, resultou em menor produção e teor de gordura do leite que resultou em menor EL secretada no leite para o tratamento GIR. A alta ingestão de EL_L da dieta com menor quantidade de energia secretada no leite no tratamento GIR reduziram a eficiência de utilização da EL_L da dieta destinada à produção de leite pelas vacas deste tratamento. Este resultado sugere que vacas que receberam maiores quantidades de ácido graxo linoleico utilizaram 40% da EL_L da dieta para outros eventos metabólicos, como manter as reservas corporais. Fato que pode ser constatado pelo melhor balanço de energia até os 60 DEL em vacas do tratamento GIR. Este resultado está em concordância aos de Harvatine e Allen (2006a) que ao aumentarem linearmente o grau de instauração da fonte lipídica suplementar da dieta observaram, concomitantemente, redução da gordura e da eficiência de conversão da energia da dieta para a produção de leite e aumentos no ganho de peso vazio e na energia líquida de ganho. Segundo estes autores, a energia que não é secretada no leite é armazenada no tecido adiposo e com a redução na síntese de gordura, mais acetato é disponibilizado para síntese de gordura no tecido adiposo.

A melhor eficiência em manter as reservas corporais no tratamento GIR fica evidente quando se observa os dados de variação do peso corporal e do ECC. As vacas deste tratamento perderam menos peso corporal e ECC até os 60 DEL quando comparada às dos tratamentos CONT, AME e MIX. Com menor ingestão de EL_L , vacas do tratamento CONT apresentaram BEN mais intenso até os 60 DEL, justificando assim, as maiores perdas de ECC.

De 30 para 60 DEL, houve redução da intensidade do balanço energético negativo (-1,69 vs. -0,42 Mcal/dia) em consequência do aumento na IMS e nível de produção de leite semelhante ao de 30 DEL, o que resultou em menor perda de peso e escore corporal aos 60 DEL. A mobilização lipídica é uma adaptação fisiológica de mamíferos para sobreviver a tempos de redução de nutrientes e disponibilidade de energia (Contreras e Sordillo 2011), situação que ocorre com vacas em início de lactação, em que a demanda por energia para suportar a produção é alta e o IMS ainda está reduzido. Com o passar das semanas de lactação a IMS aumenta gradativamente, eleva-se o

aporte de nutrientes para a produção de leite e a necessidade de mobilização das reservas corporais para manter a produção de leite é reduzida.

Conclusões

A suplementação com óleos insaturados para vacas no início da lactação mantidas em pastagem tropical não resulta em melhor desempenho leiteiro. A suplementação com óleo de girassol, rico em ácido graxo linoleico, reduz a produção e o teor de gordura do leite e melhorar o balanço de energia no início da lactação quando comparado ao óleo de amendoim, rica em ácido graxo oleico.

Referências

- AOAC (ed.), 1998: *Official Methods of Analysis*. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, M.P.
- Avila, C.D.; DePeters, E.J.; Perez-Monti, H.; Taylor, S.J.; Zinn, R.A., 2000: Influences of saturation ratio of supplemental dietary fat on digestion and milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **83**, 1505-1519.
- Barbosa, R.A.; NASCIMENTO JÚNIOR, D.d.; Euclides, V.P.B.; SILVA, S.d.; Zimmer, A.H.; TORRES JÚNIOR, R.d.A., 2007: Capim-tanzânia submetido a combinações entre intensidade e frequência de pastejo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **42**, 329-340.
- Bauman, D.E.; Griinari, J.M., 2003: Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition* **23**, 203-227.
- Bauman, D.E.; Harvatine, K.J.; Lock, A.L., 2011: Nutrigenomics, rumen-derived bioactive fatty acids, and the regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition* **31**, 299-319.
- Beauchemin, K.A.; McGinn, S.M.; Benchaar, C.; Holtshausen, L., 2009: Crushed sunflower, flax, or canola seeds in lactating dairy cow diets: Effects on methane production, rumen fermentation, and milk production. *Journal of Dairy Science* **92**, 2118-2127.
- Bradford, B.J.; Harvatine, K.J.; Allen, M.S., 2008: Dietary unsaturated fatty acids increase plasma glucagon-like peptide-1 and cholecystokinin and may decrease premeal ghrelin in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **91**, 1443-1450.
- Bu, D.P.; Wang, J.Q.; Dhiman, T.R.; Liu, S.J., 2007: Effectiveness of oils rich in linoleic and linolenic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. *Journal of Dairy Science* **90**, 998-1007.
- Cochran, R.C.; Adams, D.C.; Wallace, J.D.; Galyean, M.L., 1986: Predicting digestibility of different diets with internal markers - evaluation of 4 potential markers. *Journal of animal science* **63**, 1476-1483.
- Contreras, G.A.; Sordillo, L.M., 2011: Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **34**, 281-289.

- Dai, X.J.; Wang, C.; Zhu, Q., 2011: Milk performance of dairy cows supplemented with rapeseed oil, peanut oil and sunflower seed oil. *Czech Journal of Animal Science* **56**, 181-191.
- Difante, G.d.S.; Nascimento Júnior, D.d.; Euclides, V.P.B.; Silva, S.C.d.; Barbosa, R.A.; Gonçalves, W.V., 2009: Sward structure and nutritive value of tanzania guineagrass subjected to rotational stocking managements. *Revista Brasileira de Zootecnia* **38**, 9-19.
- Drackley, J.K.; Overton, T.R.; Ortiz-Gonzalez, G.; Beaulieu, A.D.; Barbano, D.M.; Lynch, J.M.; Perkins, E.G., 2007: Responses to increasing amounts of high-oleic sunflower fatty acids infused into the abomasum of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **90**, 5165-5175.
- Esposito, G.; Irons, P.C.; Webb, E.C.; Chapwanya, A., 2014: Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science* **144**, 60-71.
- Gaines, W.L., 1928: The energy basis of measuring milk yield in dairy cows. *Bulletin (University of Illinois (Urbana-Champaign campus). Agricultural Experiment Station); no. 308*.
- Harvatine, K.J.; Allen, M.S., 2006a: Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **89**, 1081-1091.
- Harvatine, K.J.; Allen, M.S., 2006b: Fat supplements affect fractional rates of ruminal fatty acid biohydrogenation and passage in dairy cows. *The Journal of Nutrition* **136**, 677-685.
- Hayirli, A.; Grummer, R., 2004: Factors affecting dry matter intake prepartum in relationship to etiology of peripartum lipid-related metabolic disorders: A review. *Canadian Journal of Animal Science* **84**, 337-347.
- Hodgson, J.; Clark, D.; Mitchell, R., 1994: Foraging behavior in grazing animals and its impact on plant communities. *Forage quality, evaluation, and utilization. Madison*, 796-827.
- ISO (ed.), 1978: *Animal and vegetable fats and oils – Preparation of methyl esters of fatty acids*.
- Jenkins, T.C., 1993: Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science* **76**, 3851-3863.
- Johnson, A., 1978: Sample preparation and chemical analysis of vegetation. *Measurement of grassland vegetation and animal production. Aberystwyth: Commonwealth Agricultural Bureaux*, 96-102.
- Kazama, R.; Côrtes, C.; da Silva-Kazama, D.; Gagnon, N.; Benchaar, C.; Zeoula, L.M.; Santos, G.T.; Petit, H.V., 2010: Abomasal or ruminal administration of flax oil and hulls on milk production, digestibility, and milk fatty acid profile of dairy cows. *Journal of Dairy Science* **93**, 4781-4790.
- Leiber, F.; Hochstrasser, R.; Wettstein, H.R.; Kreuzer, M., 2011: Feeding transition cows with oilseeds: Effects on fatty acid composition of adipose tissue, colostrum and milk. *Livestock Science* **138**, 1-12.
- Lerch, S.; Ferlay, A.; Shingfield, K.J.; Martin, B.; Pomiès, D.; Chilliard, Y., 2012: Rapeseed or linseed supplements in grass-based diets: Effects on milk fatty acid composition of Holstein cows over two consecutive lactations. *Journal of Dairy Science* **95**, 5221-5241.
- Mertens, D.R., 2002: Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: collaborative study. *Journal of AOAC International* **85**, 1217-1240.

- Myers, W.D.; Ludden, P.A.; Nayigihugu, V.; Hess, B.W., 2004: Technical note: A procedure for the preparation and quantitative analysis of samples for titanium dioxide. *Journal of animal science* **82**, 179-183.
- NRC (ed.), 2001: *Nutrients requirements of dairy cattle*. The National Academies Press, Washington, D.C.
- Olson, K.M.; Cassell, B.G.; Hanigan, M.D., 2010: Energy balance in first-lactation Holstein, Jersey, and reciprocal F1 crossbred cows in a planned crossbreeding experiment. *Journal of Dairy Science* **93**, 4374-4385.
- Pérez-Prieto, L.A.; Peyraud, J.L.; Delagarde, R., 2011: Pasture intake, milk production and grazing behaviour of dairy cows grazing low-mass pastures at three daily allowances in winter. *Livestock Science* **137**, 151-160.
- Petit, H.V., 2015: Milk production and composition, milk fatty acid profile, and blood composition of dairy cows fed different proportions of whole flaxseed in the first half of lactation. *Animal Feed Science and Technology* **205**, 23-30.
- Petit, H.V.; Côrtes, C., 2010: Milk production and composition, milk fatty acid profile, and blood composition of dairy cows fed whole or ground flaxseed in the first half of lactation. *Animal Feed Science and Technology* **158**, 36-43.
- Rego, O.A.; Alves, S.P.; Antunes, L.M.S.; Rosa, H.J.D.; Alfaia, C.F.M.; Prates, J.A.M.; Cabrita, A.R.J.; Fonseca, A.J.M.; Bessa, R.J.B., 2009: Rumen biohydrogenation-derived fatty acids in milk fat from grazing dairy cows supplemented with rapeseed, sunflower, or linseed oils. *Journal of Dairy Science* **92**, 4530-4540.
- Reis, R.A.; Ruggieri, A.C.; Casagrande, D.R.; Páscoa, A.G., 2009: Suplementação da dieta de bovinos de corte como estratégia do manejo das pastagens. *Revista Brasileira de Zootecnia* **38**, 147-159.
- Relling, A.E.; Reynolds, C.K., 2007: Feeding rumen-inert fats differing in their degree of saturation decreases intake and increases plasma concentrations of gut peptides in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **90**, 1506-1515.
- Rempis, S.; Steingass, H.; Gruber, L.; Schenkel, H., 2011: Effects of energy intake on performance, mobilization and retention of body tissue, and metabolic parameters in dairy cows with special regard to effects of pre-partum nutrition on lactation-A Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* **24**, 540-572.
- Salado, E.E.; Gagliostro, G.A.; Becu-Villalobos, D.; Lacau-Mengido, I., 2004: Partial replacement of corn grain by hydrogenated oil in grazing dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science* **87**, 1265-1278.
- Salehi, R.; Colazo, M.G.; Oba, M.; Ambrose, D.J., 2016: Effects of prepartum diets supplemented with rolled oilseeds on calf birth weight, postpartum health, feed intake, milk yield, and reproductive performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science* **99**, 3584-3597.
- Santos, A.D.F.; Torres, C.A.A.; Rennó, F.P.; Drumond, M.R.S.; Freitas Júnior, J.E.d., 2009: Utilização de óleo de soja em rações para vacas leiteiras no período de transição: consumo, produção e composição do leite. *Revista Brasileira de Zootecnia* **38**, 1363-1371.
- SAS, 2000: SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schingoethe, D.J.; Casper, D.P., 1991: Total lactational response to added fat during early lactation. *Journal of Dairy Science* **74**, 2617-2622.
- Schroeder, G.F.; Gagliostro, G.A.; Bargo, F.; Delahoy, J.E.; Muller, L.D., 2004: Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. *Livestock Production Science* **86**, 1-18.

