

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV**

**MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**DIEGO FERNANDES**

**EFEITO DE DOSES CRESCENTES DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO  
*TRANS*-10, *CIS*-12 SOBRE A PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E PERFIL DE  
ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE E PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE CABRAS  
LEITEIRAS DA RAÇA TOGGENBURG**

**LAGES**

**2012**

**DIEGO FERNANDES**

**EFEITO DE DOSES CRESCENTES DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO  
*TRANS*-10, *CIS*-12 SOBRE A PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E PERFIL DE  
ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE E PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE CABRAS  
LEITEIRAS DA RAÇA TOGGENBURG**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da UDESC como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira

**LAGES**

**2012**

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária  
Renata Weingärtner Rosa – CRB 228/14ª Região  
(Biblioteca Setorial do CAV/UDESC)

Fernandes, Diego

Efeito de doses crescentes do ácido linoleico conjugado *trans*-10, *cis*-12 sobre a produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite e parâmetros sanguíneos de cabras leiteiras da raça Toggenburg / Diego Fernandes ; orientador: Dimas Estrasulas de Oliveira. – Lages, 2012. 74f.

Inclui referências.

Dissertação (mestrado) – Centro de Ciências Agroveterinárias / UDESC.

1. Ácido linoleico conjugado.
2. Suplementação de lipídios.
3. Depressão da gordura do leite.
4. Cabras leiteiras. I. Título.

CDD – 636.39089


**DIEGO FERNANDES**

**EFEITO DE DOSES CRESCENTES DO ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO  
TRANS-10, CIS-12 SOBRE A PRODUÇÃO, COMPOSIÇÃO E PERFIL DE  
ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE E PARÂMETROS SANGUÍNEOS DE CABRAS  
LEITEIRAS DA RAÇA TOGGENBURG**


Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

**BANCA EXAMINADORA**

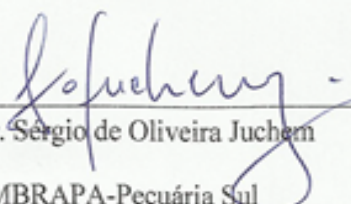
Orientador:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Dimas Estrasulas de Oliveira  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Henrique M. N. Ribeiro Filho  
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Sérgio de Oliveira Juchem  
EMBRAPA-Pecuária Sul

Lages, 10/04/2012

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro, agradeço a Deus por tudo e pelas poucas dificuldades em minha vida.

À minha família, pela dedicação, pelo exemplo e pelo amor a mim empregado, sem o qual eu não estaria aqui.

Ao professor Dimas Estrasulas de Oliveira pela orientação, paciência, amizade e por sempre acreditar na minha capacidade.

À minha namorada Suellen N. da Silva, por compreender que às vezes a vida nos leva para longe.

Aos meus tios Darci e Aldérico Biffi e primos Cláudia e Leonardo Biffi pelo suporte a mim empregado que me proporcionou uma condição de dedicação exclusiva para com os estudos.

Ao pesquisador da Embrapa, Dr. Marco Antônio Sundfeld da Gama pela amizade e pelo suporte durante o decorrer de todo este trabalho.

Aos professores do curso de Ciência Animal, em especial aos professores André Fischer Sbrissia, Henrique M. N. Ribeiro Filho e Luiz Cláudio Miletti, que contribuíram muito para o meu aprendizado.

À Universidade do Estado de Santa Catarina por me conceder esta oportunidade.

Aos companheiros, Daniel Schmitt, Luís Fernando Schütz, Luís Carlos Bordin, Valesca Anchau, João A. Gabriel, Michel Baldin, Ricardo Dresch e Dileta Alessio, que muito me ajudaram e me engrandeceram como pessoa e profissional.

A todos os funcionários da EMBRAPA - Gado de Leite, em especial ao pesquisador Dr. José Henrique Bruschi “*in memoriam*”, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos amigos da EMBRAPA - Gado de Leite, Luciana Estevez, Pedro H. Pinto, Anna Carolynne A. Duque, Shirley Motta e Angélica Ermita por toda ajuda prestada.

Aos funcionários da Granja Água Limpa, em especial ao seu Joaquim, por me ensinarem na prática a importância da alegria independentemente das dificuldades.

À Secretaria de Educação do Estado de Santa Catarina pela concessão da bolsa de estudos.

“Pelo que o amor nos destina à moral e dela nos liberta. Pelo que a moral nos destina ao amor, ainda que ele esteja ausente, e a ele se submete.” (André Comte-Sponville)

“E justamente então Ivan Ilitch caiu no fundo, viu a luz e percebeu que a sua vida não fora o que deveria ser, mas que ainda era possível corrigi-lo” (Lev Tolstói)

## RESUMO

FERNANDES, Diego. **Efeito de doses crescentes do ácido linoleico conjugado *trans*-10, *cis*-12 sobre a produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite e parâmetros sanguíneos de cabras leiteiras da raça Toggenburg.** 2012. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2012.

O fornecimento de CLA *trans*-10, *cis*-12 através da dieta tem resultado na depressão da gordura do leite de bovinos, ovinos e caprinos. No entanto, os seus efeitos em caprinos são menos compreendidos perante as outras espécies de ruminantes. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de doses crescentes de CLA *trans*-10, *cis*-12 desprotegido da bio-hidrogenação ruminal sobre a produção, secreção dos componentes e perfil de ácidos graxos do leite de cabras leiteiras. Para isso, foram utilizados 8 animais da raça Toggenburg não prenhes com  $135 \pm 21$  dias em lactação, separadas de acordo com o número de lactações para compor dois Quadrados Latinos 4 X 4 (12 dias de tratamento separados por 6 dias de intervalo), um formado por primíparas e o outro por múltíparas. Os animais foram submetidos aleatoriamente aos seguintes tratamentos: CLA0) 45 g/d de Megalac-E; CLA15) 30 g/d de Megalac-E+15 g/d de CLA; CLA30) 15 g/d de Megalac-E+30 g/d de CLA; CLA45) 45 g/d de CLA. Os tratamentos foram inclusos no concentrado fornecido aos animais, assim, todos os tratamentos continham 45 g/d de suplemento lipídico. O suplemento de CLA (Luta-CLA 60) continha 29,9% do isômero *trans*-10, *cis*-12 na forma de ésteres metílicos, perfazendo doses de 0, 4,48, 8,97 e 13,45 g/d deste ácido graxo para os respectivos tratamentos citados anteriormente. O consumo de matéria seca de silagem, a produção de leite, a produção e o teor de proteína e lactose do leite, o escore de condição corporal e o peso vivo não foram afetados pelas doses de CLA *trans*-10, *cis*-12. Ao final de cada período experimental (d 12), a avaliação do teor e produção de gordura do leite em relação ao encontrado no dia 0, demonstrou que o tratamento CLA0 levou ao aumento da gordura do leite. Assim, as comparações de produção e teor de gordura do leite foram feitas considerando os valores obtidos no dia 0 como 100%. Os tratamentos CLA15, CLA30 e CLA45 reduziram, respectivamente, a produção de gordura do leite em 8,1, 26,1 e 32,7% e o teor de gordura do leite em 4,5, 21,5 e 28,3%. O uso de doses crescentes de CLA *trans*-10, *cis*-12 na dieta alterou o perfil de ácidos graxos do leite, com reduções da concentração dos ácidos graxos oriundos da síntese *de novo* e aumento da concentração dos provenientes da circulação sanguínea. Porém, quando a secreção destes mesmos ácidos graxos foi avaliada houve redução da secreção de ambas as classes de ácidos graxos. A suplementação de CLA *trans*-10, *cis*-12 também acarretou na redução dos índices de dessaturação C14:1/C14:0, C16:1/C16:0, C17:1/C17:0 e C18:1/C18:0. Tanto a concentração como a secreção do CLA *trans*-10, *cis*-12 aumentaram conforme o seu aumento na dieta, e correspondeu a uma eficiência de transferência da 1,18, 1,17 e 1,21% para os tratamentos CLA15, CLA30 e CLA45 (respectivamente), sendo que as mesmas não diferiram entre si. Quando o balanço energético (BE) dos animais foi avaliado, as inclusões crescentes do CLA *trans*-10, *cis*-12 na dieta aumentaram linearmente o BE.

**Palavras-chave:** ácido linoleico conjugado; suplementação de lipídios; depressão da gordura do leite; cabras leiteiras.



## ABSTRACT

FERNANDES, Diego. **Effect of increasing doses of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on milk production, milk composition, milk fatty acids profile and blood parameters in Toggenburg dairy goats.** 2012. 74f. Dissertation (Mestrado em Ciência Animal – Área: Produção Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Lages, 2012.

Feeding *trans*-10, *cis*-12 CLA has resulted in milk fat depression in dairy cows, ewes and goats. However, its effects in goats are less understood in comparison with other ruminant species. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of increasing doses of a rumen unprotected *trans*-10, *cis*-12 CLA supplement on milk production, secretion of milk components and milk fatty acid profile in dairy goats. Eight Toggenburg non pregnant goats ( $135 \pm 21$  DIM) were used in a duplicate 4 x 4 Latin Square design (12-d treatment periods separated by 6-d intervals) according to the order of lactation (primiparous and multiparous). The animals within each group were randomly assigned to the following dietary treatments: CLA0: 45 g/d of Megalac-E; CLA15: 30 g/d of Megalac-E+15 g/d CLA; CLA30: 15 g/d of Megalac-E+30 g/d of CLA; CLA45: 45 g/d of CLA. The lipid supplements were mixed in the concentrate and fed individually to the animals after morning and afternoon milkings. The CLA supplement (Luta-CLA 60) had 29.9% of *trans*-10, *cis*-12 CLA as methyl esters, resulting in doses of 0, 4.48, 8.97 and 13.45 g/d of this CLA isomer for CLA0, CLA15, CLA30 and CLA45 treatments, respectively. Dry matter intake, milk yield, content and secretion of milk protein and lactose, body condition score and body weight were unaffected by the dietary treatments. The comparison of milk fat content and yield observed on the last day of each treatment period (d 12) with those found on day 0 showed that CLA0 treatment increased the milk fat content. Thus, milk fat content and yield on day 0 were considered as 100%. The CLA15, CLA30 and CLA45 treatments reduced milk fat yield by 8.1, 26.1 e 32.7% and milk fat content by 4.5, 21.5 e 28.3%, respectively. The increase in dietary *trans*-10, *cis*-12 CLA dose reduced the concentration of milk fatty acids arising from *de novo* synthesis and increased the concentration of those derived from blood circulation. However, the milk secretions of both classes of fatty acids were reduced linearly as the CLA dose increased. The increase in dietary *trans*-10, *cis*-12 CLA also caused a linear reduction in milk fat C14:1/C14:0, C16:1/C16:0, C17:1/C17:0 and C18:1/C18:0 desaturase indexes. Milk fat *trans*-10, *cis*-12 CLA content and secretion increased in goats fed increasing doses of *trans*-10, *cis*-12 CLA, which, corresponded to transfer efficiencies from diet to milk of 1.18, 1.17 and 1.21% for CLA15, CLA30 and CLA45 treatments, respectively. The energy balance (EB) increased linearly in goats fed increasing doses of *trans*-10, *cis*-12 CLA.