- Shingfield, K.J.; Bernard, L.; Leroux, C.; Chilliard, Y., 2010: Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* **4**, 1140-1166.
- Sinclair, K.; Garnsworthy, P.; Mann, G.; Sinclair, L., 2014: Reducing dietary protein in dairy cow diets: implications for nitrogen utilization, milk production, welfare and fertility. *Animal* **8**, 262-274.
- Vilela, D.; MATOS, L.; ALVIM, M.; Matioli, J.B., 2002: Utilização de gordura protegida durante o terço inicial da lactação de vacas leiteiras, em pastagem de coast-cross. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **37**, 1503-1509.
- Weiss, W.P.; Conrad, H.R.; Stpierre, N.R., 1992: A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. *Animal Feed Science and Technology* **39**, 95-110.
- Wildman, E.E.; Jones, G.M.; Wagner, P.E.; Boman, R.L.; Troutt Jr, H.F.; Lesch, T.N., 1982: A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. *Journal of Dairy Science* **65**, 495-501.

Tabela 1 Ingredientes e composição química do simulado de pastejo e dos concentrados

Item	Forragem	Concentrados *			
		CONT	AME	GIR	MIX
Ingrediente (g/kg MS)					
Milho		715,5	567,4	567,4	567,4
Farelo de soja		232,0	28,4	28,4	28,4
Farelo de Algodão		14,2	306,4	306,4	306,4
Óleo de amendoim		0,00	59,6	0,00	29,8
Óleo de girassol		0,00	0,00	59,6	29,8
Bicarbonato de sódio		17,0	17,0	17,0	17,0
Mistura min. Vitamínico †		21,3	21,3	21,3	21,3
<i>Composição química</i>					
Matéria seca (g/kg)	275,2	884,1	894,7	894,7	894,7
Matéria orgânica (g/kg MS)	918,9	905,4	905,3	905,3	905,3
Proteína bruta (g/kg MS)	154,3	204,1	200,9	200,9	200,9
Extrato etéreo (g/kg MS)	30,8	34,9	84,7	84,7	84,7
Fibra em detergente neutro (g/kg MS)	643,7	174,4	179,9	179,9	179,9
Carboidratos não fibrosos (g/kg MS)	90,1	488,7	499,3	499,3	499,3

* CONT, concentrado padrão sem adição de óleo; AME, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim; GIR, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol e MIX, concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol.

† Níveis de garantia do produto: Ca (228,00 g), Co (60,00 mg), Cu (850,00 mg), S (20,00 mg), Fe (1,00g), F (760,00 mg), P (76,00 g), I (65,00 mg), Lasalocida (3,0 g), Mg (50,00 g) Mn (2,0 g), Se (20,00 mg), Na (78,00 g), Zn (6,00 g), Vit. A (220.000 UI) e Vit. E (1.000 UI).

Tabela 2 Médias e desvio padrão para a produção de massa de forragem e de folhas, características estruturais e composição morfológica do pasto de capim-tanzânia durante o período de suplementação com óleo

Item	Pré-pastejo	Pós-pastejo	Δ
Massa de forragem (kg MS/ha)	5.099 \pm 186	2.374 \pm 461	2.725
Altura (cm)	102 \pm 1,16	31,4 \pm 0,60	70,6
Folhas (%)	81,2 \pm 0,05	71,8 \pm 0,05	9,40
Colmo (%)	18,7 \pm 0,05	28,1 \pm 0,05	9,40
Material morto (%)	19,5 \pm 0,05	23,1 \pm 0,03	3,60
Razão folha:colmo	4,88 \pm 1,25	2,79 \pm 0,76	2,09
Massa de folhas (kg MS/ha)	4.143 \pm 151	1.705 \pm 134	2.438

Tabela 3 Ingestão de matéria seca total (IMS), de forragem (IMSf) e de nutrientes e digestibilidade dos nutrientes por vacas Jersey a pasto suplementadas com óleos de amendoim e girassol no início da lactação

Item	Tratamentos *				EPM ‡	P-valor †		
	CONT	AME	GIR	MIX		Trat	DEL	Trat x DEL
IMS (kg/dia)	14,5	14,9	15,2	15,1	0,19	0,72	0,03	0,32
IMSf (kg/dia)	7,46	7,90	8,20	8,11	0,19	0,73	0,03	0,32
IMS (%PV)	3,72	3,82	3,89	3,96	0,09	0,97	0,20	0,67
IMO (kg/dia)	13,2	13,6	13,9	13,8	0,18	0,72	0,03	0,32
IPB (kg/dia)	2,59	2,63	2,68	2,67	0,03	0,81	0,03	0,31
IEE (kg/dia)	0,50 ^b	0,84 ^a	0,85 ^a	0,84 ^a	0,02	<0,0001	0,03	0,32
IFDN (kg/dia)	6,05	6,38	6,58	6,32	0,12	0,70	0,02	0,24
DMS (g/kg MS)	694,5	703,6	700,0	680,9	0,40	0,51	0,49	0,49
DMO (g/kg MS)	703,6	714,5	709,9	690,9	0,41	0,52	0,54	0,36
DPB (g/kg MS)	770,2	748,9	756,1	739,6	0,61	0,40	0,27	0,96
DEE (g/kg MS)	719,8 ^b	777,2 ^a	770,9 ^a	761,4 ^a	0,83	0,05	0,25	0,89
DFDN (g/kg MS)	593,9 ^a	573,1 ^{ab}	562,4 ^b	544,1 ^b	0,57	0,02	0,49	0,98

* CONT, concentrado padrão sem adição de óleo; AME, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim; GIR, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol e MIX, concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol.

† Valor da Probabilidade para efeito de Tratamento (Trat); Dias em leite (DEL) e interação Tratamento × DEL (Trat × DEL).

‡ Erro padrão da média.

^{a-b} Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4 Produção e composição química do leite de vacas Jersey a pasto suplementadas com óleos de amendoim e girassol no início da lactação

Item §	Tratamentos *				EPM ‡	P-valor †		
	CONT	AME	GIR	MIX		Trat	DEL	Trat x DEL
PL (kg/dia) ⁴	20,2 ^a	19,6 ^a	17,9 ^b	20,3 ^a	0,34	0,04	0,30	0,75
PLCG (kg/dia) ⁵	18,1 ^a	17,8 ^a	15,6 ^b	19,1 ^a	0,43	0,02	0,88	0,64
Gordura (g/kg)	35,1 ^a	33,0 ^a	29,7 ^b	34,1 ^a	0,07	0,04	0,89	0,41
Proteína (g/kg)	31,2	31,6	31,1	30,4	0,01	0,34	0,97	0,91
Lactose (g/kg)	44,9	44,3	44,6	44,5	0,02	0,71	0,13	0,82
ST (g/kg) ⁶	120,9	119,4	117,5	119,1	0,06	0,41	0,98	0,92
ESD (g/kg) ⁷	86,0	86,0	86,1	85,2	0,03	0,93	0,16	0,91
ECS log ⁸	2,43	2,31	2,43	2,25	0,06	0,66	0,40	0,23
NUL (mg/dL) ⁹	12,6	12,3	11,0	10,8	0,47	0,16	0,004	0,67

* CONT, concentrado padrão sem adição de óleo; AME, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim; GIR, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol e MIX, concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol.

† Valor da Probabilidade para efeito de Tratamento (Trat); Dias em leite (DEL) e interação Tratamento × DEL (Trat × DEL).

‡ Erro padrão da média.

^{a-b} Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

§ PL, Produção de leite; PLCG, Produção de leite corrigida a 4%; ST, Sólidos totais; ESD, Estrato seco desengordurado; ECS, Escore de células somáticas e NUL, Nitrogênio ureico no leite.

Tabela 5 Parâmetros da curva de lactação de vacas Jersey a pasto suplementadas com óleos de amendoim e girassol no início da lactação

Item §	Tratamentos *				EPM ‡	P-valor †
	CONT	AME	GIR	MIX		
Produção Inicial	19,4 ^a	12,2 ^b	12,7 ^b	12,8 ^b	0,01	0,03
Produção final	12,9	12,0	8,50	9,45	0,61	0,06
DPP	30,0 ^b	46,7 ^a	53,7 ^a	47,3 ^a	2,85	0,05
PLP	25,1	24,3	22,7	23,3	0,54	0,26
TxA	0,29	0,28	0,29	0,21	0,02	0,63
TxD	0,057	0,058	0,066	0,066	0,002	0,65

* CONT, concentrado padrão sem adição de óleo; AME, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim; GIR, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol e MIX, concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol.

† Valor da Probabilidade para efeito de Tratamento (Trat).

‡ Erro padrão da média.

^{a-b} Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

§ DPP, Dia do pico de produção de leite; PLP, Produção de leite no pico; TxA, Taxa de aumento da produção de leite até o pico em kg/dia; TxD, Taxa de declínio da produção de leite após o pico em kg/dia.

Tabela 6 Produção de leite acumulada no período de suplementação com óleo (0 - 60 DEL), no período residual (60 - 237 DEL) e na lactação total (237 DEL) de vacas Jersey a pasto suplementadas com óleos de amendoim e girassol no início da lactação

DEL	Tratamentos *				EPM ‡	P-valor †
	CONT	AME	GIR	MIX		
0 - 60	1.251	1.107	1.028	1.128	30,0	0,09
60 - 237	2.853 ^a	2.688 ^a	2.038 ^b	2.394 ^{ab}	103,8	0,01
Total	4.105 ^a	3.796 ^a	3.066 ^b	3.523 ^{ab}	128,4	0,02

* CONT, concentrado padrão sem adição de óleo; AME, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim; GIR, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol e MIX, concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol.

† Valor da Probabilidade para efeito de Tratamento (Trat).

‡ Erro padrão da média.

^{a-b} Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 7 Ingestão de energia líquida de lactação (IEL_L), energia líquida secretada no leite (EL_{leite}), energia líquida de manutenção (EL_{mant}), balanço da energia (BE), eficiência de uso da energia da dieta para a produção de leite (EU_{E_LL}), variação do peso corporal (VPC) e variação do escore da condição corporal (VECC) de vacas Jersey a pasto suplementadas com óleos de amendoim e girassol no início da lactação

Item	Tratamentos *				EPM ‡	P-valor †		
	CONT	AME	GIR	MIX		Trat	DEL	Trat x DEL
IEL _L (Mcal/dia)	19,6 ^b	22,4 ^a	23,0 ^a	22,2 ^a	0,34	0,005	0,13	0,92
EL _{leite} (Mcal/dia)	13,2 ^a	13,1 ^a	11,5 ^b	13,9 ^a	0,30	0,03	0,73	0,69
EL _{mant} (Mcal/dia)	10,1	10,0	10,0	9,73	0,13	0,95	0,22	0,97
BE (Mcal/dia)	-3,21 ^c	-0,64 ^b	1,35 ^a	-1,72 ^{bc}	0,42	0,0007	0,08	0,99
EU _{E_LL}	0,69 ^a	0,58 ^b	0,50 ^c	0,62 ^{ab}	0,01	0,01	0,16	0,85
VPC	34,3 ^a	27,9 ^{ab}	21,8 ^b	30,6 ^a	3,06	0,01	0,0001	0,33
VECC	0,50 ^a	0,44 ^{ab}	0,21 ^c	0,43 ^b	0,03	0,001	0,0002	0,56

* CONT, concentrado padrão sem adição de óleo; AME, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim; GIR, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol e MIX, concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol.

† Valor da Probabilidade para efeito de Tratamento (Trat); Dias em leite (DEL) e interação Tratamento × DEL (Trat × DEL).

‡ Erro padrão da média.

^{a-b} Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

IV - Expressão gênica de enzimas lipogênicas e antioxidantes em vacas Jersey a pasto suplementadas no início da lactação com óleos de amendoim e girassol

(Normas: Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition)

Resumo. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar o efeito da suplementação com óleos de amendoim e girassol sobre a composição de ácidos graxos da gordura e estabilidade oxidativa do leite, metabólitos sanguíneos e expressão gênica de enzimas lipogênicas e antioxidantes em vacas Jersey a pasto no início da lactação. Foram utilizadas 24 vacas distribuídas em delineamento em blocos ao acaso. Foram utilizados os tratamentos (1) concentrado controle sem adição de óleo (CONT); (2) concentrado mais de 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim (AME); (3) concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol (GIR); e (4) concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol (MIX). As amostragens de leite e sangue foram realizadas aos 30 e 60 dias em leite (DEL). O tratamento GIR aumentou a proporção de AGPI enquanto o tratamento AME aumentou a proporção de AGMI, AGPI *n*-3 na gordura do leite. Maior produção de dienos conjugados foi observada para o GIR. O GIR reduziu a abundância de RNAm das enzimas ácido graxo sintetase e estearoil CoA dessaturase. Para o tratamento MIX observou-se maior atividade de enzimas lipogênicas, exceto para PPAR α . Menor abundância relativa de RNAm para SOD1 foi observada nos tratamentos GIR e MIX. A suplementação com óleo apresentou tendência a reduzir a abundância relativa de RNAm de GPX1. A suplementação com óleo de girassol, rico em linoleico, aumenta a proporção de AGPI da gordura do leite e reduz a estabilidade oxidativa do leite e a expressão gênica de enzimas lipogênicas e antioxidantes. A suplementação com óleo de amendoim, rico oleico, aumenta o índice promotor da saúde por aumentar a proporção de AGMI e AGPI *n*-3 ao leite sem, no entanto, ter efeitos negativos sobre a expressão gênica de enzimas lipogênicas e antioxidantes e a estabilidade oxidativa da gordura do leite.

Palavras-chave: abundância de mRNA, linoleico, lipoperoxidação, oleico

Introdução

A suplementação com lipídios é importante principalmente no início da lactação quando as vacas possuem alta demanda por energia e estão sujeitas ao balanço energético negativo e estresse oxidativo (Bernabucci et al. 2005). A inclusão de ácidos graxos insaturados (AGI) à dieta de vacas em lactação tem sido a estratégia recomendada para aumentar o conteúdo de energia da dieta e modificar a proporção de ácidos graxos da gordura do leite (Cortes et al. 2011). A suplementação com ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) tem despertado interesse nos últimos anos por aumentar a proporção de *n*-3, *n*-6 e ácido linoleico conjugado (CLA) na gordura do leite. De fato, a transferência de AGPI para o leite foi verificada quando vacas foram alimentadas com grãos de oleaginosas como canola (Neves et al. 2009), soja (Neves et al. 2007) e linhaça (Lima et al. 2015). De acordo com Cicero et al. (2012) a ingestão de AGPI traz benefícios à saúde humana.

Por outro lado, a suplementação com fontes ricas em ácido graxo linoleico tem ocasionado aumento da oxidação da gordura (Havemose et al. 2006) e redução dos teores de gordura do leite por reduzir a expressão de importantes genes que codificam enzimas lipogênicas, como a ácido graxo sintetase (FASN), esteroil CoA dessaturase (SCD) e acetil CoA carboxilase (ACACA) e fator de ligação ao elemento regulatório de Esterol 1 (SREBF-1) na glândula mamária de vacas leiteiras (Kadegowda et al. 2009; Jacobs et al. 2011; De Marchi et al. 2015).

Estudos ainda mostraram que a suplementação com AGPI aumentou a susceptibilidade do plasma à lipoperoxidação em vacas (Gobert et al. 2009; Lima et al. 2015). A peroxidação, que é uma reação natural do metabolismo oxidativo das células com produção de radicais livres e espécies reativas ao oxigênio (ROS), pode aumentar o estresse oxidativo em animais (Gobert et al. 2009). Desta forma, a suplementação com óleos ricos em AGPI pode intensificar o estresse oxidativo em vacas em início de lactação, as quais já se encontram naturalmente com o sistema antioxidante endógeno deprimido (Bernabucci et al. 2005). O sistema antioxidante endógeno é composto pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPX) que, por removerem peróxidos e superóxidos antes que estes reajam com catalizadores formando componentes reativos, constituem o sistema de defesa antioxidante primário (Carocho e Ferreira 2013), de crucial importância aos organismos vivos (Alia et al. 2003). Côrtes et al. (2012) observaram que a suplementação com fonte rica em ácidos

graxos *n*-3 reduziu a abundância de RNAm das enzimas CAT, SOD e GPX no tecido mamário de vacas em lactação. Por outro lado, De Marchi et al. (2015) relataram tendência ao aumento da expressão do gene que codifica a enzima SOD2 com infusão abomasal de óleo rico em ácido graxo linoleico.

O ácido oleico (18:1 *n*-9) é tido como diretamente biohidrogenado a ácido esteárico (18:0) no rúmen. No entanto, Mosley et al. (2002) demonstraram *in vitro* a formação de vários isômeros posicionais de monoenos *trans* por microrganismos do rúmen a partir ácido oleico. Assim, fontes ricas em ácido graxo oleico também podem ser precursoras importantes para transferência de AGPI para o leite, pela atividade da enzima SCD (ou Δ^9 dessaturase) mamária, como observado por Dai et al. (2011). Nossa hipótese é que óleos com diferentes proporções em oleico: linoleico tenham respostas distintas sobre a composição em ácidos do leite, a estabilidade oxidativa do leite e a expressão gênica de enzima antioxidantes e lipogênicas em vacas leiteiras no início de lactação.

Assim, objetivou-se com esta pesquisa avaliar o efeito da suplementação com óleos de amendoim e girassol para vacas manejadas em pastagem tropical no início lactação sobre a composição de ácidos graxos da gordura e estabilidade oxidativa do leite, metabólitos sanguíneos e abundância de RNAm de genes relacionados à atividade antioxidante e lipogênica.

Materiais e método

Local, animais, dietas e procedimentos experimentais

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Zootecnia da Agência de Pesquisa em Tecnologia do Agronegócio (APTA), em Ribeirão Preto/SP. Foram utilizadas 24 vacas mestiças da raça Jersey com peso corporal médio de $423 \pm 54,3$ kg, compostas de 12 primíparas e 12 multíparas. Adotou-se o delineamento em blocos ao acaso e animais foram blocados de acordo com a ordem de parto e a produção de leite na lactação anterior, para as vacas multíparas. O experimento teve duração de 67 dias. Após o parto, as vacas foram distribuídas de forma aleatória para uma das quatro dietas e permaneceram nos mesmos tratamentos até os 67 dias em lactação (DEL). Os animais foram manejados observando as normas de boa conduta ética no uso de animais para experimentação.

Como fonte rica em ácido graxo oleico foi utilizado o óleo de amendoim e de ácido graxo linoleico o óleo de girassol. O óleo de amendoim utilizado continha, expresso em percentual do total de ácidos graxos, 76,9 g/kg de 16:0; 27,3 g/kg de 18:0; 600 g/kg de *cis*9-18:1; 188 g/kg de *cis*9,*cis*12-18:2; 0,70 g/kg de *cis*9,*cis*12,*cis*15-18:3; 12,6 g/kg de 20:0 e 94,5 g/kg de outros ácidos graxos. O óleo de girassol utilizado continha 50,9 g/kg de 16:0; 37,9 g/kg de 18:0; 277 g/kg de *cis*9-18:1; 567 g/kg de *cis*9,*cis*12-18:2; 1,70 g/kg *cis*9,*cis*12,*cis*15-18:3; 2,73 g/kg de 20:0 e 62,7 g/kg de outros ácidos graxos (Método 5509 - ISO (1978)).

Foram utilizados os tratamentos (1) concentrado padrão sem adição de óleo (CONT); (2) concentrado mais de 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim (AME); (3) concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol (GIR) e (4) concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol (MIX) para simular um óleo com razão equilibrada entre oleico: linoleico (63,9 g/kg de 16:0; 32,5 g/kg de 18:0; 439,1 g/kg de *cis*9-18:1; 377,9 g/kg de *cis*9,*cis*12-18:2; 1,20 g/kg de *cis*9,*cis*12,*cis*15-18:3; 7,70 g/kg de 20:0 e 77,4 g/kg de outros ácidos graxos). Os concentrados foram compostos por milho moído, farelo de soja, farelo de algodão, bicarbonato de sódio e suplemento mineral vitamínico, formulado para atender 50% exigências nutricionais de vacas em lactação de acordo com o NRC (2001). Para equilibrar os níveis de proteína bruta e a energia líquida de lactação entre o tratamento controle e os que receberam óleo (AME, GIR e MIX), o milho moído e o farelo de soja foram substituídos parcialmente pelo farelo de algodão nestes últimos.

O concentrado foi fornecido em duas refeições iguais (08:00 e 16:30 horas) em cochos individuais após as ordenhas. Inicialmente foram fornecidos 7,0 kg de concentrado com base na MS e acrescido de 1,0 kg de concentrado com base na MS para cada 2,5 kg de leite produzido acima dos 20 kg/dia. Para garantir o consumo total da quantidade de óleo a suplementar, este foi ofertado apenas na refeição da manhã, misturado a pequena quantidade de concentrado, esperando o animal consumir esta pequena porção para então, fornecer o restante do concentrado.

As vacas tiveram como fonte de volumoso, pasto de capim-tanzânia em área de 5,0 ha, subdividida em 12 piquetes, que é adubado anualmente com ureia e cloreto de potássio (N-P-K, 20-0-20 kg/ha) após a saída dos animais do piquete. Foi adotado o sistema de pastejo rotacionado e as vacas tiveram acesso a cada piquete quando a altura média do dossel alcançou 100 cm e foram retiradas quando a altura atingiu 30 cm. O

tempo médio de permanência em cada piquete foi de um dia e meio. A taxa de lotação durante o período experimental foi de 33,2 UA/ha/dia.

As vacas foram ordenhadas às 06 e 16 horas e o registro da produção foi feito diariamente. Amostras de leite foram colhidas de duas ordenhas subsequentes aos 30 e 60 DEL para determinação da composição de ácidos graxos e estabilidade oxidativa. Estas foram compostas de acordo com a produção correspondente, armazenadas e imediatamente congeladas a -20°C. Para estimar a produção de dienos conjugados (DC), força de redução aos íons férricos (PRed) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), as amostras de leite foram armazenadas em frascos contendo azida sódica (0,2 g/kg).