**Kay-words:** conjugated linoleic acid; lipid supplementation; milk fat depression; dairy goat.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|  |    |
|--|----|
| Figura 1 - Vias da bio-hidrogenação do ácido linoleico (A) e $\alpha$ -linolênico (B).....   | 18 |
| Figura 2 - Linha do tempo com os dias de coleta de amostras.....   | 35 |
| Figura 3 - Dias de avaliação da produção (A) e percentagem (B) de gordura do leite do leite de cabras Toggenburg suplementadas com CLA0 (◆), CLA15 (■), CLA30 (▲) e CLA45 (●).....   | 41 |
| Figura 4 - Relação entre produção (A) e percentagem (B) de gordura do leite de cabras Toggenburg, considerando o dia 0 como 100%, e doses crescentes de CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12.....  | 42 |
| Figura 5 - Relação entre concentração de CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 no leite de cabras e a redução na produção (A) e teor (B) de gordura do leite de cabras Toggenburg.....  | 44 |
| Figura 6 - Relação entre concentração de C18:1 <i>trans</i> -10 no leite e a redução da produção (A) e teor (B) de gordura do leite de cabras Toggenburg.....  | 45 |
| Figura 7 - Secreção de ácidos graxos no leite de cabras Toggenburg em resposta ao fornecimento das doses crescentes de CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 (CLA0 (■), CLA15 (■), CLA30 (■) e CLA45 (■)) de acordo com a origem dos ácidos graxos: oriundos da síntese <i>de novo</i> (<C16), extraídos da circulação sanguínea (>C16) e de ambas as fontes (C16:0 e C16:1). ..... | 47 |
| Figura 8 - Efeito das doses de CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 (CLA0 (■), CLA15 (■), CLA30 (■) e CLA45 (■) na secreção de CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 (A) e secreção de C18:1 <i>trans</i> -10 (B) no leite de cabras Toggenburg.....  | 48 |
| Figura 9 - Relação entre a concentração do CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 no leite e a produção (A) e o teor (B) de gordura do leite de cabras Toggenburg, onde o dia 0 é considerado como 100%.....   | 53 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 - Composição dos ingredientes e análises químicas do concentrado e silagem de milho fornecido para cabras Toggenburg.....                          | 31 |
| Tabela 2 - Perfil de ácidos graxos dos suplementos lipídicos utilizados.....  | 33 |
| Tabela 3 - Efeito das doses crescentes de ácido linoleico conjugado sobre o desempenho, produção e composição do leite de cabras Toggenburg.....            | 40 |
| Tabela 4 -Perfil de ácidos graxos (AG) do leite de cabras Toggenburg suplementadas com doses crescentes do ácido linoleico conjugado (CLA).....             | 42 |
| Tabela 5 - Efeito das doses crescentes de CLA nas diferentes origens do perfil de ácidos graxos e índices de dessaturase do leite de cabras Toggenburg..... | 46 |
| Tabela 6 - Balanço energético das cabras leiteiras Toggenburg nos dias 0 e 12 de tratamento com doses crescentes de CLA.....                                | 49 |

## SUMÁRIO

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>  | <b>15</b> |
| 2.1 ÁCIDOS GRAXOS: IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA.....                                 | 15        |
| 2.1.1 Metabolismo dos ácidos graxos no rúmen e síntese do CLA.....              | 16        |
| 2.1.2 CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 e sua ação em ruminantes.....        | 21        |
| 2.1.3 CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 e pequenos ruminantes.....           | 25        |
| <b>3. OBJETIVO.....</b>   | <b>29</b> |
| 3.1 OBJETIVO GERAL.....   | 29        |
| 3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....  | 29        |
| <b>4. HIPÓTESES.....</b>  | <b>29</b> |
| <b>5. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>  | <b>30</b> |
| 5.1 LOCAL, ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....                             | 30        |
| 5.2 DIETAS E TRATAMENTOS.....   | 30        |
| 5.3 PERÍODO EXPERIMENTAL.....   | 33        |
| 5.4 COLETA DE AMOSTRAS.....   | 34        |
| 5.5 AVALIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E DO PESO<br>VIVO DOS ANIMAIS..... | 35        |
| 5.6 ANÁLISES LABORATORIAIS.....   | 35        |
| <b>5.6.1 Alimentos.....</b>   | <b>35</b> |
| <b>5.6.2 Leite.....</b>   | <b>36</b> |
| <b>5.6.3 Suplementos lipídicos.....</b>   | <b>37</b> |
| <b>5.6.4 Parâmetros sanguíneos .....</b>  | <b>37</b> |
| 5.7 CÁLCULOS.....   | 37        |
| 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 38        |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>7. DISCUSSÃO.....</b>  | <b>50</b> |

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| <b>8. CONCLUSÕES.....</b>  | <b>59</b> |
| <b>9. REFERÊNCIAS.....</b> | <b>60</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos provenientes da dieta têm a capacidade de regular alguns aspectos do metabolismo animal. Dentre esses ácidos graxos, encontramos alguns isômeros do ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) que possuem as duplas ligações conjugadas. Esses ácidos graxos são comumente denominados CLA (do inglês, Conjugated Linoleic Acid) e são originados do metabolismo ruminal dos ácidos graxos poli-insaturados da dieta bem como da síntese endógena, sendo encontrados em produtos de ruminantes, principalmente no leite. Devido a seus efeitos biológicos dois isômeros têm sido considerados como os principais e assim, alvo de mais estudos. O primeiro deles é o CLA *cis*-9, *trans*-11, um importante agente anti-carcinogênico em alguns tipos de câncer e o outro é o CLA *trans*-10, *cis*-12, que se destaca por possuir a capacidade de alterar o metabolismo lipídico e em alguns casos, de particionar os nutrientes dentro do organismo animal.

O CLA *trans*-10, *cis*-12 não é um intermediário comum da bio-hidrogenação e ocorre no rúmen apenas sobre certas condições específicas (baixo pH e/ou presença de ácidos graxos poli-insaturados). Situações com dietas que levam a redução da gordura do leite, observa-se a sua presença no ambiente ruminal e através do uso de infusões abomasais deste ácido graxo, o apontaram como um importante agente inibidor da síntese de gordura do leite. Essa redução na gordura causada pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 é o resultado direto da inibição da síntese de enzimas responsáveis pela lipogênese mamária. Apesar disso, o fornecimento desse isômero via dieta ou a sua formação através da fermentação ruminal pode resultar em algumas situações benéficas como o aumento da produção de leite, o aumento da produção e/ou concentração da proteína do leite e a melhora do balanço energético dos animais lactantes, principalmente em situações onde o consumo de nutrientes não atende a demanda do animal, assim, possibilitando o seu uso como uma estratégia nutricional.

Há algumas formas lipídicas utilizadas para fornecer o CLA *trans*-10, *cis*-12 aos animais. O seu uso na forma lipídica de ésteres metílicos apresenta vantagens na produção comercial quando comparado a sua produção na forma de ácidos graxos livres ou como sabões de cálcio, e também não causa danos ao metabolismo ruminal e/ou digestão dos animais. Nos bovinos, de uma forma geral, a sua ação sobre a gordura do leite ocorre em um modelo com reposta previsível a uma determinada dose desse ácido graxo. Diferentemente dos bovinos, informações sobre a sua ação em caprinos ainda são poucas e

sugerem que esta espécie é dotada de uma certa insensibilidade ao fornecimento desse ácido graxo, realçando uma diferença existente entre estas duas espécies de ruminantes. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da suplementação com doses crescentes do CLA *trans*-10, *cis*-12 na forma de ésteres metílicos e desprovidos de proteção contra a bio-hidrogenação ruminal, sobre a produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite e parâmetros metabólicos ligados a homeostase energética de cabras leiteiras da raça Toggenburg.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ÁCIDOS GRAXOS: IMPORTÂNCIA FISIOLÓGICA

Os lipídios são substâncias que se caracterizam por possuírem baixa solubilidade em solventes polares. Dessa forma, esta classe é formada por diferentes compostos, com diferentes funções, que vão desde fonte de energia à hormônios. Os lipídios saponificáveis (aqueles que produzem sabões quando hidrolisados em meio alcalino) têm como unidade básica os ácidos graxos, que são ácidos carboxílicos unidos a uma cadeia carbônica que tem como principal função o fornecimento de energia para os animais (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002).

Na maioria dos alimentos, os ácidos graxos estão na forma esterificada, formando os óleos e gordura (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002). No caso das forragens consumidas por ruminantes, são encontrados como componentes das membranas celulares nos colmos e folhas das plantas, na forma de fosfolipídios e glicolipídios (CHILLIARD et al., 2007). Além de fornecer energia, os ácidos graxos oriundos da dieta atuam na regulação do metabolismo animal, cujo papel metabólico está relacionado com aspectos da sua estrutura molecular tais como: comprimento da cadeia, presença de duplas ligações, posição e isomeria das duplas ligações, etc. No caso específico de ácidos graxos poli-insaturados (aqueles contendo mais de uma dupla ligação na molécula), estes, têm maior impacto sobre a atividade e expressão gênica de enzimas relacionadas com o metabolismo de carboidratos, lipídios (SALTER e TARLING, 2007) e ciclo celular (MIGLIETTA et al., 2006).

A busca por compostos carcinogênicos na carne bovina grelhada levou ao descobrimento de ácidos graxos que, na verdade, tinham propriedades anti-carcinogênicas. Esses ácidos graxos eram isômeros do ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12), mas que apresentavam duplas ligações conjugadas (HA; GRIMM; PARIZA, 1987). Posteriormente, ficou estabelecido que esses isômeros atuavam na redução da incidência de tumores, principalmente da mama e cólon em modelos animais (BAUMAN et al., 1999). Esses isômeros do ácido linoleico são comumente chamados de ácidos linoleicos conjugados (CLA), os quais são encontrados principalmente em produtos oriundos de ruminantes como a carne, leite e derivados lácteos. Devido à presença destes compostos com propriedades anti-carcinogênicas, esses produtos, inicialmente considerados apenas como



fonte de nutrientes na dieta humana, podem adquirir também o caráter de “alimento funcional”.

A dieta é o principal fator que afeta a concentração de CLA na carne e no leite de ruminantes e, como consequência, diversas estratégias nutricionais têm sido avaliadas visando o aumento desse composto no leite. A inclusão de diferentes fontes de óleo na dieta, ou até mesmo suplementos contendo isômeros de CLA levaram ao aumento na concentração desses compostos no leite (KELLY et al., 1998; LOOR e HERBEIN, 1998; CHOUINARD et al., 1999). No entanto, nos primeiros estudos envolvendo suplementação da dieta de vacas leiteiras com misturas de isômeros de CLA, observou-se uma acentuada redução no teor e na produção de gordura do leite (LOOR e HERBEIN, 1998; CHOUINARD et al., 1999). Posteriormente, pesquisas com isômeros purificados demonstraram que os efeitos biológicos observados previamente eram isômero-dependentes. A ação anti-carcinogênica demonstrada inicialmente no estudo de Ha et al. (1987) foi atribuída ao isômero *cis-9, trans-11* (IP et al., 1999), ao passo que o isômero *trans-10, cis-12* foi identificado com o responsável pela redução do teor e produção de gordura do leite em ruminantes (BAUMGARD et al., 2000), bem como da gordura corporal de ratos (PARK et al., 1997) e suínos (OSTROWSKA et al., 2002).

### 2.1.1 Metabolismo dos ácidos graxos no rúmen e síntese do CLA

O termo CLA é utilizado para denominar isômeros geométricos e posicionais do ácido octadecadienóico (C18:2). Os isômeros de CLA podem apresentar duplas ligações conjugadas com a geometria *cis-cis*, *cis-trans*, *trans-cis* e *trans-trans* em diferentes posições da cadeia carbônica (ex: 7-9, 9-11, 10-12); ao todo, mais de 25 diferentes isômeros de CLA já foram identificados na gordura do leite de ruminantes (BAUMAN et al., 2008). Dentre os isômeros de CLA, o *cis-9, trans-11* é o mais abundante, representando cerca de 80 a 90% do total de CLA presente no leite. O segundo isômero em maior quantidade no leite é o CLA *trans-7, cis-9*, que perfaz em torno de 10% do CLA total (YURAWECZ et al., 1998). Os demais isômeros estão presentes em quantidades reduzidas, onde cada um responde por menos de 1% do CLA total (PALMQUIST et al., 2005).

A presença de CLA no leite e na carne de ruminantes está relacionada ao metabolismo dos lipídios da dieta no rúmen, à sua síntese por microrganismos ruminais

(PALMQUIST et al., 2005) e a síntese endógena na glândula mamária (CORL et al., 2001) e tecido adiposo (SANTORA, PALMQUIST e ROEHRIG, 2000). As dietas de ruminantes se caracterizam por possuir alta concentração de fibra e baixa concentração de lipídios, sendo a quantidade destes geralmente menos de 5% nas dietas de ruminantes (PALMQUIST e JENKINS, 1980). As forragens que normalmente compõem a maior percentagem das dietas têm a sua fração lipídica composta principalmente por glicolipídios e fosfolipídios, que têm como principais ácidos graxos associados, os ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico (C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15). Com relação aos grãos usados como concentrados nas dietas, a sua fração lipídica predominantemente está na forma de triacilglicerol, onde os ácidos linoleico e oleico (C18:1 *cis*-9) são os principais ácidos graxos (BAUMAN et al., 1999).

Em virtude de estarem em um ambiente anaeróbico, os ácidos graxos não são oxidados como as demais moléculas (WU e PALMQUIST, 1991), de forma que os lipídios da dieta não provêm nutrientes para as atividades de crescimento/reprodução dos microrganismos ruminais. Assim, mesmo sendo um metabolismo periférico dentro do ambiente ruminal, os lipídios da dieta são extensivamente metabolizados através de dois processos, a lipólise e a bio-hidrogenação (LOURENÇO et al., 2010).

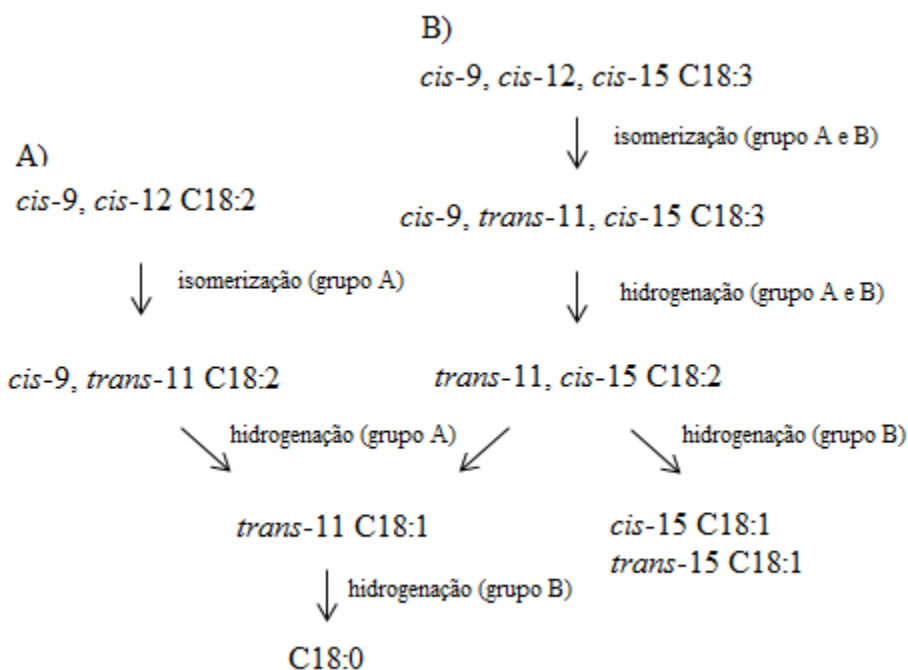
Resumidamente, uma vez livre da matriz celular, os lipídios sofrem ação de lipases microbianas (PALMQUIST et al., 2005). Estas enzimas têm capacidade de hidrolisar as ligações do tipo “éster” e liberarem ácidos graxos livres, sendo este evento denominado de lipólise. Dentre os diferentes tipos de microrganismos ruminais, as bactérias são consideradas os principais agentes neste processo (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1997), sendo a *Anerovibrio lipolítica* e as do gênero *Butirivibrio* exemplos de bactérias que atuam na lipólise (LOURENÇO et al., 2010).

Livres da sua forma esterificada, os ácidos graxos insaturados são submetidos à bio-hidrogenação, um processo também catalisado por enzimas microbianas. Esta ação converte os ácidos insaturados para saturados e, assim, determina o alto grau de saturação dos ácidos graxos encontrados nos produtos de ruminantes quando comparados aos de não ruminantes e plantas (LOCK e BAUMAN, 2004). Harfoot e Hazlewood (1997) estabeleceram uma ordem dos eventos com bases em diversos experimentos e descreveram uma via para a bio-hidrogenação do ácido linoleico (Figura 1 A) e uma para o  $\alpha$ -linolênico (Figura 1 B).

Em especial, a bio-hidrogenação do ácido linoleico, é a via de origem dos isômeros de CLA, de maior importância. O primeiro passo dessa reação é a conversão da dupla ligação *cis*-12 para *trans*-11, tendo como produto o CLA *cis*-9, *trans*-11. A enzima que catalisa esta reação é uma isomerase (linoleato isomerase), que necessita um grupamento carboxila livre para levar a termo sua ação (KEPLER, TUCKER; TOVE, 1970). Por essa razão, a lipólise é um passo limitante no processo de redução dos ácidos graxos no rúmen (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1997). A segunda etapa converte o CLA *cis*-9, *trans*-11 para C18:1 *trans*-11 através da hidrogenação da dupla ligação *cis*-9. A completa saturação do ácido linoleico termina com redução do ácido vacênico (C18:1 *trans*-11) em esteárico (C18:0).

De maneira semelhante à bio-hidrogenação do ácido linoleico, o primeiro passo da transformação do ácido  $\alpha$ -linolênico no rúmen envolve a isomerização da dupla ligação *cis*-12 para *trans*-11, produzindo o C18:3 *cis*-9, *trans*-11, *cis*-15, também por ação da enzima linoleato isomerase. Em seguida, há hidrogenação da dupla ligação *cis*-9 e formação do ácido C18:2 *trans*-11, *cis*-15. A partir deste último ácido graxo formado, pode ocorrer à formação dos seguintes intermediários: C18:1 *trans*-11, C18:1 *cis*-15 e C18:1 *trans*-15. O C18:1 *trans*-11 é reduzido até esteárico, ao passo que o C18:1 *cis*-15 e o C18:1 *trans*-15 não são mais hidrogenados (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1997).

Figura 1 - Vias da bio-hidrogenação do ácido linoleico (A) e  $\alpha$ -linolênico (B).



Fonte: Adaptado de Harfoot e Hazlewood (1997).

Dentre os microrganismos ruminais, novamente, as bactérias são as principais atuantes na bio-hidrogenação dos ácidos graxos no rúmen. A estirpe *Butirivibrio fibrosolvens* foi a primeira a ser associada com a redução dos ácidos graxos. Polan et al. (1964), utilizando o ácido linoleico como substrato, identificaram que essa estirpe tinha a capacidade de bio-hidrogenar o ácido graxo em questão e formar o CLA *cis-9, trans-11* e o ácido vacênico (C18:1 *trans-11*), sem formar ácidos graxos saturados. Posteriormente, ficou estabelecido que apenas algumas bactérias tinham a capacidade de hidrogenar os ácidos graxos monoinsaturados e formar o ácido esteárico (HARFOOT e HAZLEWOOD, 1997). Conforme a capacidade em hidrogenar determinados substratos, as bactérias foram classificadas em dois grupos como segue: as do grupo A e as do grupo B (Figura 1). As que tinham como substrato os ácidos graxos poli-insaturados e como produto final o C18:1 *trans-11* foram classificadas como pertencentes ao grupo A. Já as bactérias que pertencem ao grupo B se caracterizam por atuarem na hidrogenação completa dos ácidos graxos C18:3 e C18:1 *trans-11*.

Os fungos anaeróbios existentes no rúmen também têm a capacidade de metabolizar ácidos graxos insaturados e formar intermediários da bio-hidrogenação (CLA *cis-9, trans-11*), embora em quantidade muito menor que as bactérias (MAIA et al., 2007).

Como os ácidos graxos não fornecem nutrientes há duas teorias que tentam explicar os motivos pelos quais as bactérias realizam a bio-hidrogenação. A primeira teoria sugere que esta hidrogenação é uma tentativa de drenar equivalentes redutores (LENNARZ, 1966 citado por JENKINS et al., 2008). Já a segunda teoria sugere que esta hidrogenação é na verdade uma tentativa de detoxificação dos ácidos graxos insaturados (KEMP, LANDER; GUNSTONE, 1984). Trabalhos recentes como os de Maia et al. (2007) e Maia et al. (2010) apontaram como causa da bio-hidrogenação a remoção de um efeito bacteriostático causado pelos ácidos graxos insaturados (teoria da detoxificação).

Outro fator relevante é a sensibilidade das diferentes estirpes bacterianas aos ácidos graxos insaturados, que por sua vez, está relacionado com as diferentes habilidades em hidrogenar. Como exemplo, a estirpe *Butirivibrio proteoclasticus* que é muito mais sensível que a *Butirivibrio fibrosolvens* a ácidos graxos insaturados. Assim, a sua sensibilidade ao C18:1 *trans-11* explica a sua habilidade em reduzir este ácido graxo a ácido esteárico.

Por ser um processo associado com a fermentação microbiana, a lipólise e a bio-hidrogenação podem ser afetadas por vários fatores dietéticos que, conseqüentemente,

determinam o perfil de ácidos graxos que deixam o rúmen. A quantidade e a natureza dos lipídios da dieta e sua associação com a relação volumoso:concentrado da dieta são os principais fatores que determinam a extensão da hidrogenação dos ácidos graxos no rúmen (CHILLIARD et al., 2007; LOURENÇO et al., 2010). Um exemplo de associação entre estes dois fatores é o aumento da fração lipídica na dieta através da inclusão de óleos em dietas com alta proporção de forragem. A presença de ácidos graxos insaturados nos óleos inibe a lipólise e a bio-hidrogenação e o aumento da forragem na dieta tende a minimizar estes efeitos negativos dos ácidos graxos (PALMQUIST e JENKINS, 1980; BEAM et al., 2000). Por sua vez, uma alta inclusão de concentrado na dieta acarreta em queda do pH ruminal, um fator do ambiente ruminal que está diretamente ligado com a diminuição da lipólise e bio-hidrogenação e com a geração de diferentes intermediários desse processo (FUENTES et al., 2011).

O aumento na concentração de CLA na gordura do leite e nos tecidos dos ruminantes é uma consequência de inibições parciais do metabolismo ruminal dos ácidos graxos e da síntese endógena. O CLA *cis-9, trans-11*, apesar de ser um intermediário bem documentado nas vias da bio-hidrogenação, é formado principalmente na glândula mamária e outros tecidos que possuem a enzima Esteroil-CoA Dessaturase ( $\Delta^9$ -dessaturase) (GRIINARI et al., 2000). Esta enzima utiliza como substrato o ácido vacênico (C18:1 *trans*), que é um intermediário comum na bio-hidrogenação do ácido linoleico e  $\alpha$ -linolênico, que tende a se acumular no rúmen (NOBLE et al., 1974; HARFOOT e HAZLEWOOD, 1997; GRIINARI et al., 2000). Isso explica as concentrações relativamente elevadas deste isômero nos produtos de ruminantes, uma vez que o desaparecimento do CLA *cis-9, trans-11* no rúmen ocorre de forma rápida (NOBLE et al., 1974).

O outro isômero bastante estudado, o CLA *trans-10, cis-12*, não faz parte da via da bio-hidrogenação postulada por Harfoot e Hazlewood (1997). Esse isômero é formado no rúmen sob condições dietéticas que favorecem a redução do pH ruminal, associado ou não à presença de ácidos graxos poli-insaturados no rúmen, levando à alteração das vias de bio-hidrogenação mais conhecidas (BAUMAN e GRIINARI, 2003). Essas alterações estão associadas com mudanças na microbiota ruminal e sua capacidade de hidrogenar e crescer em faixas específicas de pH (WALLACE et al., 2007; LOURENÇO et al., 2010). Com base nos efeitos biológicos do CLA e outros ácidos graxos, a manipulação da bio-hidrogenação através da nutrição pode se tornar uma ferramenta de manejo que visa

aumentar as propriedades “nutracêuticas” do leite (ex: CLA *cis*-9, *trans*-11) ou a concentração de ácidos graxos que tem a capacidade de promover a partição de nutrientes (ex: CLA *trans*-10, *cis*-12).