Amostras adicionais de leite foram colhidas aos $61 \pm 4,2$ DEL para extração de células somáticas para análise da abundância relativa de RNAm de enzimas antioxidantes e relacionadas ao metabolismo lipídico (Hayashi et al. 2004). Após prévia lavagem do úbere, *pré-dipping*, secagem com papel toalha e antissepsia com álcool a 70° (v/v), 300 mL de leite foram colhidos manualmente em frascos com tampa rosqueável, estéreis e previamente identificados. As amostras de leite foram imediatamente lavadas com solução salina estéril (PBS, pH 7,4) e centrifugadas ($10.000 \times g$ por 15 min a 4°C) em três ciclos e o *pellet* de células congelado a -80°C para posterior análise.

Amostras de sangue foram colhidas nos 31° e 61° DEL em tubos contendo heparina sódica para a determinação dos metabólitos sanguíneos (glicose, triglicerídeos, colesterol, N-ureico, β -hidroxibutirato e ácidos graxos não esterificados). As amostras de plasma foram isoladas do sangue por centrifugação a $1.800 \times g$ por 15 minutos a 4°C e armazenadas a -20° para análises posteriores.

Os frascos com leite e o sangue foram enviados sob refrigeração em caixas térmicas ao Laboratório de Fisiologia Animal/FZEA/USP, para processamento das amostras.

Análises químicas

Para estimar a composição de ácidos graxos do leite, a gordura foi separada por centrifugação, conforme a descrição feita por Murphy et al. (1995) e os ácidos graxos foram metilados de acordo com o método 5509 da ISO (1978) usando KOH/metanol (Synth, São Paulo, Brazil) e n-heptano (Vetec, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram quantificados em cromatógrafo gasoso (Trace GC

Ultra, Thermo Scientific, West Palm Beach, Florida, USA) auto-amostrador, equipado com detector de ionização de chama a 240°C e coluna capilar de sílica fundida (100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 µm, Restek 2560). O fluxo de gases foi de 1,5 mL/min de H₂ (gás de arraste), 30 mL/min para N₂ (gás auxiliar) e 35 e 350 mL/min, respectivamente, para o H₂ e ar sintético (gases para chama). A temperatura inicial da coluna foi estabelecida em 65°C, mantida por 8 minutos, elevada a 170°C a taxa de 50°C/min, mantida por 40 minutos, chegando a 240°C de temperatura final, sendo elevada a taxa de 50°C/min e mantida por 28,5 minutos. A quantificação dos ácidos graxos da amostra foi efetuada por comparação com o tempo de retenção de ésteres metílicos de ácidos graxos de amostras padrões (Sigma Aldrich).

A força de redução aos íons férricos (PRed) foi determinada conforme descrito por Zhu et al. (2002) com algumas modificações: as proteínas do leite foram precipitadas pela adição de 1,0 mL de solução de ácido tricloroacético (20%; v/v) em 1,0 mL de leite. A mistura foi agitada por 10 minutos e centrifugada a 1.058 × g por 10 min a 20°C. Em tubos protegidos da luz, uma alíquota do soro do leite (1,0 mL) foi misturada a 2,5 mL de solução tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,0) e 2,5 mL de ferricianeto de potássio [K₃Fe(CN)₆] (1,0%). A absorbância foi medida a 700 nm em um espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA). Os resultados foram expressos em concentração de equivalente ácido gálico (EAG µg/mL).

A produção de dienos conjugados (DC) no leite foi avaliada pela técnica descrita por Kiokias et al. (2006) com algumas modificações: as amostras (50 µL) foram acrescidas de 2,5 mL de uma solução de iso-octano/2-propanol (2:1 v v⁻¹) e misturadas por 10 segundos. Em seguida as amostras foram filtradas (filtros de membrana 0,22 µm PTFE). A absorbância foi medida a 232 nm usando um espectrofotômetro Evolution 300 (Thermo Scientific, EUA). A produção de dieno conjugado foi calculada como segue: CD (mmol/kg de gordura) = (A/27)/[(a*b)/100000*(c + b/1000)]; em que A = absorbância a 232 nm; a = proporção de gordura no leite (g/100 g); b = volume da amostra (µL); e c = volume da mistura (mL).

Para a análise de TBARS no leite, uma alíquota de 500 µL do leite foi transferida para tubos falcon de 15 mL contendo 2,0 mL de solução de Ácido tiobarbitúrico (TBA 1%, TCA 15% e HCl 562,5 mM). As amostras foram aquecidas em banho fervente (100°C) durante 15 minutos, esfriadas em água gelada durante cinco minutos e depois levadas ao espectrofotômetro para leitura a 532 nm. Os resultados foram expressos em concentração de malondialdeído (mmol/mL).

As concentrações plasmáticas de glicose, triglicerídeos, colesterol, N ureico, β -hidroxibutirato (β -OHB) e ácidos graxos não esterificados (AGNE) foram estimadas pelo método enzimático colorimétrico, utilizando kits comerciais (Glicose enzimática líquida, Doles®; Triglicérides enzimático líquido, Doles®; Colesterol 250, Doles®; Ureia 500, Doles®; EnzyChrom™ Ketone Body Assay e EnzyChrom™ Free Fatty Acid Assay, respectivamente) de acordo com as informações técnicas dos fabricantes.

A extração do RNA total a partir das células de descamação e a síntese de DNAc foram obtidas como descrito previamente por (Labrecque et al. 2009). A integridade quantidade e a pureza do RNA extraído foram avaliadas usando um NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc.) fluorímetro Qubit (Invitrogen). Os genes controle foram o β -ACTINA e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e os genes alvo ácido graxo sintetase (FASN), lipoproteína lipase (LPL), esteroil CoA dessaturase (SCD), acetil CoA carboxilase (ACACA), fator de ligação ao elemento regulatório de Esterol 1 (SREBF-1), receptor ativado por proliferadores do peroxissoma alfa (PPAR α), catalase (CAT), superóxido dismutase 1 (SOD1) e glutathiona peroxidase 1 (GPX1) (Tabela 2). A amplificação, detecção e análise de dados foram realizadas por PCR-RT utilizando o equipamento termociclador StepOnePlus (Applied Biosystems).

Todos os primers (Tabela 1) usados na análise foram derivados do genoma de *Bos taurus* (GenBank) e foram acessados usando o Primer Express *software* 3.0 (PE Applied BioSystems). O volume da reação de PCR foi 20 μ L, composto de 1,0 μ L de cDNA, 0,4 μ M de cada oligonucleotídeo iniciador e 10 μ L Sybr Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e completado com H₂O livre de RNases e DNases. As condições de amplificação foram 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 60 segundos a 60°C. Cada amostra foi analisada em duplicata. Os dados foram analisados usando o método comparativo Ct, em que a quantidade de genes alvo normalizado para os genes controle e em relação a um calibrador (valor individual conhecido) é calculado como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ conforme Livak e Schmittgen (2001). A especificidade da reação foi confirmada pela curva de dissociação de cada fragmento amplificado e o tamanho do fragmento por eletroforese em gel de agarose corado com Sybr® Safe (Invitrogen, Carlsbad, CA). Os resultados para expressão gênica foram expressos em abundância relativa (AR) de RNAm.

Análise estatística

Os dados de composição de ácidos graxos da gordura do leite, capacidade antioxidante e metabólitos sanguíneos foram analisados como medidas repetidas no tempo, considerando como efeitos fixos o tratamento, DEL e interação tratamento \times DEL em um delineamento em blocos ao acaso pelo procedimento PROC MIXED do logiciário estatístico SAS (2000), seguindo o modelo matemático:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + D_j + (T \times D)_k + B_l + e_{ijkl}$$

em que Y_{ijk} é a variável dependente, μ é a média geral, T_i é efeito fixo de tratamento ($i = 1$ a 4), D_j é o efeito fixo dos dias em lactação ($j = 30$ a 60), $(T \times D)_k$ é a interação entre tratamento e dias em lactação, B_l para efeito de bloco e e_{ijkl} é o erro aleatório do resíduo.

Valores dos ajustes estatísticos para *Akaike's information criterion* (AIC) e *Akaike's information criterion corrected* (AICC) foram usados para determinar a estrutura de covariância mais apropriada. As médias foram geradas pelo LSMEANS e comparadas pelo teste Tukey, sendo declaradas diferentes quando $P \leq 0,05$ e tendência $0,05 > P \leq 0,10$.

Os dados de abundância relativa de RNAm de genes lipogênicos e antioxidantes foram realizados em apenas um período, não os considerando como medidas repetidas. O modelo incluiu o efeito fixo de tratamento e o efeito aleatório de blocos, seguindo o modelo matemático:

$$Y_i = \mu + T_i + B_j + e_{ij}$$

em que Y_i é a variável dependente, μ é a média geral, T_i é efeito fixo de tratamento ($i = 1$ a 4), B_j o efeito de bloco e e_{ij} é o erro aleatório do resíduo.

Resultados

Houve efeito de interação tratamento \times DEL para as proporções dos ácidos graxos 12:0, 14:0, *cis*9,*cis*12-18:2, *trans*9, *trans*12-18:2, *cis*9,*cis*12,*cis*15-18:3, *cis*6,*cis*9,*cis*12-18:3, *cis*11,*cis*14,*cis*17-20:3, ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), média (AGCM) e longa (AGCL), somatório de $n-3$ ($\Sigma n-3$), razão $n-6:n-3$ e índice promotor de saúde (IPS) (Figura 1). As diferentes fontes lipídicas influenciaram a composição de ácidos graxos da gordura do leite (Tabela 2). Os tratamentos AME e GIR aumentaram a proporção de

18:0, enquanto os tratamentos AME e MIX aumentaram as proporções de *cis e trans*9-18:1. Os tratamentos CONT e AME aumentaram a proporção *cis*5,*cis*8,*cis*11,*cis*14-20:4. Maior proporção de ácidos graxos saturados (AGS) foi observada nos tratamentos CONT e GIR. No tratamento GIR observou-se redução na proporção de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e aumento na proporção de outros ácidos graxos e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI). Houve tendência ($p = 0,10$) à maior proporção de ácido eicosapentaenoico (EPA) com o tratamento AME e tendência ($p = 0,09$) à menor proporção de ácido docosahexaenóico (DHA) com o tratamento GIR. De 30 para 60 DEL aumentaram as proporções AGS (617 vs. 639 g/kg) e houve tendência ($p = 0,09$) à redução na proporção de AGPI (35,5 vs. 29,4 g/kg).

Não houve interação tratamento \times DEL para as concentrações de DC, TBARS e PRed (Tabela 3). Não houve efeito da suplementação com diferentes óleos sobre a concentração de TBARS e PRed. Maior produção DC ($p = 0,0001$) foi observada no tratamento GIR, com menor produção nos tratamentos CONT e AME. Com 50% de ambos os óleos, o tratamento MIX apresentou produção de DC intermediária aos tratamentos AME e GIR.

Não houve interação tratamento \times DEL para os metabólitos sanguíneos avaliados (Tabela 4). As concentrações plasmáticas de triglicerídeos, glicose, proteína, creatinina e ureia foram similares entre os tratamentos. Menores concentrações de AGNE ($p = 0,03$) e β -OHB ($p = 0,03$) foram observadas com o tratamento GIR. Vacas suplementadas com óleo apresentaram maiores ($p = 0,04$) concentrações plasmáticas de Colesterol total. De 30 para 60 DEL verificou-se aumento nas concentrações de β -OHB ($p = 0,04$; 321 vs. 386 μ M) e Colesterol total ($p = 0,0006$; 140 vs. 168 mg/dL) e redução dos AGNE ($p = 0,02$; 34,2 vs. 26,0 μ M).