### 2.1.2 CLA *trans*-10, *cis*-12 e sua ação em ruminantes

A síntese de leite tem uma alta prioridade na partição de nutrientes, exigindo uma série de alterações metabólicas maternas para atender esse estado fisiológico. Dentre os componentes do leite, a gordura, representa a maior fração energética e, assim, sua síntese e secreção representa grande parte da exigência de energia para lactação (BAUMAN e CURIE, 1980). Além de ser fonte de energia, os lipídios também contribuem para certas características organolépticas (ex: cor; sabor) do leite e seus derivados, e frequentemente são relacionados às questões de saúde humana (PALMQUIST; BEAULIEU; BARBANO, 1993; CHILLIARD et al., 2003).

Apesar de sofrer influência de fatores genéticos e variar de acordo com o estágio da lactação, a concentração e a composição da gordura do leite são muito mais sensíveis à dieta (SUTTON, 1989; PALMQUIST; BEAULIEU; BARBANO, 1993). Segundo Grummer (1991), o uso da dieta como ferramenta para modificar a composição da gordura do leite não é um conceito novo. Essa ferramenta vem sendo utilizada desde a década de 70 com o objetivo de aumentar a concentração de ácidos graxos insaturados no leite, pois os ácidos graxos saturados foram considerados prejudiciais à saúde humana. Apesar disso, hoje, a gordura do leite é destacada como alimento funcional (NRC, 1996).

Exemplos de dietas que alteram a gordura do leite são aquelas relacionadas com a síndrome da depressão da gordura do leite (DGL). Essa síndrome foi descrita pela primeira vez há mais de um século e ainda é um problema observado no dia-a-dia em algumas propriedades leiteiras (BAUMAN e GRIINARI, 2003). As dietas que causam esta síndrome em um primeiro momento foram divididas em dois grupos: o primeiro grupo se caracteriza por fornecer grandes quantidades de carboidratos de rápida fermentação e baixo conteúdo de fibra efetiva; o segundo grupo, por sua vez, é representado por dietas suplementadas com fontes ricas em óleos insaturados (DAVIS e BROWN, 1970 citado por BAUMAN e GRIINARI, 2003). Diversas teorias foram postuladas para explicar este fenômeno e, atualmente, a teoria da bio-hidrogenação é a mais aceita pela comunidade científica. Segundo Bauman e Griinari (2001), essa teoria implica que, em certas condições

dietéticas, as vias da bio-hidrogenação são alteradas, levando à síntese de certos ácidos graxos específicos como intermediários que inibem a síntese da gordura do leite.

Poucos ácidos graxos intermediários da bio-hidrogenação foram relacionados com a inibição da síntese da gordura do leite. Além do CLA *trans*-10, *cis*-12, os isômeros *trans*-9, *cis*-11 e *cis*-10, *trans*-12, e o ácido graxo C18:1 *trans*-10, foram negativamente correlacionados com a secreção de gordura do leite (SAEBO et al., 2005; PERFIELD et al., 2007; SHINGFIELD et al., 2009a). Porém, o CLA *trans*-10, *cis*-12 é o único ácido graxo que sem dúvida atua na redução da gordura do leite (BAUMGARD et al., 2000; BAUMGARD et al., 2001; de VETH et al., 2004). Bauman e Griinari (2003) apresentaram uma via possível da bio-hidrogenação do ácido linoleico, na qual ocorreria a formação do CLA *trans*-10, *cis*-12 em condições de baixo pH ruminal. Em princípio, o ácido linoleico seria isomerizado para CLA *trans*-10, *cis*-12, e posteriormente reduzido para C18:1 *trans*-10. O último passo desta via seria a hidrogenação do C18:1 *trans*-10, com a formação do ácido esteárico.

No rúmen, poucas bactérias têm a capacidade de sintetizar o CLA *trans*-10, *cis*-12, e somente uma pequena fração do substrato (ácido linoleico) é convertida. A sua formação e conversão para um ácido graxo mais reduzido indica que este isômero de CLA é um intermediário ligado à célula bacteriana e não um produto final da bio-hidrogenação. Dentre as bactérias que o sintetizam, apenas algumas estirpes como a *Megasphaera elsdenii* demonstram esta capacidade, denotando que a formação do CLA *trans*-10, *cis*-12 não é um traço filogenético. Dessa forma, a presença de diferentes estirpes de *Megasphaera elsdenii* pode resultar em variação na produção deste isômero gerando, nos animais, uma diferença na sensibilidade às dietas que causam a DGL (KIM et al., 2002).

A gordura é o componente mais variável do leite de ruminantes e é composta quase que exclusivamente por triacilgliceróis (95 a 98%) (JENSEN 2002). Existem cerca de 406 diferentes ácidos graxos que podem compor os triacilgliceróis, que diferem em quantidade e posição das insaturações, e no tamanho da cadeia (C4 até C18) (JENSEN 2002). A DGL causada pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 é marcada pela redução da secreção dos ácidos graxos de todos os tamanhos, embora a redução dos oriundos da síntese *de novo* (C4 a C14 e parte dos C16) seja de maior magnitude (BAUMGARD et al., 2001). A ação inibitória do CLA *trans*-10, *cis*-12 na secreção da gordura do leite é observada poucos dias após o seu fornecimento, com a redução alcançando o seu valor máximo por volta do 4º ao 5º dia de

suplementação, e retornando aos níveis normais após em torno de cinco dias do final da suplementação (BAUMGARD et al., 2000).

A magnitude da redução da gordura do leite está relacionada com a quantidade de CLA *trans*-10, *cis*-12 que alcança o abomaso (de VETH et al., 2004). A máxima depressão observada na secreção de gordura é em torno de 50%, e ocorre quando uma dose de 14 g/d de CLA *trans*-10, *cis*-12 é infundida no abomaso de vacas (BAUMGARD et al., 2001). A dose de efetividade média (25% de inibição) gira em torno de 2,5 g/d de CLA *trans*-10, *cis*-12 ( $\pm 0,01\%$  do consumo de matéria seca), e poucos incrementos na queda da gordura são observados com o aumento da dose acima de 6 g/d (de VETH et al., 2004; BAUMAN et al., 2008). Esses valores denotam que a relação entre CLA *cis*-10, *trans*-12 e a secreção da gordura do leite é melhor expressa na forma exponencial (de VETH et al., 2004). Além de atuar na redução na gordura, o CLA *cis*-10, *trans*-12 pode reduzir o processo de dessaturação dos ácidos graxos na glândula mamária. No entanto, este efeito é somente observado quando doses acima da efetividade média são administradas aos animais (PERFIELD et al., 2006).

O emprego do CLA *trans*-10, *cis*-12 como uma ferramenta nutricional para induzir a depressão da gordura do leite pode ser vantajoso em certas situações. Com a redução da síntese de gordura, há uma diminuição da secreção de energia no leite, que pode ser direcionada para outras funções fisiológicas. A partição dessa energia, a princípio, depende do balanço energético em que os animais se encontram. A maioria dos experimentos com suplementação do CLA *trans*-10, *cis*-12 utilizaram animais em balanço energético positivo e não encontraram alterações na produção ou composição de sólidos não gordurosos do leite, ou parâmetros metabólicos relacionados à homeostase energética (glicose, ácidos graxos não esterificados (AGNE)) (BAUMGARD et al., 2002b; PERFIELD et al., 2002). Aparentemente, em períodos em que o consumo de nutrientes atende a demanda do animal, a redução da secreção de gordura induzida pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 gera reduções no consumo de matéria seca ( $\pm 1,5$  kg/d) e aumento da expressão de enzimas lipogênicas no tecido adiposo, o que pode estar relacionado com o aumento das reservas corporais observado em alguns experimentos (BAUMAN et al., 2008; HARVATINE; PERFIELD II; BAUMAN, 2009).

Há certas ocasiões em uma produção leiteira em que as exigências de energia não são atendidas pelo consumo de alimentos. Sistemas de produção de leite em pastagens são exemplos de condições em que o balanço energético pode estar negativo. Nessas situações,



a energia “economizada” pelo uso do CLA *trans*-10, *cis*-12 pode acarretar em aumento da produção de leite, proteína do leite ou ambos (KAY et al., 2007; MEDEIROS et al., 2010).

O período pós-parto é outra situação em que ocorre o balanço energético negativo, pois há uma grande demanda por nutrientes para a lactação e o consumo de alimentos está reduzido (DOEPEL et al., 2002). Uma menor secreção de energia no leite nessa situação pode, além de possibilitar o direcionamento da energia poupada para produção de leite ou proteína do leite (BERNAL-SANTOS et al., 2003; KAY et al., 2006), melhorar o balanço energético dos animais e assim diminuir o impacto de desordens metabólicas e melhorar alguns índices reprodutivos dos rebanhos leiteiros (ODENS et al., 2007; de VETH et al., 2009; HUTHCHINSON et al., 2011).

Sob o ponto de vista da saúde dos consumidores de leite e derivados, o uso de suplemento de CLA *trans*-10, *cis*-12 resulta na diminuição de certos ácidos graxos associados a doenças cardiovasculares (láurico-C12:0; mirístico-C14:0 e palmítico-C16:0; MENSINK et al., 2003), os quais são consumidos principalmente via produtos lácteos (SHINGFIELD et al., 2010). Cabe ressaltar, entretanto, que não há evidências de que o consumo de leite e seus derivados estejam associados com o aumento do risco de doenças cardiovasculares (GERMAN et al., 2009).

Apesar dos benefícios do emprego do CLA *trans*-10, *cis*-12 mencionados anteriormente, o uso de altas doses pode gerar efeitos deletérios à produção leiteira. A infusão abomasal de 45 g/d deste ácido graxo gerou, além da queda na gordura do leite, uma redução na produção de leite e no seu teor de lactose. Associado a esses efeitos, houve também um aumento significativo no conteúdo de células somáticas, cloro e sódio do leite, indícios comumente relacionados à involução mamária em vacas (BELL e KENNELLY, 2003) e ovelhas lactantes (OLIVEIRA et al., 2012). A redução na produção de leite pode ocorrer através da apoptose de células epiteliais da glândula mamária, conforme demonstrado por Keating et al. (2008).

A síntese de gordura do leite exige que a glândula mamária mantenha um constante suprimento de alguns fatores (enzimas, transportadores, substratos, etc..) e para isso necessita a coordenação de alguns genes que controlam o fornecimento desses agentes (RUDOLPH et al., 2007). A maioria dos genes relacionados com o metabolismo lipídico é regulada por uma família de fatores de transcrição denominados proteínas de ligação ao elemento responsivo a esteróide (SREBP - Sterol Response Element-Binding Protein). Cerca de três isoformas do SREBP foram identificadas: o SREBP-1a; o SREBP-1c; e o

SREBP2. O SREBP-1a e SREBP2 são relacionados com a síntese de colesterol e ácidos graxos (HORTON et al., 2003), ao passo que o SREBP-1c é somente relacionado com a síntese de ácidos graxos (SHIMANO et al., 1997).

Sobre os detalhes de ação do CLA *trans*-10, *cis*-12 que resultam na queda da gordura, a princípio, sabe-se que há uma diminuição da expressão de enzimas lipogênicas importantes como a Acetil-CoA Carboxilase (ACC), Ácido Graxo Sintase (AGS), Esteroil-CoA Dessaturase (ECD) e Lipoproteína Lipase (LPL) (PIPEROVA et al., 2000; BAUMGARD et al., 2002a) que são reguladas por esta família de fatores de transcrição (PETERSON et al., 2004).