A abundância relativa de RNAm para o gene que codifica o SREBF-1 foi similar entre os tratamentos (Tabela 5). Maior abundância relativa de RNAm para a enzima FASN ($p = 0,03$) foi observada com no tratamento MIX. Maior abundância relativa de RNAm para a enzima SCD ($p = 0,0008$) foi observada com o tratamento AME e MIX e menor com o GIR. Maior proporção de ácido graxo linoleico na fonte lipídica (MIX e GIR) aumentou a abundância relativa de ACACA ($p = 0,04$). Houve tendência ($p = 0,06$) à maior abundância relativa de RNAm para a enzima LPL com o tratamento MIX e menor com o GIR e tendência ($p = 0,10$) à redução da abundância relativa de PPAR α com o tratamento MIX. A abundância relativa de RNAm da enzima CAT foi similar entre os tratamentos. Maior abundância relativa para SOD1 ($p = 0,002$) foi observada

com os tratamentos CONT e AME com abundância relativa similar entre GIR e MIX. Houve tendência ($p = 0,058$) à redução da abundância relativa da enzima GPX1 com a suplementação com óleo.

Discussão

A suplementação com óleos com diferentes proporções de ácidos graxos oleico e linoleico modificaram a composição de ácidos graxos do leite e corrobora como em estudos prévios de Kelly et al. (1998) e Dai et al. (2011) que também suplementaram vacas leiteiras com óleos de amendoim e girassol. Maior proporção de 12:0, 14:0 e 16:0, ácidos graxos considerados hipercolesterolêmicos (Kennelly 2001) e responsáveis por reduzir o índice promotor da saúde (IPS) foram observados no tratamento CONT principalmente aos 30 DEL. Aos 60 DEL há, concomitantemente, a redução na proporção destes ácidos graxos no CONT e aumento nos tratamentos GIR e MIX. O tratamento AME manteve até os 60 DEL as menores proporções de 12:0, 14:0 e 16:0, o que contribuiu para o maior IPS deste tratamento quando comparado aos demais.

O tratamento AME aumentou a proporção de $n-9$ no leite, principalmente *cis9* e *trans9-18:1*, confirmando os estudos *in vitro* de Mosley et al. (2002). A alta proporção de oleico no óleo de amendoim, aliada a biohidrogenação deste ácido graxo no rúmen, também contribuiu para aumentar a proporção de 18:0 na gordura do leite com o tratamento AME. Por outro lado, os tratamentos GIR e MIX, com alta proporção de ácido graxo linoleico, foram mais efetivos em aumentar a proporção de $n-6$, principalmente os ácidos graxos *cis9,cis12-18:2* e *trans9,trans12-18:2*.

Mesmo com baixa proporção em 18:2 a suplementação com óleo de amendoim apresentou proporções de *cis9,cis12-18:2* e *trans9,trans12-18:2* aos 60 DEL, de *cis9,cis12,cis15-18:3* e razão $n-6:n-3$ aos 30 e 60 DEL semelhante ao tratamento GIR. Ainda, o tratamento AME apresentou maiores proporções de *cis6,cis9,cis12-18:3* e de ácidos graxos $n-3$ ($\sum n-3$) aos 30 DEL e proporção de $n-3$ igual aos demais tratamentos aos 60 DEL. A razão $n-6:n-3$ foi maior no tratamento MIX aos 30 DEL e semelhante entre os tratamentos aos 60 DEL. Esta proporção semelhante e por vezes superior de AGPI com a suplementação com o óleo de amendoim pode estar relacionada à atividade da enzima SCD na glândula mamária. A enzima SCD ($\Delta-9$ dessaturase) atua na dessaturação dos ácidos graxos saturados inserindo uma dupla ligação na cadeia de ácido graxo entre os átomos de carbono número 9 e número 10 e possui como substratos

preferenciais os ácidos 16:0, 18:0 e 18:1 (Shingfield et al. 2010). Assim, a maior proporção de 18:1 no AME aliada à baixa taxa de biohidrogenação ruminal do 18:1 (Beam et al. 2000) pode ter resultado em aumentados acúmulo e fluxo deste ácido graxo para ser absorvido e posteriormente dessaturado a 18:2 pela atuação da SCD na glândula mamária. No entanto, não há relatos na literatura sobre a dessaturação de 18:1 até 18:3 pela atividade da enzima SCD na glândula mamária que justifique maior proporção de *cis*6,*cis*9,*cis*12-18:3 e $\sum n-3$ aos 30 DEL no AME.

Em função da composição em ácidos graxos dos óleos utilizados no concentrado, o tratamento GIR foi mais eficiente em aumentar a proporção de AGPI na gordura do leite, enquanto os tratamentos AME e MIX aumentaram a proporção de AGMI. Estes resultados estão de acordo aos observados por Kelly et al. (1998) e Dai et al. (2011) que também suplementaram vacas em lactação com óleos de amendoim e girassol. Os AGS aumentaram enquanto os AGPI reduziram com o avanço da lactação. Como a ingestão de AGPI traz benefícios à saúde humana (Cicero et al. 2012), o aumento na proporção de AGS e tendência à redução na proporção de AGPI, houve redução da qualidade nutracêutica do leite de 30 para 60 DEL.

A composição dos ácidos graxos do leite quanto ao tamanho da cadeia e ao grau de instauração também foi influenciado simultaneamente pela dieta e dias em lactação. Os AGCC foram fortemente influenciados pelos DEL. A proporção destes dobrou na gordura do leite de 30 para 60 DEL com a suplementação lipídica. De acordo com Palmquist et al. (1993) a composição de ácidos graxos da gordura do leite é fortemente influenciado pelos DEL. No início da lactação os ácidos graxos de cadeia curta estão reduzidos e aumentam até as semanas 8 (60 DEL) e 10 da lactação, resultado semelhante ao encontrado em nossa pesquisa. Já os AGCM e AGCL foram influenciados principalmente pela dieta. De forma geral, maior proporção de AGCM foram observados nos tratamentos CONT e GIR e maiores proporções de AGCL foram observados nos tratamentos AME e MIX. Fato que pode estar relacionado à maior proporção de ACGL no óleo de amendoim quando comparado ao de girassol.

A modificação da composição lipídica da gordura do leite com a suplementação teve impactos sobre a estabilidade oxidativa do leite. A maior concentração de AGPI no leite com o fornecimento de GIR resultou em maiores produções de dienos conjugados, que são produtos primários da oxidação lipídica (Halliwell e Gutteridge 2007). Simulando um óleo com proporção oleico: linoleico equilibrada, o tratamento MIX apresentou resposta intermediária aos tratamentos AME e GIR quanto à produção de

DC. De acordo com Chen et al. (2004) e Bobe et al. (2007), maiores proporções de AGPI tornam o leite mais susceptível à oxidação lipídica. Com menor proporção de AGPI no leite, o AME pouco contribuiu para reduzir a estabilidade oxidativa do leite, com resultado semelhante ao tratamento controle, sem adição de óleo. Estes resultados confirmam a menor susceptibilidade à oxidação dos AGMI. Quanto maior o número de duplas ligações presentes em um ácido graxo, mais fácil é a remoção de átomos de hidrogênio e, conseqüentemente, mais fácil é a formação de radicais livres (Lima e Abdalla 2001).

A suplementação lipídica aumentou a concentração de colesterol total, resultado comum observado em vacas suplementadas com fontes de lipídios (Grummer e Carroll 1991). De acordo com Rindsig e Schultz (1974), aumento da concentração do colesterol no plasma é necessária para suportar o transporte de grandes quantidades circulantes AGPI e lipídios totais.

Vacas do tratamento GIR apresentaram significativamente menores concentrações plasmáticas de AGNE e β -OHB comparativamente aos demais tratamentos. As concentrações de AGNE refletem a magnitude da lipólise dos triglicerídeos armazenados no tecido adiposo e sua concentração aumenta à medida que aumenta a mobilização da gordura corporal (LeBlanc 2010). No início da lactação, quando o consumo está reduzido, ocorre intensa mobilização de reservas corporais para manter a energia necessária para suportar a alta produção de leite (Contreras e Sordillo 2011). No fígado os AGNE podem ser parcialmente oxidados via β -oxidação em β -OHB, um corpo cetônico que pode ser utilizado como fonte energética (Palmquist e Mattos 2006). Desta forma, baixas concentrações de AGNE e β -OHB indicam menor mobilização de reservas corporais em vacas do tratamento GIR.

De acordo com Palmquist e Mattos (2006) o β -OHB é a unidade preferencial utilizada no alongamento das cadeias carbônicas para formação dos ácidos graxos do leite. Assim, a baixa concentração de β -OHB no plasma, somada à baixa abundância relativa de RNAm da enzima FASN, justificam a redução da gordura do leite de vacas do tratamento GIR (Artigo 1).

A redução na concentração de AGNE de 30 para 60 DEL sugere menor mobilização de reservas para atender à produção de leite e/ou maior taxa de oxidação destes a β -OHB, já que foi observado aumento na concentração deste último para o mesmo período. O aumento nas concentrações de β -OHB aos 60 DEL também justifica o aumento da concentração de ácidos graxos de cadeia curta aos 60 DEL. Segundo

Palmquist et al. (1993) os AGCC são formados por unidades pré-formadas de unidades de 4 carbonos como o β -OHB.

Em concordância com outros estudos (Wahle et al. 2003; Kadegowda et al. 2009) dieta rica em ácido graxo linoleico modulou a expressão de genes lipogênicos. Em nossa pesquisa, vacas do tratamento GIR apresentaram, concomitantemente, menores teor de gordura no leite e abundância dos genes que codificam as enzimas FASN e SCD. Esse fenômeno fisiológico é causado pela formação de isômeros *trans*, principalmente o *trans*10,*cis*12-18:2 CLA, durante a biohidrogenação dos ácidos graxos 18:2 no rúmen (Baumgard et al. 2000). Baumgard et al. (2002) observaram em vacas, redução da expressão de RNAm de enzimas lipogênicas em até 54% após a infusão via abomaso de 13,6 g/dia de *trans*10,*cis*12-18:2 CLA purificado. O mecanismo pelo qual os ácidos graxos *trans* inibem a síntese de gordura do leite inclui a redução na expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na absorção e transporte de ácidos graxos circulantes, síntese de *novo* e dessaturação de ácidos graxos e síntese de triglicerídeos (Baumgard et al. 2002).

No entanto, maior proporção de ácido graxo linoleico na dieta (GIR e MIX) aumentou a abundância relativa de RNAm da ACACA que é responsável por transformar acetato em malonil-CoA, uma etapa limitante na síntese de gordura do leite. Desta forma, a redução da síntese de gordura do leite observada no tratamento GIR talvez não tenha sido limitada pela atividade a enzima ACACA em formar substratos iniciais para formar a gordura do leite e sim pela baixa atividade das enzimas FASN, responsável por alongar as cadeias de ácidos graxos em formação, e SCD (Chilliard et al. 2007). Como não foi observado redução da abundância relativa de RNAm para as enzimas FASN e SCD em vacas que receberam o tratamento MIX, estas mantiveram os teores de gordura semelhantes aos tratamentos CONT e AME.

Dietas com menor proporção de ácido graxo linoleico (AME e MIX) aumentaram a atividade da enzima SCD o que justifica a menor proporção de AGS na gordura do leite de vacas destes tratamentos comparativamente ao CONT e GIR. Curiosamente a proporção equilibrada entre oleico: linoleico no tratamento MIX teve efeito positivo sobre a expressão gênica das enzimas lipogênicas, exceto para a expressão do gene PPAR α , que apresentou tendência à redução. Para este tratamento, talvez a quantidade fornecida de linoleico não foi suficiente para reduzir a expressão dos genes lipogênicos, sugerindo um efeito dose dependente como relatado por Shingfield et al. (2010) em revisão sobre o papel dos ácidos graxos *trans* na regulação nutricional da lipogênese

mamária em ruminantes. De acordo com estes autores infusões de *trans*10,*cis*12 CLA em quantidades de 1,25 a 5,0 g/dia tipicamente resulta em diminuição na síntese de ácidos graxos muitas vezes na ausência de alterações na SCD e quantidades de 7,0 a 14,0 g/dia provocam desproporcionalmente grande redução na secreção de ácidos graxos sintetizados na síntese *de novo*, efeito que também é acompanhado por diminuições significativas nos índices de SCD. Ao avaliar diferentes razões oleico/linoleico na dieta de vacas leiteiras, He et al. (2012) relataram que dietas com maior proporção de ácido graxo linoleico são mais efetivas em deprimir a gordura do leite comparada à com maior proporção de ácido graxo oleico.

O sistema antioxidante natural também foi modulado pela suplementação com os óleos. Enquanto a abundância relativa de RNAm da enzima CAT não foi afetada pela suplementação lipídica, menores abundâncias de RNAm da enzima SOD1, que é responsável pelo sequestro de radicais livres durante o estresse oxidativo, foram observadas nos tratamentos com maior proporção de ácido graxo linoleico, GIR e MIX. Ainda, a suplementação com ácidos graxos insaturados tendeu a reduzir a expressão de GPX1 independente do grau de instauração da fonte utilizada. Embora a base fisiológica para esta resposta não seja totalmente compreendida, a suplementação com AGPI pode resultar em falha do sistema antioxidante endógeno que previne contra a peroxidação lipídica. Cortes et al. (2012) relataram que a infusão abomasal com óleo rico em ácido graxo linolênico reduziu a abundância de RNAm de catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX1 e GPX3) e superóxido dismutase (SOD3) no tecido mamário de vacas em lactação. No entanto, De Marchi et al. (2015) relataram tendência ao aumento da expressão do gene que codifica a enzima SOD2 com infusão abomasal de óleo de girassol em vacas em lactação. Os efeitos de AGPI sobre os genes que codificam enzimas antioxidantes ainda são inconsistentes e demonstram que estes podem aumentar ou diminuir as atividades das enzimas antioxidantes em diferentes tecidos (Cortes et al. 2012). Mais estudos são necessários para avaliar o efeito da suplementação com diferentes fontes de ácidos graxos sobre a expressão de genes que codificam as enzimas do sistema antioxidante endógeno e o impacto desta modulação sobre o estresse oxidativo de vacas em início de lactação.

Conclusões

A suplementação com óleo rico em ácido linoleico é mais eficiente em aumentar a proporção de AGPI da gordura do leite. Como consequência disso, reduz a estabilidade oxidativa do leite. Dieta rica em ácido graxo linoleico altera a expressão gênica de enzimas lipogênicas resultando em redução da gordura do leite. A suplementação com óleo rico em ácido graxo oleico aumenta o índice promotor da saúde por aumentar a proporção de AGMI e AGPI *n*-3 ao leite sem, no entanto, ter efeitos negativos sobre a expressão gênica de enzimas lipogênicas e antioxidantes e a estabilidade oxidativa da gordura do leite. A suplementação com óleos insaturados, principalmente rico em ácido graxo linoleico, tem impacto sobre o sistema antioxidante endógeno por reduzir a expressão das enzimas GPX1 e SOD1.

Referências

- Alia, M.; Horcajo, U.; Bravo, L.; Goya, L., 2003: Effect of grape antioxidant dietary fiber on the total antioxidant capacity and the activity of liver antioxidant enzymes in rats. *Nutrition Research* **23**, 1251-1267.
- Baumgard, L.H.; Corl, B.A.; Dwyer, D.A.; Bauman, D.E., 2002: Effects of conjugated linoleic acids (CLA) on tissue response to homeostatic signals and plasma variables associated with lipid metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Animal Science* **80**, 1285-1293.
- Baumgard, L.H.; Corl, B.A.; Dwyer, D.A.; Saebo, A.; Bauman, D.E., 2000: Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **278**, R179-184.
- Beam, T.M.; Jenkins, T.C.; Moate, P.J.; Kohn, R.A.; Palmquist, D.L., 2000: Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *Journal of Dairy Science* **83**, 2564-2573.
- Bernabucci, U.; Ronchi, B.; Lacetera, N.; Nardone, A., 2005: Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* **88**, 2017-2026.
- Bobe, G.; Zimmerman, S.; Hammond, E.G.; Freeman, A.E.; Porter, P.A.; Luhman, C.M.; Beitz, D.C., 2007: Butter composition and texture from cows with different milk fatty acid compositions fed fish oil or roasted soybeans. *Journal of Dairy Science* **90**, 2596-2603.
- Carocho, M.; Ferreira, I.C., 2013: A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* **51**, 15-25.
- Chen, S.; Bobe, G.; Zimmerman, S.; Hammond, E.G.; Luhman, C.M.; Boylston, T.D.; Freeman, A.E.; Beitz, D.C., 2004: Physical and sensory properties of dairy products from cows with various milk fatty acid compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**, 3422-3428.

- Chilliard, Y.; Glasser, F.; Ferlay, A.; Bernard, L.; Rouel, J.; Doreau, M., 2007: Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology* **109**, 828-855.
- Cicero, A.F.; Reggi, A.; Parini, A.; Borghi, C., 2012: Application of polyunsaturated fatty acids in internal medicine: beyond the established cardiovascular effects. *Archives of Medical Science* **8**, 784-793.
- Contreras, G.A.; Sordillo, L.M., 2011: Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* **34**, 281-289.
- Cortes, C.; Kazama, R.; da Silva-Kazama, D.; Benchaar, C.; Zeoula, L.M.; Santos, G.T.; Petit, H.V., 2011: Digestion, milk production and milk fatty acid profile of dairy cows fed flax hulls and infused with flax oil in the abomasum. *The Journal of Dairy Research* **78**, 293-300.
- Cortes, C.; Palin, M.F.; Gagnon, N.; Benchaar, C.; Lacasse, P.; Petit, H.V., 2012: Mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes and concentration of the mammalian lignan enterolactone in milk and plasma of dairy cows fed flax lignans and infused with flax oil in the abomasum. *British Journal of Nutrition* **108**, 1390-1398.
- Côrtes, C.; Palin, M.F.; Gagnon, N.; Benchaar, C.; Lacasse, P.; Petit, H.V., 2012: Mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes and concentration of the mammalian lignan enterolactone in milk and plasma of dairy cows fed flax lignans and infused with flax oil in the abomasum. *The British Journal of Nutrition* **108**, 1390-1398.
- Dai, X.J.; Wang, C.; Zhu, Q., 2011: Milk performance of dairy cows supplemented with rapeseed oil, peanut oil and sunflower seed oil. *Czech Journal of Animal Science* **56**, 181-191.
- De Marchi, F.E.; Palin, M.F.; dos Santos, G.T.; Lima, L.S.; Benchaar, C.; Petit, H.V., 2015: Flax meal supplementation on the activity of antioxidant enzymes and the expression of oxidative stress- and lipogenic-related genes in dairy cows infused with sunflower oil in the abomasum. *Animal Feed Science and Technology* **199**, 41-50.
- Gobert, M.; Martin, B.; Ferlay, A.; Chilliard, Y.; Graulet, B.; Pradel, P.; Bauchart, D.; Durand, D., 2009: Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n-3 polyunsaturated fatty acids. *Journal of Dairy Science* **92**, 6095-6104.
- Grummer, R.R.; Carroll, D.J., 1991: Effects of dietary fat on metabolic disorders and reproductive performance of dairy cattle. *Journal of animal science* **69**, 3838-3852.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C., 2007: *Free radicals in biology and medicine*. 4th edn. Oxford University Press, Oxford ; New York.
- Havemose, M.S.; Weisbjerg, M.R.; Bredie, W.L.P.; Poulsen, H.D.; Nielsen, J.H., 2006: Oxidative Stability of Milk Influenced by Fatty Acids, Antioxidants, and Copper Derived from Feed. *Journal of Dairy Science* **89**, 1970-1980.
- Hayashi, A.; McCoard, S.; Roy, N.; Barnett, M.; Mackenzie, D.; McNabb, W., 2004: Gene expression in bovine mammary somatic cells isolated from milk. *Journal of Animal and Feed Sciences* **13**, 401-404.
- He, M.; Perfield, K.L.; Green, H.B.; Armentano, L.E., 2012: Effect of dietary fat blend enriched in oleic or linoleic acid and monensin supplementation on dairy cattle performance, milk fatty acid profiles, and milk fat depression. *Journal of Dairy Science* **95**, 1447-1461.
- ISO (ed.), 1978: *Animal and vegetable fats and oils – Preparation of methyl esters of fatty acids*.

- Jacobs, A.A.A.; van Baal, J.; Smits, M.A.; Taweel, H.Z.H.; Hendriks, W.H.; van Vuuren, A.M.; Dijkstra, J., 2011: Effects of feeding rapeseed oil, soybean oil, or linseed oil on stearoyl-CoA desaturase expression in the mammary gland of dairy cows. *Journal of Dairy Science* **94**, 874-887.
- Kadegowda, A.; Bionaz, M.; Piperova, L.; Erdman, R.; Loor, J., 2009: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation and long-chain fatty acids alter lipogenic gene networks in bovine mammary epithelial cells to various extents. *Journal of Dairy Science* **92**, 4276-4289.
- Kelly, M.L.; Berry, J.R.; Dwyer, D.A.; Griinari, J.M.; Chouinard, P.Y.; Van Amburgh, M.E.; Bauman, D.E., 1998: Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *The Journal of Nutrition* **128**, 881-885.
- Kennelly, J.J., 2001: The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds: Influence of feed on major components of milk. *Bulletin-International Dairy Federation*, 28-36.
- Kiokias, S.N.; Dimakou, C.P.; Tsaprouni, I.V.; Oreopoulou, V., 2006: Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. *Food Biophysics* **1**, 115-123.
- Labrecque, B.; Beaudry, D.; Mayhue, M.; Hallé, C.; Bordignon, V.; Murphy, B.D.; Palin, M.-F., 2009: Molecular characterization and expression analysis of the porcine paraoxonase 3 (PON3) gene. *Gene* **443**, 110-120.
- LeBlanc, S., 2010: Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period. *Journal of Reproduction and Development* **56**, S29-S35.
- Lima, E.; Abdalla, D., 2001: Lipid peroxidation: Mechanisms and evaluation in biological samples. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **37**, 293-303.
- Lima, L.S.; Palin, M.F.; Santos, G.T.; Benchaar, C.; Petit, H.V., 2015: Effects of supplementation of flax meal and flax oil on mammary gene expression and activity of antioxidant enzymes in mammary tissue, plasma and erythrocytes of dairy cows. *Livestock Science* **176**, 196-204.
- Livak, K.J.; Schmittgen, T.D., 2001: Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Mosley, E.E.; Powell, G.L.; Riley, M.B.; Jenkins, T.C., 2002: Microbial biohydrogenation of oleic acid to trans isomers in vitro. *Journal of lipid research* **43**, 290-296.
- Murphy, J.J.; Connolly, J.F.; McNeill, G.P., 1995: Effects on milk fat composition and cow performance of feeding concentrates containing full fat rapeseed and maize distillers grains on grass-silage based diets. *Livestock Production Science* **44**, 1-11.
- Neves, C.A.; dos Santos, W.B.R.; Santos, G.T.D.; da Silva, D.C.; Jobim, C.C.; Santos, F.S.; Visentainer, J.V.; Petit, H.V., 2009: Production performance and milk composition of dairy cows fed extruded canola seeds treated with or without lignosulfonate. *Animal Feed Science and Technology* **154**, 83-92.
- Neves, C.A.; Santos, G.T.; Matsushita, M.; Alves, E.M.; Oliveira, R.L.; Branco, A.F.; Silva, D.C.; Furlan, A.C.; Petit, H.V., 2007: Intake, whole tract digestibility, milk production, and milk composition of Holstein cows fed extruded soybeans treated with or without lignosulfonate. *Animal Feed Science and Technology* **134**, 32-44.
- NRC (ed.), 2001: *Nutrients requirements of dairy cattle*. The National Academies Press, Washington, D.C.
- Palmquist, D.L.; Beaulieu, A.D.; Barbano, D.M., 1993: Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science* **76**, 1753-1771.