A importância do SREPB, em especial a isoforma SREBP1 na DGL causada pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 começou a ficar evidente a partir dos estudos de Peterson et al. (2004). Nesse estudo, a incubação de células da glândula mamária bovina com 75 µmol/L de CLA *trans*-10, *cis*-12 reduziu a quantidade de mRNA das enzimas ACC, AGS e ECD, e da forma nuclear ativada da isoforma SREBP1. Harvatine e Bauman (2006) confirmaram as observações de Peterson et al. (2004), porém em uma condição *in vivo* dos efeitos celulares do CLA *trans*-10, *cis*-12 e de dietas que induzem a DGL. Nessa situação, além da diminuição de algumas enzimas lipogênicas (AGS, LPL, e ECD), houve também a diminuição da expressão do SREBP1 e genes relacionados à sua forma nuclear ativa.

Além do SREBP1, outros mecanismos adicionais podem ter importância na redução da gordura do leite causada pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 e dietas que levam a esse efeito (HARVATINE e BAUMAN, 2006). O “Spot 14” (Thyroid Hormone Responsive Spot 14 (S14)) é uma proteína nuclear que inicialmente foi relacionada à resposta na expressão gênica de hepatócitos ao hormônio tireoideano (SEELIG et al., 1981), que posteriormente, foi incluída como um fator que influencia a quantidade de triglicerídios hepáticos (KINLAW et al., 1995). Embora não há uma função bioquímica exata para o “Spot 14”, acredita-se que esta proteína interage com fatores de transcrição e que é necessária para a síntese *de novo* de ácidos na glândula mamária de ratos (ZHU et al., 2005) e bovinos (HARVATINE e BAUMAN 2006).

### 2.1.3 CLA *trans*-10, *cis*-12 e pequenos ruminantes

A classe dos pequenos ruminantes abrange animais de pequeno porte como cabras, ovelhas, cervídeos, entre outros. Suas habilidades em utilizar alimentos de baixa qualidade

ou procurar por eles em lugares inóspitos permitem que esses animais sobrevivam em ambientes áridos e terrenos onde o cultivo é difícil. Portanto, estes animais representam uma importante fonte de alimento, fibra e pele para grande parte da população humana ao redor do mundo (NRC, 2007). Em especial, cabras e ovelhas leiteiras são importantes para a sobrevivência de grande parte da população que não tem alternativas para o suprimento de alimentos e renda (HAENLEIN, 2001).

Ambas as espécies (cabras e ovelhas) possuem características no âmbito fisiológico e morfológico que lhes imprimem certas particularidades únicas, quando comparadas a bovinos. Um exemplo claro disto, é a baixa incidência de DGL observada nos pequenos ruminantes, quando alimentados com dietas com grande quantidade de alimentos concentrados e/ou contendo lipídios poli-insaturados (CHILLIARD et al., 2007; PULINA et al., 2006). Essa diferença observada, sugere, que as vias da bio-hidrogenação ruminal nos pequenos ruminantes domésticos são menos susceptíveis a alteração que resultem na formação do ácido graxo C18:1 *trans*-10 (SHINGFIELD et al., 2010), amplamente relacionada do à DGL (GRINARI et al., 1998). Essa suposição pode ser melhor expressa através da relação entre a concentração de ácidos graxos C18:1 *trans*-10 e a redução da gordura do leite observada em bovinos, caprinos e ovinos. Os pequenos ruminantes apresentam certa concentração deste ácido graxo, que apesar de ser muito menor que nos bovinos, não culmina na DGL (SHINGFIELD et al., 2010; RIBEIRO et al., 2011). Outro exemplo sobre a particularidade inerente aos pequenos ruminantes é justamente a diferença na resposta a suplementação lipídica observada em caprinos comparados aos bovinos. Normalmente, o conteúdo de gordura do leite de caprinos tende a aumentar em resposta a uma suplementação lipídica, já os bovinos, apresentam uma característica oposta (CHILLIARD et al., 2007).

Apesar da falta de resposta observada em dietas que causam a DGL, os pequenos ruminantes são susceptíveis aos efeitos do CLA *trans*-10, *cis*-12. As primeiras avaliações que encontraram a redução da gordura do leite como resposta ao fornecimento deste ácido graxo foram em ovinos. De acordo com Lock et al. (2006), Sinclair et al. (2007), Sinclair et al. (2010) e Oliveira et al. (2012), para essa espécie, a magnitude da depressão da gordura do leite em relação a dose fornecida se assemelha a observada em vacas lactantes, quando a dose é equivalente em peso metabólico. Da mesma forma que nos bovinos, há uma redução da secreção de todos os ácidos graxos, mas os ácidos graxos provenientes da síntese *de novo* são mais afetados. Ainda em concordância com os bovinos, houve uma

redução nos índices de dessaturase, demonstrando que CLA *trans*-10, *cis*-12 afeta a enzima ECD nesses animais (LOCK et al., 2006; SINCLAR et al., 2007; SINCLAIR et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2012).

Os caprinos também apresentam uma redução no teor e produção de gordura em resposta ao fornecimento do deste isômero de CLA (LOCK et al., 2008). Entretanto, os primeiros estudos demonstraram pouco ou nenhum efeito do seu fornecimento em diferentes formas na lipogênese mamária (ERASMUS et al., 2004; SCHMIDELY e MORAND-FEHR, 2004; ANDRADE e SCHMIDELY, 2006).

Os primeiros a averiguar a redução da síntese de gordura em cabras foram Lock et al. (2008), que relataram uma redução de 8 e 21 pontos percentuais na síntese de gordura com o uso de 3 e 6 g/d, respectivamente, deste ácido graxo fornecido na dieta em uma forma protegida da bio-hidrogenção. Porém, a quantidade necessária para alcançar esses níveis de redução de gordura foram muito maiores do que as observadas em bovinos, quando comparadas com base no peso metabólico. Com base nesses estudos, os caprinos foram considerados dotados de uma menor sensibilidade que bovinos e ovinos aos efeitos anti-lipogênicos do CLA *trans*-10, *cis*-12 (LOCK et al., 2008).

A alteração do perfil de ácidos graxos que acompanha a queda na gordura de cabras também difere das situações comumente observadas em ovelhas e vacas. Nos caprinos, a redução da gordura é marcada somente pela diminuição da síntese dos ácidos graxos provenientes da síntese *de novo*, enquanto que a secreção dos ácidos graxos pré-formados não é afetada na maioria das vezes (SHINGFIELD et al., 2009b). Contudo, apesar de todos os contrastes entre bovinos e caprinos, a magnitude da depressão da gordura em cabras também é dose-dependente, sugerindo que o CLA *trans*-10, *cis*-12 atua através de mecanismos comuns em ruminantes. Dessa forma, a compreensão da regulação da síntese da gordura do leite pela dieta e os fatores que afetam as diferentes espécies de ruminantes é fundamental para o desenvolvimento de estratégias nutricionais que visem aumentar o valor nutricional do leite, diminuir a secreção de energia e melhorar o balanço energético dos animais em lactação (SHINGFIELD et al., 2010). Aliado a isso, o uso de uma fonte desprotegida da bio-hidrogenação (óleo) pode reduzir o custo de produção, como também o emprego em misturadores de concentrado.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da inclusão de doses crescentes do CLA *trans*-10, *cis*-12 desprotegido da bio-hidrogenação e na forma de

ésteres metílicos, sobre a produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite e parâmetros metabólicos de cabras da raça Toggenburg.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

- Avaliar o efeito da suplementação de doses crescente de CLA *trans*-10, *cis*-12 desprotegido da bio-hidrogenação ruminal sobre o desempenho de cabras leiteiras.

#### 3.2 ESPECÍFICO

- Avaliar o resultado das doses crescentes sobre a composição físico-química (gordura, proteína, lactose), a contagem de células somáticas e o perfil de ácidos graxos do leite.
- Acompanhar a variação na homeostase energética dos animais através de indicadores sanguíneos como a glicose e ácidos graxos não-esterificados.

### 4. HIPÓTESES

- A suplementação da dieta de cabras leiteiras com doses de CLA *trans*-10, *cis*-12 desprotegido da bio-hidrogenação ruminal alterará a composição do leite, reduzindo o teor de gordura.
- A suplementação da dieta de cabras leiteiras com doses de CLA *trans*-10, *cis*-12 desprotegido da bio-hidrogenação ruminal resultará em alterações no perfil de ácidos graxos do leite.
- As alterações na composição do leite mencionadas acima serão acompanhadas por mudanças no perfil metabólico dos animais.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 LOCAL, ANIMAIS E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido com o aval do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade do Estado de Santa Catarina em concordância com a legislação vigente e as diretrizes éticas formuladas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, sob o protocolo nº 10511. O experimento foi realizado na Granja Água Limpa, localizada no município de Piau – MG (latitude: 21° 30' 34'' S; longitude: 43° 19' 22'' W), a 2 km do Campo Experimental de Coronel Pacheco, pertencente ao Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite (EMBRAPA - Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais). Foram utilizadas oito cabras da raça Toggenburg não prenhes e com  $135 \pm 21$  dias em lactação, separadas de acordo com o número de lactações para formar dois Quadrados Latinos 4 X 4, um composto por primíparas e o outro por múltiparas. Ao início do experimento, as cabras primíparas apresentavam uma produção média de  $2,9 \pm 0,1$  kg de leite por dia, peso vivo de  $47,2 \pm 0,5$  kg e escore de condição corporal (ECC) de 2,5. Os animais pertencentes ao grupo das múltiparas apresentavam uma produção média de  $2,2 \pm 0,1$  kg de leite por dia, peso vivo de  $46,2 \pm 7,2$  kg e ECC de 2,5. Os animais foram mantidos em baias individuais, onde recebiam as dietas experimentais e acesso *ad libitum* a água e sal mineral para caprinos.

### 5.2 DIETAS E TRATAMENTOS

As exigências nutricionais foram calculadas de acordo com o NRC (2007) e a formulação das dietas foi realizada através do programa Small Ruminant Nutrition System (TESDESCHI et al., 2010). Para cada categoria (primíparas ou múltiparas), foi formulado um concentrado para complementar ou exceder as exigências nutricionais em relação ao suprido pela silagem de milho, único volumoso fornecido *ad libitum* aos animais durante todo o período experimental. Os ingredientes do concentrado experimental e a composição química da silagem de milho e do concentrado são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição dos ingredientes e análises químicas do concentrado e silagem de milho fornecido para cabras Toggenburg

| Composição                        | Primíparas | Múltiparas |
|-----------------------------------|------------|------------|
| Ingredientes concentrado, % da MS |            |            |
| Milho moído                       | 47,3       | 50,0       |
| Farelo de soja                    | 45,5       | 43,9       |
| Premix vitam./mineral             | 4,5        | 3,5        |
| Calcário calcítico                | 2,7        | 2,6        |
| Análises químicas <sup>1</sup>    |            |            |
| Concentrado                       |            |            |
| MS, %                             | 88,4       | 88,2       |
| Proteína Bruta, % MS              | 21,4       | 22,6       |
| FDN, % da MS                      | 22,3       | 24,6       |
| FDA, % da MS                      | 13,7       | 15,8       |
| NIDA, % da MS                     | 0,21       | 0,21       |
| NDIN, % da MS                     | 0,47       | 0,49       |
| Lignina, % da MS                  | 3,97       | 3,92       |
| EE, % da MS                       | 4,1        | 4,1        |
| Silagem de milho                  |            |            |
| MS, %                             | 38,5       | 38,5       |
| Proteína Bruta, % MS              | 8,2        | 8,2        |
| FDN, % da MS                      | 64,4       | 64,4       |
| FDA, % da MS                      | 34,2       | 34,2       |
| NIDA, % da MS                     | 0,19       | 0,19       |
| NIDN, % da MS                     | 0,23       | 0,23       |
| Lignina, % da MS                  | 3,32       | 3,32       |
| EE, % da MS                       | 3,9        | 3,9        |

<sup>1</sup> Os valores apresentados não incluem os suplementos lipídicos usados.

Fonte: produção do próprio autor

Os animais foram submetidos a quatro tratamentos, que consistiam em níveis crescentes de inclusão, na dieta, de um suplemento lipídico contendo cerca de 60% de CLA total na forma de ésteres metílicos (Luta-CLA 60<sup>®</sup>, BASF, São Paulo, Brasil) e sendo



o suplemento lipídico “controle”, Megalac-E (Church & Dwight, Nova ponte, MG). Os tratamentos foram os seguintes: **Controle – CLA0**) 45 g/d de Megalac-E; **CLA15**) 30 g/d de Megalac-E + 15 g/d de CLA60 (Luta-CLA 60<sup>®</sup>); **CLA30**) 15 g/d de Megalac-E + 30 g/d de CLA60 (Luta-CLA 60<sup>®</sup>); **CLA45**) 45 g/d de CLA60 (Luta-CLA 60<sup>®</sup>). O suplemento de CLA continha 29,9% do isômero CLA *trans*-10, *cis*-12 (Tabela 2). Desta forma, os animais receberam uma dose de 0, 4,48, 8,97 e 13,45 g/d deste isômero de CLA nos tratamentos CLA0, CLA15, CLA30 e CLA45, respectivamente. A definição das doses empregadas foi baseada em experimento prévio com ovinos no qual o mesmo suplemento de CLA foi utilizado (OLIVEIRA et al., 2008). Os suplementos lipídicos foram misturados diariamente a 1 kg de concentrado (em base natural), o qual foi dividido em duas porções iguais, as quais foram fornecidas após as ordenhas da manhã (05:00 h) e da tarde (15:00 h). Após a ingestão completa do concentrado, era fornecido silagem de milho aos animais, “*ad libitum*”. As sobras da silagem eram pesadas diariamente, antes da ordenha da manhã, para determinação do consumo de matéria seca (MS).

Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos dos suplementos lipídicos utilizados.

| AG (g/100g AG)                                      | Suplemento |       |
|---|------------|-------|
|   | Megalac-E  | CLA   |
| ∑ C4 até C11  | 0,67       | nd    |
| C12:0   | 2,85       | nd    |
| C14:0   | 1,12       | nd    |
| C14:1 <i>cis</i> -9                                 | 0,01       | nd    |
| C15:0   | 0,06       | nd    |
| C16:0   | 17,09      | 4,10  |
| C16:1 <i>cis</i> -9                                 | 0,21       | nd    |
| C17:0   | 0,15       | nd    |
| C17:1 <i>cis</i> -9                                 | 0,06       | nd    |
| C18:0   | 6,65       | 3,60  |
| ∑ C18:1 <i>trans</i> -4 até <i>trans</i> -16        | 4,76       | nd    |
| C18:1 <i>cis</i> -9                                 | 18,64      | 27,40 |
| ∑ C18:1 <i>cis</i> -11 até <i>cis</i> -13           | 2,33       | nd    |
| C18:2 <i>trans</i> -9, <i>trans</i> -12             | 0,05       | nd    |
| C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -12               | 0,31       | nd    |
| C18:2 <i>trans</i> -9, <i>cis</i> -12               | 0,48       | nd    |
| C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12                 | 35,32      | 1,20  |
| C18:3 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12, <i>cis</i> -15 | 3,09       | nd    |
| CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11                 | 0,16       | 29,80 |
| CLA <i>trans</i> -9, <i>cis</i> -11                 | 0,07       | nd    |
| CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12                | nd         | 29,90 |
| ∑ >C18  | 1,49       | nd    |
| Outros  | 4,52       | 3,00  |

nd: não detectado.

Fonte: produção do próprio autor

### 5.3 PERÍODO EXPERIMENTAL

Antes do início do estudo, os animais foram submetidos a um período de adaptação de cinco dias, onde receberam a dieta basal sem a inclusão dos suplementos lipídicos (período pré-experimental). A seguir, os animais receberam cada tratamento por um período de 12 dias (Período de Suplementação), separados por intervalos de seis dias (Período de Intervalo) durante os quais os suplementos lipídicos (tratamentos) não foram

fornecidos com o objetivo de minimizar um possível efeito residual. Portanto, o experimento teve a duração de 66 dias, sendo quatro períodos experimentais com 12 dias cada, separados por três intervalos de 6 dias.

#### 5.4 COLETA DE AMOSTRAS

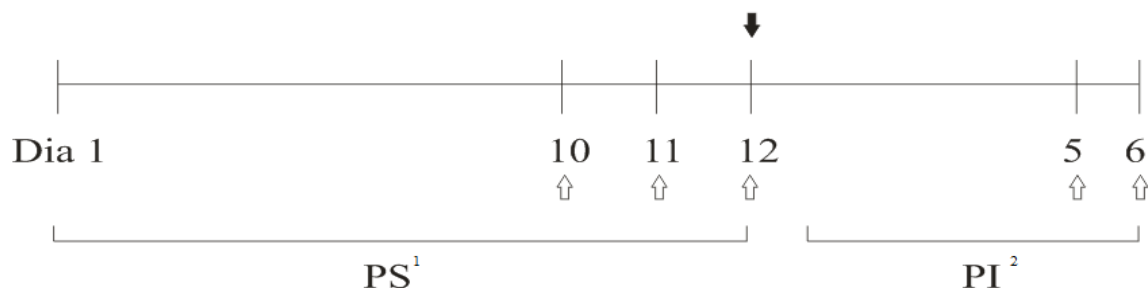
Amostras da silagem e dos concentrados foram coletadas semanalmente ao longo do experimento. A partir destas amostras foi feita uma amostra composta, que foi congelada à  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise bromatológica. Amostras dos suplementos lipídicos foram também coletadas no início do experimento e armazenadas à  $-20^{\circ}\text{C}$  para determinação do perfil de ácidos graxos.

As amostras de leite destinadas à determinação da composição química e contagem de células somáticas (CSS) foram coletadas no último dia do período de adaptação, nos últimos três dias de cada período experimental e nos dois últimos dias dos intervalos entre os períodos experimentais (Figura 2). O leite colhido (representativo das duas ordenhas) foi homogeneizado e armazenado em frascos contendo conservante (bromopol D & F Control System Inc., San Ramon, CA-USA) e mantido em ambiente refrigerado até o dia seguinte, quando então as amostras eram enviadas para o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite para realização das análises.

Para determinação do perfil de ácidos graxos do leite, foram coletadas amostras no último dia de cada período experimental (Figura 2). O leite foi coletado nas duas ordenhas em frascos sem conservante e armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise.

Ainda no último dia de cada período experimental, com os animais em jejum alimentar e após a ordenha da manhã foram coletadas duas amostras de sangue de cada animal (Figura 2). As coletas foram feitas através da punção da veia jugular em tubos tipo “Vacutainer” de 5 mL (Zhejiang Kangshi Medical Devices Co., Hangzhou, China), contendo anti-coagulante (ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA)) e mantidas em refrigeração. Imediatamente após a coleta o sangue foi centrifugado a  $2800 \times g$  por 15min e o plasma resultante foi armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise de ácidos graxos não esterificados (AGNE) e glicose.

Figura 2 – Linha do tempo com os dias de coleta de amostras.



O caractere (↑) indica os dias onde ocorreu a coleta de leite para a determinação da composição do leite. O caractere (↓) indica o dia onde ocorreu coleta de leite para a determinação do perfil de ácidos graxos e coleta de sangue. <sup>1</sup>Período de suplementação. <sup>2</sup>Período de intervalo.

Fonte: produção do próprio autor

## 5.5 AVALIAÇÃO DO ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E DO PESO VIVO DOS ANIMAIS

No último dia (12<sup>o</sup>) de cada período experimental foram determinados o peso vivo e o escore de condição corporal (ECC) dos animais através da avaliação visual e tátil, atribuindo valores variando de 1 a 5, com incrementos de 0,25. A escala utilizada foi a descrita por Villaquiran et al. (2005), onde os animais foram classificados como 1 (muito magros) ou 5 (obesos).

## 5.6 ANÁLISES LABORATORIAIS

### 5.6.1 Alimentos

Os alimentos (silagem e concentrado) tiveram as suas frações matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e cinzas determinadas de acordo com AOAC (2000) (Métodos 934.01, 988.05, 925.38 e 923.03, respectivamente). As frações fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NIDN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) e lignina foram determinadas de acordo com Van Soest et al. (1991). Para a determinação da fração

FDN na silagem milho e concentrado foi utilizado alfa-amilase termoestável e corrigida para cinzas.

### 5.6.2 Leite

Os componentes físico-químicos do leite (proteína, gordura, lactose e sólidos totais) foram determinados por espectroscopia no infravermelho (IDF, 2000) utilizando o aparelho Bentley 2000 e a contagem de células somáticas (CCS) foi determinada através de citometria de fluxo (IDF, 2006), com o uso do aparelho Bentley BactoCount IBC (AOAC, 2000; método 972.160) pelo Laboratório de Qualidade do Leite do CNPGL – EMBRAPA.

Para a análise do perfil ácidos graxos do leite, a amostra (~ 40 mL) foi centrifugada a 17800 x g/30min a 8°C para a obtenção da fração gordurosa. A extração da fração lipídica da gordura do leite foi feita segundo o método de Hara e Radin (1978), utilizando uma mistura 3:2 (volume/volume) de hexano e isopropanol (18 mL/g de gordura extraída) seguida por uma solução de sulfato de sódio 67 g/L (12 mL/g de gordura extraída). A obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) do leite se deu por catálise alcalina (0,4 mL de 5,4 mol/L de solução de metóxido de sódio + 1,75 mL de metanol) de acordo com Christie (1982) com modificações (CHOUINARD et al., 1999). A mistura foi neutralizada com ácido oxálico (1g de ácido oxálico em 30 mL de éter dietílico), com adição de cloreto de cálcio para remover resíduos de metanol.

Os EMAG foram determinados por cromatografia gasosa (modelo 6890 N; Agilent Technologies, Barueri-SP, Brasil), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 (100 m x 25 mm x 0,2 µm de espessura de filme (Varian Inc., Mississauga, Canadá). As condições de operação incluíram: temperatura de injeção e detecção a 250°C, gás hidrogênio (H<sub>2</sub>) como gás de arraste (1 mL/min) e para o detector de ionização de chama (35 mL/min), gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) como gás auxiliar (30 mL/min) e ar sintético (286 mL/min). O programa de temperatura foi: temperatura inicial de 45°C mantida por 4 min, a taxa de incremento na temperatura foi de 13°C/min até atingir 175°C, a qual foi mantida por 27 min, com novo aumento da temperatura até 215°C (4°C/min) e mantida por 35 min (CRUZ-HERNANDEZ et al., 2007). Os EMAG foram identificados por comparação com três EMAG padrões de referência (Supelco 37 mix 47885-U, Linoleic acid isomers mix 47791 e CLA isomers mix 05632; Sigma Aldrich®,

St. Louis, MO, USA) e com base na literatura (Kramer et al., 2001; Cruz-Hernandez et al., 2007).

### 5.6.3 Suplementos lipídicos

O perfil de ácidos graxos do MEGALAC-E (sais de cálcio) foi determinado por método de extração e metilação em etapa única ('one-step procedure') descrito originalmente por Sukhija e Palmquist (1988), com modificações (Jenkins and Palmquist, 2003). Basicamente, as modificações incluíram o uso de uma solução de metilação mais concentrada (10% de HCl em metanol) e incubação a 90°C por 2 h. Além disso, C13:0 em vez de C19:0 foi usado como padrão interno para determinação da concentração de ácidos graxos totais na amostra. Para determinação do perfil de ácidos graxos do CLA (Luta-CLA 60<sup>®</sup>), uma amostra de 40 µL foi misturada a 2 mL de hexano e adicionada de cloreto de cálcio (~ 200 mg); a solução foi então agitada em *vortex* e deixada descansar por 1 hora antes de ser transferida para frascos de 2 mL e injetada no cromatógrafo. As condições cromatográficas utilizadas foram as mesmas descritas previamente para determinação do perfil de ácidos graxos do leite.