- Palmquist, D.L.; Mattos, W.R.S., 2006: Metabolismo de lipídeos, In: BERCHIELLI, T.T. (ed.), *Nutrição de Ruminantes*. FUNEP, Jaboticabal. 287-310.
- Rindsig, R.B.; Schultz, L.H., 1974: Effects of Abomasal Infusions of Safflower Oil or Elaidic Acid on Blood Lipids and Milk Fat in Dairy Cows¹. *Journal of Dairy Science* **57**, 1459-1466.
- SAS, 2000: SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Shingfield, K.J.; Bernard, L.; Leroux, C.; Chilliard, Y., 2010: Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal* **4**, 1140-1166.
- Wahle, K.W.J.; Rotondo, D.; Heys, S.D., 2003: Polyunsaturated fatty acids and gene expression in mammalian systems. *Proceedings of the Nutrition Society* **62**, 349-360.
- Zhu, Q.Y.; Hackman, R.M.; Ensunsa, J.L.; Holt, R.R.; Keen, C.L., 2002: Antioxidative activities of oolong tea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**, 6929-6934.

Tabela 1 Sequência dos primer usados na amplificação do PCR de genes extraídos das células somáticas do leite

Gene*		Sequência dos oligonucleotídeos Iniciadores (5' → 3')	Código no GenBank	Frag. (pb)
<i>Controle endógeno</i>				
GAPDH	Direto	GGTGATGCTGGTGCTGAG	NM_001034034	181
	Reverso	TGACAATCTTGAGGGTGTG		
β-ACTINA	Direto	GATCTGGCACCACCTTCT	NM_173979	186
	Reverso	CCAGAGGCATACAGGGACAG		
<i>Metabolismo lipídico</i>				
ACACA	Direto	TGGTCTGGCCTTACACATGA	NM_174224	112
	Reverso	TGCTGGAGAGGCTACAGTGA		
FASN	Direto	CTGAGTCGGAGAACCTGGAG	NM_001012669	156
	Reverso	CGAAGAAGGAAGCGTCAAAC		
SREBF-1	Direto	ACCGCTCTTCCATCAATGAC	NM_001113302	120
	Reverso	GCTGAAGGAAGCGGATGTAG		
SCD	Direto	ACAATTCGCGACGTGGCTT	NM_173959	254
	Reverso	GGCATAACGGAATAAGGTGGC		
LPL	Direto	GAGCCAAAAGAAGCAGCAAG	NM_001075120	182
	Reverso	AGGCAGGGTAAAAGGGATGT		
PPAR α	Direto	GACAAAGCCTCTGGCTACCACTA	NM_001034036	80
	Reverso	TTCAGCCGAATCGTTCTCCTA		
<i>Sistema antioxidante</i>				
CAT	Direto	GCTCCAAATTACTACCCCAATAGC	NM_001035386	104
	Reverso	GCACTGTTGAAGCGCTGTACA		
SOD1	Direto	TGTTGCCATCGTGGATATTGTAG	NM_174615	102
	Reverso	CCCAAGTCATCTGGTTTTTCATG		
GPX1	Direto	GCAAGGTGCTGCTCATTGAG	NM_174076	82
	Reverso	CGCTGCAGGTCATTCATCTG		

* GAPDH, Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; ACACA, Acetil CoA carboxilase; FASN, Ácido graxo sintetase; SREBF-1, Fator de ligação ao elemento regulatório de Esterol 1; SCD, Estearoil CoA dessaturase; LPL, Lipoproteína lípase; PPAR α , receptor ativado por proliferadores do peroxissoma alfa; CAT, Catalase; SOD1, Superóxido dismutase 1; GPX1, Glutaciona peroxidase.

Tabela 2 Concentração média (g/kg de ácidos graxos totais) de ácidos graxos na gordura do leite vacas Jersey a pasto no início da lactação suplementadas com óleos de amendoim e girassol

Item §	Tratamentos *				EPM ‡	P-valor †		
	CONT	AME	GIR	MIX		Trat	DEL	Trat x DEL
12:0	23,4	15,5	21,0	18,4	0,82	0,01	0,03	0,01
14:0	92,9	68,7	88,2	82,1	2,29	0,008	0,14	0,008
16:0	248	224	255	239	4,22	0,052	0,83	0,41
18:0	207 ^b	243 ^a	227 ^{ab}	209 ^b	4,98	0,04	0,36	0,23
<i>cis</i> 9-18:1	284 ^b	319 ^a	244 ^b	318 ^a	7,27	0,0003	0,24	0,26
<i>trans</i> 9-18:1	13,5 ^c	18,3 ^a	16,7 ^b	17,3 ^{ab}	0,41	0,0001	0,86	0,90
<i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12-18:2	3,00	3,29	4,37	3,34	0,18	0,02	0,57	0,04
<i>trans</i> 9, <i>trans</i> 12-18:2	3,76	5,54	8,01	6,08	0,90	0,34	0,73	0,01
<i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12, <i>cis</i> 15-18:3	2,02	1,92	1,84	1,59	0,09	0,74	0,003	0,04
<i>cis</i> 6, <i>cis</i> 9, <i>cis</i> 12-18:3	3,11	5,02	2,84	2,98	0,24	0,003	0,46	0,04
<i>cis</i> 11, <i>cis</i> 14, <i>cis</i> 17-20:3	0,21	0,31	0,21	0,17	0,01	0,007	0,68	0,04
<i>cis</i> 8, <i>cis</i> 11, <i>cis</i> 14-20:3	0,61	1,03	0,58	0,49	0,11	0,25	0,16	0,39
<i>cis</i> 5, <i>cis</i> 8, <i>cis</i> 11, <i>cis</i> 14-20:4	0,12 ^{ab}	0,16 ^a	0,07 ^b	0,08 ^b	0,01	0,03	0,12	0,26
<i>cis</i> 5, <i>cis</i> 8, <i>cis</i> 11, <i>cis</i> 14, <i>cis</i> 17-20:5 (EPA)	0,46	0,63	0,38	0,44	0,03	0,10	0,80	0,39
<i>cis</i> 4, <i>cis</i> 7, <i>cis</i> 10, <i>cis</i> 13, <i>cis</i> 16, <i>cis</i> 19-22:6 (DHA)	0,25	0,20	0,18	0,23	0,01	0,09	0,51	0,11
Outros	96,0 ^b	83,9 ^b	116,8 ^a	85,3 ^b	3,00	0,0001	0,85	0,12
AGS	641 ^a	604 ^b	662 ^a	606 ^b	6,51	0,0008	0,04	0,14
AGMI	332 ^a	363 ^a	294 ^b	364 ^a	6,96	0,0003	0,17	0,30
AGPI	26,3 ^b	31,8 ^b	43,0 ^a	28,6 ^b	2,04	0,01	0,09	0,22
AGCC	16,3	10,4	14,3	11,5	0,84	0,28	0,0001	0,01
AGCM	435	359	430	396	7,94	0,0005	0,78	0,02
AGCL	544	629	557	593	8,44	0,03	0,93	0,02
Σ <i>n</i> -3	2,83	3,17	2,47	2,43	0,11	0,04	0,37	0,01
Σ <i>n</i> -6	12,9	16,5	15,4	14,5	1,22	0,76	0,19	0,25
Razão <i>n</i> -6: <i>n</i> -3	3,74	5,95	6,55	5,95	0,54	0,25	0,09	0,04
IPS	0,55	0,77	0,54	0,68	0,02	0,003	0,14	0,004

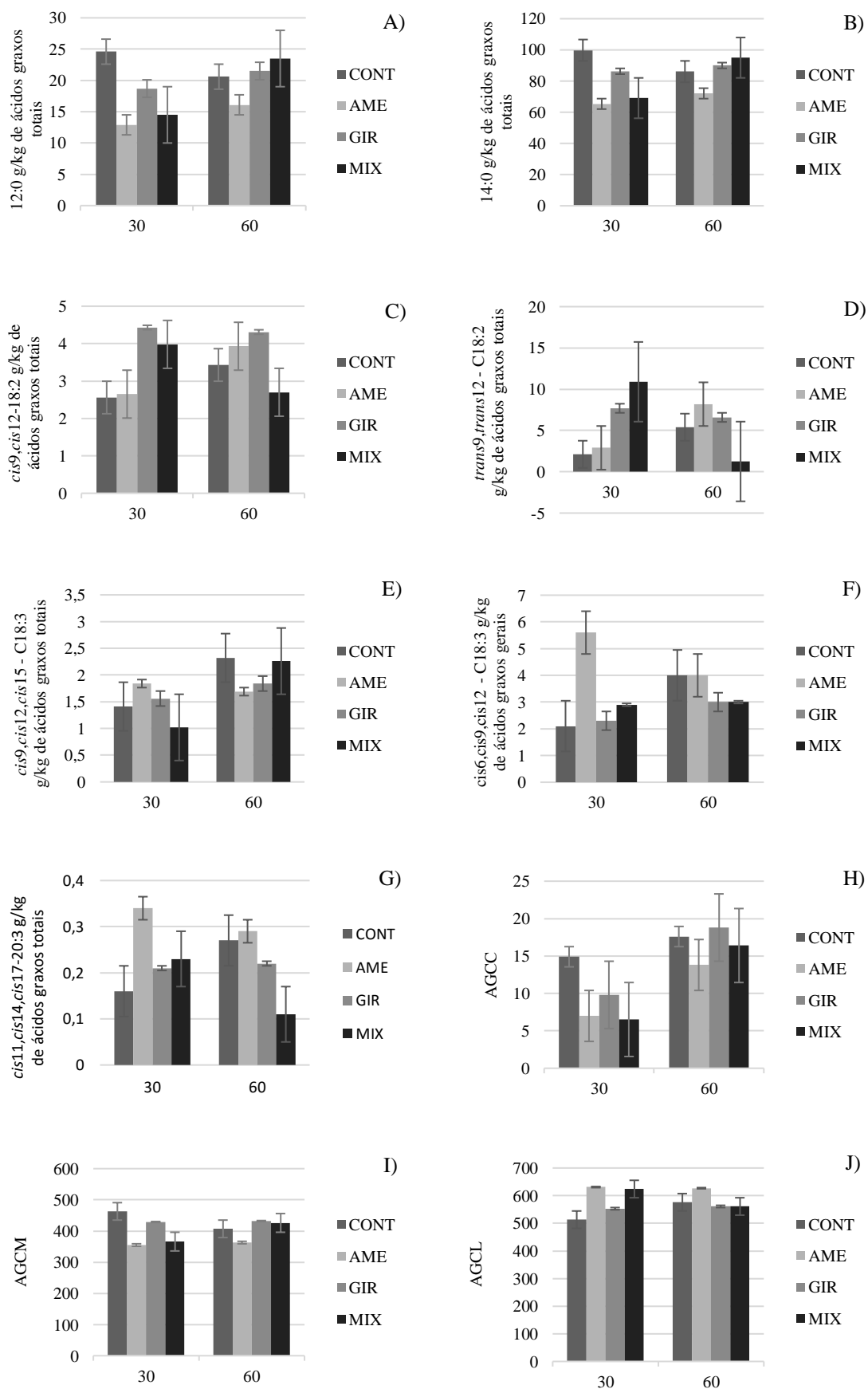
* CONT, concentrado controle sem adição de óleo; AME, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim; GIR, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol e MIX, concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol.