### 5.6.4 Parâmetros sanguíneos

A determinação da concentração de AGNE foi feita por análise enzimático-colorimétrico (NEFA C; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) usando uma microplaca de 96 poços para ELISA. Os níveis plasmáticos de glicose foram determinados através de leitura direta (glicose oxidase imobilizada em membrana) em um analisador automático YSI 2007 (Bicochemistry Analyzer, Yellow Springs, EUA).

## 5.7 CÁLCULOS

Os valores iniciais obtidos para a contagem de células somáticas foram convertidos para escore linear utilizando a transformação logarítmica ( $\log \text{CCS} = \log_2 (\text{CCS}/100.000) + 3$ ) proposta por Dabdoub e Shook (1984).

Os índices de dessaturase foram calculados para cinco pares de ácidos graxos que representa o produto e substrato da enzima Estearoil-CoA Dessaturase ( $\Delta^9$ -dessaturase).

Onde, os pares de ácidos graxos foram C14:1 *cis*-9/C14:0, C16:1 *cis*-9/C16:0, C17:1 *cis*-9/C17:0, C18:1 *cis*-9/C18:0 e CLA *cis*-9, *trans*-11/C18:1 *trans*-11. Os índices foram calculados de acordo com definido por Kelsey et al. (2003) onde : índice dessaturase = produto da  $\Delta^9$ -dessaturase / (produto da  $\Delta^9$ -dessaturase + substrato da  $\Delta^9$ -dessaturase).

O balanço energético foi calculado para o dia 0 e o último (12°) dia de cada período experimental de acordo com a seguinte equação: Balaço energético (Mcal/d) = consumo de energia metabolizável (EM/d) – (EM manutenção (EMm) + EM lactação (EMI)/d). O consumo de EM foi calculado através da multiplicação entre o consumo de MS e o conteúdo de EM da dieta com os tratamentos (EM dieta + EM suplemento). Para a determinação da EM da dieta foi utilizado o sistema da Universidade de Langston (disponível em: <http://www.lusarexext.edu/goat/reasearch/me4.html>), que utiliza como base os nutrientes digestíveis totais (NDT), o qual foi determinado de acordo com Weiss; Conrad; Pierre (1993). A digestibilidade e a absorção dos ácidos graxos de ambos os suplementos foram assumidas como semelhantes.

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos à análise de variância usando o procedimento GLM (PROC GLM) do pacote estatístico SAS (SAS INSTITUTE, 2000). A soma de quadrados do tratamento foi decomposta com o uso de contrastes ortogonais polinomiais para testar a significância das respostas linear, quadrática e cúbica aos tratamentos experimentais. As médias de quadrados mínimos são apresentadas e os efeitos dos tratamentos foram declarados como significativos quando  $P < 0,05$ .

As relações entre o CLA *trans*-10, *cis*-12 presente na dieta e no perfil de ácidos graxos do leite e as variáveis avaliadas foram inicialmente examinadas através de regressão linear utilizando o procedimento REG (PROC REG). No caso de outros tipos de associação que não linear entre as variáveis, a análise de regressão foi feita empregando o procedimento NLIN (PROC NLIN), utilizando um modelo com um decaimento exponencial. O procedimento NLIN foi empregado através do seguinte modelo estatístico,  $y = \beta_0 * e^{-\beta_1 x} + c + \varepsilon$ , onde:  $y$  é o conteúdo ou produção de gordura,  $x$  é a dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 ou a sua concentração/produção no leite e o  $\varepsilon$  é o termo do erro na regressão. Os parâmetros  $\beta_0$  e  $\beta_1$  representam, respectivamente, a escala e a taxa do declínio exponencial e o  $c$  é constante da menor assíntota. Para as relações avaliadas através do procedimento

REG o modelo estatístico foi,  $y = \beta_0 + \beta_1 * x + \varepsilon$ , onde: onde o  $y$  é a concentração ou produção do CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite,  $x$  é a dose de CLA *trans*-10, *cis*-12. O  $\varepsilon$  representa o erro na regressão e os parâmetros  $\beta_0$  e  $\beta_1$  são os coeficientes de regressão.

Os dados encontrados fora dos resíduos “estudentizados” entre -2 e 2 foram considerados *outliers* e removidos da análise.



## 6. RESULTADOS

Durante o experimento, todos os animais consumiram toda a porção diária de concentrado, garantindo assim a completa ingestão dos suplementos lipídicos em cada tratamento. Não houve interação entre os níveis de CLA na dieta e as diferentes categorias de animais (multíparas e primíparas) então os dados foram agrupados.

O fornecimento de doses crescentes de CLA não alterou o consumo de MS da silagem, que foi, em média,  $0,85 \pm 0,26$  kg/d (média  $\pm$  DP). Do mesmo modo, o PV e o ECC também não sofreram efeitos com o aumento do nível de inclusão de CLA na dieta. O PV e ECC médios foram de  $45,98 \pm 6,19$  kg e  $2,75 \pm 0,36$ , respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito das doses crescentes de ácido linoleico conjugado sobre o desempenho, produção e composição do leite de cabras Toggenburg. (Com os dados de ambas categorias agrupados).

|                         | Tratamentos <sup>a</sup> |       |       |       | EPM <sup>d</sup> | Valor-P <sup>f</sup> |
|-------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|------------------|----------------------|
|                         | CLA0                     | CLA15 | CLA30 | CLA45 |                  | L <sup>e</sup>       |
| CMSS, kg/d <sup>b</sup> | 0,85                     | 0,86  | 0,82  | 0,84  | 0,04             | 0,73                 |
| PV, kg                  | 45,2                     | 45,4  | 46,6  | 46,8  | 0,43             | 0,44                 |
| ECC                     | 2,75                     | 2,75  | 2,72  | 2,78  | 0,06             | 0,83                 |
| Log CCS <sup>c</sup>    | 6,09                     | 5,68  | 6,02  | 6,38  | 0,29             | 0,37                 |
| Produção                |                          |       |       |       |                  |                      |
| Leite, kg/d             | 2,32                     | 2,37  | 2,41  | 2,35  | 0,07             | 0,67                 |
| Gordura, g/d            | 67,80                    | 57,70 | 46,88 | 40,34 | 2,58             | <0,01                |
| Proteína, g/d           | 63,69                    | 65,48 | 65,44 | 65,51 | 1,83             | 0,53                 |
| Lactose, g/d            | 88,33                    | 90,93 | 91,85 | 89,81 | 2,49             | 0,64                 |
| Concentração            |                          |       |       |       |                  |                      |
| Gordura, %              | 2,90                     | 2,40  | 1,94  | 1,72  | 0,08             | <0,01                |
| Proteína, %             | 2,76                     | 2,77  | 2,75  | 2,79  | 0,03             | 0,52                 |
| Lactose, %              | 3,81                     | 3,82  | 3,80  | 3,82  | 0,03             | 0,85                 |

<sup>a</sup> Os tratamentos foram 0, 15, 30 e 45 g/d de CLA (CLA0, CLA15, CLA30 e CLA45, respectivamente)

<sup>b</sup> Consumo de matéria seca de silagem

<sup>c</sup> Contagem de células somáticas. ( $\log \text{ CCS} = \log_2 (\text{CCS}/100.000) + 3$ )

<sup>d</sup> Erro padrão da média (n=8).

<sup>e</sup> Efeito linear da resposta ao CLA. Não foi observado efeito quadrático e cúbico

<sup>f</sup> Significância (P<0,05). Não houve efeito de interação entre tratamentos e quadrado latino para as variáveis.

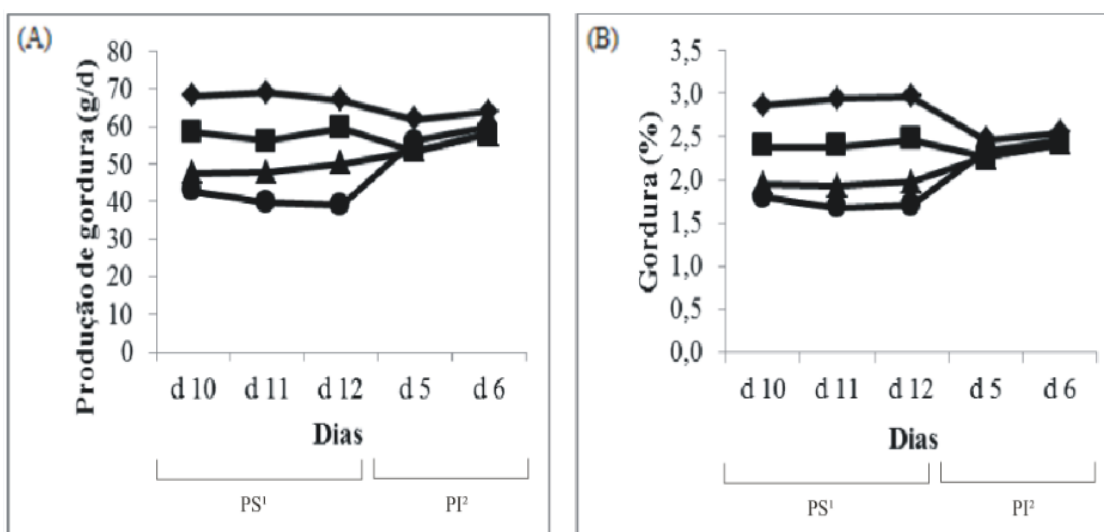
Fonte: produção do próprio autor

A produção de leite, a contagem de células somática (CCS), o teor e a produção de proteína e lactose do leite não diferiram entre os tratamentos (Tabela 3). Por outro lado, a

concentração e produção de gordura do leite foram reduzidas linearmente com o aumento das doses de CLA. Em relação ao tratamento CLA0, os tratamentos CLA15, CLA30 e CLA45, resultaram, respectivamente, em uma queda de 17,2, 33,1 e 41,0% no teor de gordura e 14,9, 30,9 e 40,5% na produção de gordura do leite.

A partir da avaliação da variação temporal do conteúdo e produção da gordura durante (dias 10, 11 e 12) dos PS e entre (dias 5 e 6) PI, foi possível visualizar que houve um aumento da produção (Figura 3, A) e do teor (Figura 3, B) da gordura do leite em resposta ao tratamento Controle (CLA0). A partir desta observação, assumindo o conteúdo e a produção da gordura do leite do dia 0 como 100% foi possível comparar percentualmente o efeito estabelecido dos tratamentos (dia 12) em relação a não suplementação lipídica (dia 0). Em relação ao dia 0, em média, o tratamento controle aumentou a produção de gordura em 18,7%, enquanto os tratamentos CLA15, CLA30 e CLA45, reduziram, respectivamente, a produção de gordura em 8,1, 26,1 e 32,7% (Figura 4, A). Da mesma forma, o percentual de gordura do leite aumentou em 26,4% com o tratamento controle na dieta, sendo que, os demais tratamentos, CLA15, CLA30 e CLA45, respectivamente, uma reduziram em 4,5, 21,5 e 28,3% esta mesma variável (Figura 4, B).

Figura 3 - Dias de avaliação da produção (A) e percentagem (B) de gordura do leite do leite de cabras Toggenburg suplementadas com CLA0 (♦), CLA15 (■), CLA30 (▲) e CLA45 (●).