† Valor da Probabilidade para efeito de Tratamento (Trat); Dias em lactação (DEL) e interação tratamento × DEL (Trat × DEL).

‡ Erro padrão da média.

^{a-b} Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

§ EPA = ácido eicosapentaenóico; DHA = ácidos docosahexaenóico; AGS = ácidos graxos saturados; AGMI = ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = ácidos graxos poli-insaturados; AGCC = ácidos graxos de cadeia curta; AGCM = ácidos graxos de cadeia média; AGCL = ácidos graxos de cadeia longa; Σ*n*-3 = *cis*9,12,15-18:3 + *cis*11,14,17-20:3 + *cis*5,8,11,14,17-20:5 + *cis*4,*cis*7,*cis*10,*cis*13,*cis*16,*cis*19-22:6; Σ*n*-6 = *cis*9,12-18:2 + *cis*6,9,12-18:3 + *cis*11,14-20:2 + *cis*8,11,14-20:3 + *cis*5,8,11,14-20:4; IPS = Índice promotor da saúde [ΣAGI/(C12:0 + (2 x C14:0) + C16:0)].



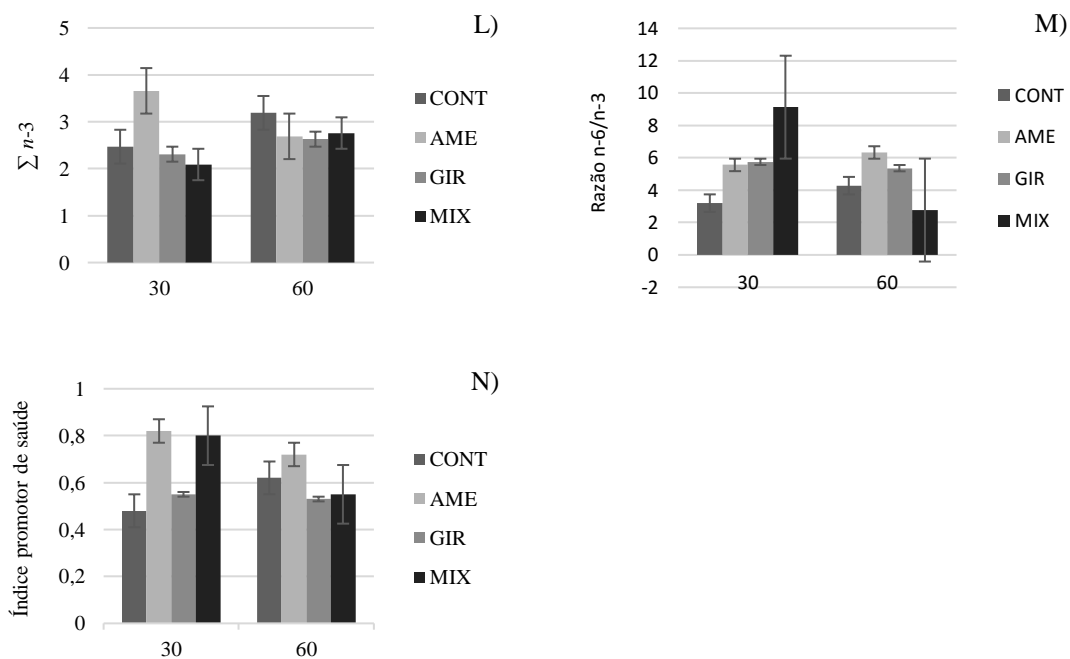


Figura 1 Interação tratamento \times DEL para concentração média (g/kg de ácidos graxos totais) de 12:0 (A), 14:0 (B), *cis*9,*cis*12-18:2 (C), *trans*9,*trans*12-18:2 (D) *cis*9,*cis*12,*cis*15-18:3 (E), *cis*6,*cis*9,*cis*12-18:3 (F), *cis*11,*cis*14,*cis*17-20:3 (G), AGCC (H), AGCM (I), AGCL (J), $\Sigma n-3$ (L), razão *n-6:n-3* (M) e índice promotor de saúde (N) da gordura do leite vacas Jersey a pasto no início da lactação recebendo concentrado controle sem adição de óleo (CONT); concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim (AME); concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol (GIR) e concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol (MIX).

Tabela 3 Produção de dienos conjugados (DC, mmol/kg de gordura), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, mmol malondialdeído equivalente/mL) e poder de redução (PRed, EAG $\mu\text{g/mL}$) no leite vacas Jersey a pasto no início da lactação suplementadas com óleos de amendoim e girassol

Item	Tratamentos *				EPM ‡	P-valor †		
	CONT	AME	GIR	MIX		Trat	DEL	Trat x DEL
DC	7,80 ^b	8,97 ^b	20,8 ^a	12,3 ^{ab}	1,15	0,0001	0,11	0,70
TBARS	20,7	19,4	21,6	19,4	0,85	0,77	0,15	0,94
PRed	35,1	34,3	33,0	39,6	1,70	0,31	0,25	0,18

* CONT, concentrado controle sem adição de óleo; AME, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim; GIR, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol e MIX, concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol.

† Valor da Probabilidade para efeito de Tratamento (Trat); Dias em lactação (DEL) e interação tratamento \times DEL (Trat \times DEL).

‡ Erro padrão da média.

^{a-b} Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 4 Metabólitos sanguíneos do plasma de vacas Jersey a pasto no início da lactação suplementadas com óleos de amendoim e girassol

Parâmetro §	Tratamentos *				EPM ‡	P-valor †		
	CONT	AME	GIR	MIX		Trat	DEL	Trat x DEL
AGNE ⁴ (µM)	35,4 ^a	33,4 ^a	20,6 ^b	31,3 ^a	1,93	0,03	0,02	0,55
β-OHB ⁵ (µM)	375 ^a	365 ^a	272 ^b	398 ^a	16,8	0,03	0,04	0,74
Colesterol (mg/dL)	135 ^b	162 ^a	164 ^a	155 ^a	4,80	0,04	0,0006	0,92
Triglicerídeos (mg/dL)	626	588	561	622	15,4	0,79	0,29	0,52
Glicose (mg/dL)	52,7	52,6	54,4	52,6	1,23	0,94	0,14	0,65
Proteína (g/dL)	8,43	8,86	8,63	8,25	0,15	0,82	0,41	0,16
Creatinina (mg/dL)	1,80	2,53	2,20	2,24	0,12	0,60	0,53	0,83
Ureia (mg/dL)	25,6	28,0	24,5	29,4	0,85	0,46	0,11	0,87

* CONT, concentrado controle sem adição de óleo; AME, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim; GIR, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol e MIX, concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol.

† Valor da Probabilidade para efeito de Tratamento (Trat); Dias em lactação (DEL) e interação tratamento × DEL (Trat × DEL).

‡ Erro padrão da média.

^{a-b} Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

§ AGNE, Ácidos graxos não esterificados; β-OHB, β-hidroxibutirato.

Tabela 5 Abundância relativa de RNAm de genes extraídos de células somáticas do leite de vacas Jersey a pasto suplementadas com óleos de amendoim e girassol

Parâmetro §	Tratamentos *				EPM ‡	P-valor †
	CONT	AME	GIR	MIX		
<i>Metabolismo lipídico</i>						
FASN	2,08 ^b	2,09 ^b	0,42 ^c	4,48 ^a	0,45	0,03
ACACA	0,98 ^b	1,11 ^b	2,05 ^{ab}	3,52 ^a	0,37	0,04
LPL	1,58	1,59	0,71	2,36	0,18	0,06
SCD	1,79 ^b	2,15 ^{ab}	0,32 ^c	3,50 ^a	0,38	0,0008
SREBF-1	1,29	1,42	1,28	2,05	0,12	0,12
PPAR α	5,47	5,32	5,34	2,60	0,40	0,10
<i>Sistema antioxidante</i>						
CAT	3,57	2,94	3,06	2,51	0,28	0,42
SOD1	7,51 ^a	7,06 ^a	4,11 ^b	3,68 ^b	0,38	0,002
GPX1	3,90	2,41	2,98	3,00	0,19	0,058

* CONT, concentrado controle sem adição de óleo; AME, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de amendoim; GIR, concentrado mais 59,6 g/kg MS de óleo de girassol e MIX, concentrado mais 59,6 g/kg MS de uma mistura 1:1 de óleos de amendoim e girassol.

† Valor da Probabilidade para efeito de Tratamento (Trat).

‡ Erro padrão da média.

^{a-b} Médias na mesma linha, seguidas pela mesma letra, não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

§ FASN, Ácido graxo sintetase; ACACA, Acetil CoA carboxilase; LPL, Lipoproteína lípase; SCD, Esteroil CoA desaturase; SREBF-1, Fator de ligação ao elemento regulatório de Esterol 1; PPAR α , receptor ativado por proliferadores do peroxissoma alfa; CAT, Catalase; SOD1, Superóxido dismutase 1; GPX1, Glutathione peroxidase 1.

V - CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação, com aproximadamente 28 g/kg MS na dieta total com óleos de amendoim e girassol no início da lactação, não resulta em melhor desempenho na produção de leite diária e na lactação total de vacas mantidas em pastagem tropical quando comparada ao tratamento controle, sem adição óleo.

A suplementação com fonte rica em ácido graxo linoleico, representada pelo óleo de girassol, reduz a produção e o teor de gordura do leite e melhora o balanço de energia no início da lactação quando comparada à suplementação com óleo de amendoim, rico em ácido graxo oleico.

As alterações na composição de ácidos graxos da gordura do leite promovidas pela suplementação de fontes mono e poli-insaturadas de ácidos graxos permitem agregação de valor ao leite como um produto para alimentação humana. Enquanto o óleo de amendoim aumentou a proporção de ácidos graxos monoinsaturados e *n-3*, a suplementação com óleo de girassol aumentou a proporção de ácidos graxos poli-insaturados. Ainda, a suplementação com óleo de girassol é mais efetiva em reduzir a estabilidade oxidativa do leite à lipoperoxidação.

As alterações, na expressão gênica de enzimas lipogênicas e antioxidantes em células extraídas do leite diante da suplementação com óleos insaturados, confirmam estudos prévios que mostram a suplementação com ácidos graxos poli-insaturados ricos em ácido graxo linoleico como moduladora da expressão gênica de enzimas lipogênicas e também sugere a atuação destes na modulação de enzimas antioxidantes, não se observando mesma resposta com suplementação com fonte rica em ácido graxo oleico. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o efeito da suplementação com ácidos graxos poli-insaturados sobre a expressão gênica de enzimas antioxidantes em vacas leiteiras.