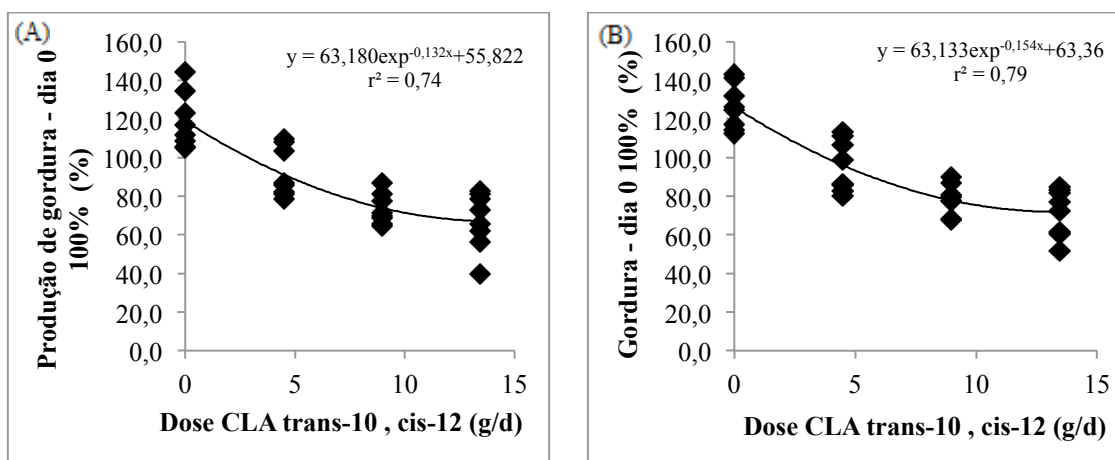


<sup>1</sup> Período de Suplementação.

<sup>2</sup> Período de Intervalo.

Fonte: produção do próprio autor

Figura 4 - Relação entre produção (A) e percentagem (B) de gordura do leite de cabras Toggenburg, considerando o dia 0 como 100%, e doses crescentes de CLA *trans*-10, *cis*-12.



Fonte: produção do próprio autor

A composição da gordura do leite foi modificada pelas doses de CLA *trans*-10, *cis*-12 (Tabela 4), havendo uma redução linear ( $P < 0,05$ ) dos seguintes ácidos graxos: C6:0, C8:0, C10:0, C11:0, C12:0, C13:0, C14:1 *cis*-9, C16:0, C16:1 *cis*-9, C17:1 *cis*-9, C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15 e C20:4 n-6. Já os ácidos graxos C18:0, C18:1 *trans*-9, C18:1 *trans*-10, C18:1 *trans*-11, C18:1 *trans*-12, CLA *cis*-9, *trans*-11, CLA *trans*-10, *cis*-12 e C20:1 *cis*-11 aumentaram linearmente com as doses de CLA. Quando agrupados de acordo com a origem, os ácidos graxos oriundos da síntese *de novo* (<C16) e/ou pré-formados (C16) sofreram redução com o fornecimento das diferentes doses de CLA (Tabela 4). Os ácidos graxos captados da circulação sanguínea (>C18), por sua vez, aumentaram linearmente de acordo com os níveis crescentes de CLA (Tabela 4). Este efeito, foi caracterizado principalmente, pelo incremento linear nos ácidos graxos C18:1 *trans* ( $\Sigma$  C18:1 *trans*, Tabela 4).

Tabela 4 - Perfil de ácidos graxos (AG) do leite de cabras Toggenburg suplementadas com níveis crescentes do ácido linoleico conjugado (CLA).

| AG (g/100g AG) <sup>b</sup> | Tratamentos <sup>a</sup> |       |       |       | EPM <sup>c</sup> | Valor-P <sup>c</sup> |
|-----------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|------------------|----------------------|
|                             | CLA0                     | CLA15 | CLA30 | CLA45 |                  | L <sup>d</sup>       |
| C4:0                        | 2,87                     | 3,05  | 2,96  | 2,79  | 0,07             | 0,30                 |
| C6:0                        | 2,31                     | 2,05  | 1,80  | 1,60  | 0,05             | <0,01                |
| C8:0                        | 2,35                     | 1,94  | 1,59  | 1,40  | 0,06             | <0,01                |
| C10:0                       | 7,63                     | 6,44  | 5,36  | 4,82  | 0,20             | <0,01                |

|   |       |       |       |       |       |       |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| C11:0   | 0,20  | 0,14  | 0,10  | 0,07  | 0,01  | <0,01 |
| C12:0   | 3,50  | 3,08  | 2,68  | 2,61  | 0,11  | <0,01 |
| C13:0   | 0,05  | 0,05  | 0,07  | 0,08  | 0,005 | <0,01 |
| C14:0   | 8,59  | 8,7   | 8,58  | 8,67  | 0,29  | 0,91  |
| C14:1 <i>cis</i> -9                                     | 0,09  | 0,07  | 0,05  | 0,04  | 0,004 | <0,01 |
| C15:0   | 0,52  | 0,57  | 0,58  | 0,64  | 0,02  | <0,01 |
| C15:0 <i>iso</i>  | 0,20  | 0,19  | 0,22  | 0,20  | 0,01  | 0,39  |
| C15:0 <i>anteiso</i>                                    | 0,32  | 0,37  | 0,34  | 0,36  | 0,02  | 0,27  |
| C16:0   | 24,33 | 24,22 | 23,19 | 21,62 | 0,36  | <0,01 |
| C16:1 <i>cis</i> -9                                     | 0,62  | 0,43  | 0,39  | 0,33  | 0,02  | <0,01 |
| C17:0   | 0,38  | 0,39  | 0,42  | 0,42  | 0,01  | 0,12  |
| C17:1 <i>cis</i> -9                                     | 0,14  | 0,12  | 0,11  | 0,09  | 0,01  | <0,01 |
| C18:0   | 12,83 | 15,39 | 17,52 | 19,07 | 0,49  | <0,01 |
| C18:1 <i>trans</i> -4                                   | 0,03  | 0,04  | 0,04  | 0,03  | 0,004 | 0,44  |
| C18:1 <i>trans</i> -5                                   | 0,03  | 0,03  | 0,04  | 0,04  | 0,004 | 0,19  |
| C18:1 <i>trans</i> -6+ <i>trans</i> -7+ <i>trans</i> -8 | 0,21  | 0,26  | 0,30  | 0,28  | 0,02  | <0,01 |
| C18:1 <i>trans</i> -9                                   | 0,30  | 0,34  | 0,43  | 0,42  | 0,02  | <0,01 |
| C18:1 <i>trans</i> -10                                  | 0,54  | 0,92  | 1,21  | 1,40  | 0,04  | <0,01 |
| C18:1 <i>trans</i> -11                                  | 1,27  | 1,52  | 2,10  | 2,21  | 0,13  | <0,01 |
| C18:1 <i>trans</i> -12                                  | 0,48  | 0,61  | 0,72  | 0,82  | 0,04  | <0,01 |
| C18:1 <i>trans</i> -13+ <i>trans</i> -14                | 0,53  | 0,71  | 0,75  | 0,68  | 0,04  | 0,01  |
| C18:1 <i>cis</i> -9 + <i>trans</i> -15                  | 18,70 | 17,60 | 16,59 | 16,4  | 0,63  | 0,07  |
| C18:1 <i>trans</i> -16                                  | 0,36  | 0,37  | 0,39  | 0,41  | 0,03  | 0,25  |
| C18:1 <i>cis</i> -11                                    | 1,38  | 1,23  | 1,28  | 1,34  | 0,07  | 0,80  |
| C18:1 <i>cis</i> -12                                    | 0,80  | 1,15  | 1,08  | 1,00  | 0,07  | 0,10  |
| C18:1 <i>cis</i> -13                                    | 0,08  | 0,09  | 0,09  | 0,08  | 0,008 | 0,73  |
| C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -12                    | 0,02  | 0,02  | 0,01  | 0,01  | 0,006 | 0,24  |
| C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12                      | 2,80  | 2,58  | 2,68  | 2,74  | 0,08  | 0,82  |
| CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11                      | 0,53  | 0,56  | 0,71  | 0,82  | 0,03  | <0,01 |
| CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12                     | 0,03  | 0,14  | 0,29  | 0,47  | 0,02  | <0,01 |
| C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15       | 0,15  | 0,14  | 0,13  | 0,13  | 0,004 | <0,01 |
| C18 n3  | 0,01  | 0,01  | 0,007 | 0,005 | 0,003 | 0,01  |
| C20:0   | 0,21  | 0,23  | 0,24  | 0,24  | 0,005 | <0,01 |
| C20:1 <i>cis</i> -11                                    | 0,04  | 0,04  | 0,05  | 0,05  | 0,002 | <0,01 |
| C20:3 n-6   | 0,02  | 0,02  | 0,02  | 0,03  | 0,003 | 0,35  |
| C20:4 n-6   | 0,18  | 0,15  | 0,15  | 0,14  | 0,006 | <0,01 |
| C22:0   | 0,04  | 0,05  | 0,06  | 0,05  | 0,003 | <0,01 |
| C24:0   | 0,03  | 0,03  | 0,02  | 0,03  | 0,005 | 0,99  |
| Outros  | 3,91  | 3,90  | 4,61  | 5,32  | 0,20  | <0,01 |

<sup>a</sup> Os tratamentos foram 0, 15, 30 e 45 g/d de CLA (CLA0, CLA15, CLA30 e CLA45, respectivamente).  
<sup>b</sup> Ácido Graxo.

<sup>c</sup> Erro padrão da média (n=8).

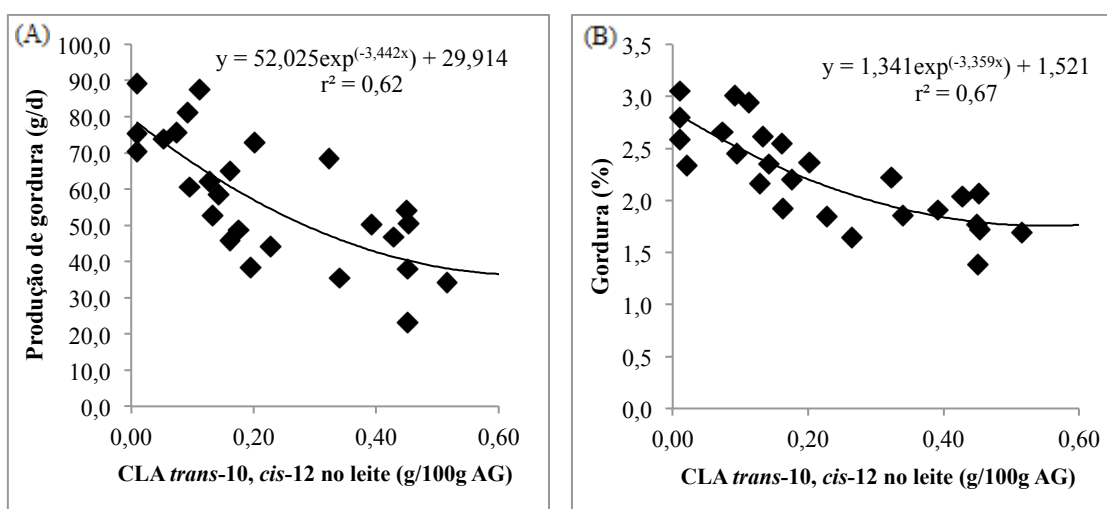
<sup>d</sup> Efeito linear (L) da reposta ao CLA. Não foi observado efeito quadrático e cúbico.

<sup>e</sup> Significância (P<0,05).

Fonte: produção do próprio autor

A concentração do CLA *trans*-10, *cis*-12 no perfil de ácidos graxos do leite foi aumentada de acordo com as doses de CLA. Em comparação com ao tratamento CLA0, os crescentes níveis de CLA (CLA15, CLA30 e CLA45) aumentaram em 366,7, 866,7 e 1466,7% a concentração deste isômero. Este aumento na concentração do CLA *trans*-10, *cis*-12 apresentou uma relação com o padrão de depressão na gordura do leite das cabras, sendo uma relação inversa e não linear com a gordura do leite, apresentada na Figura 5.

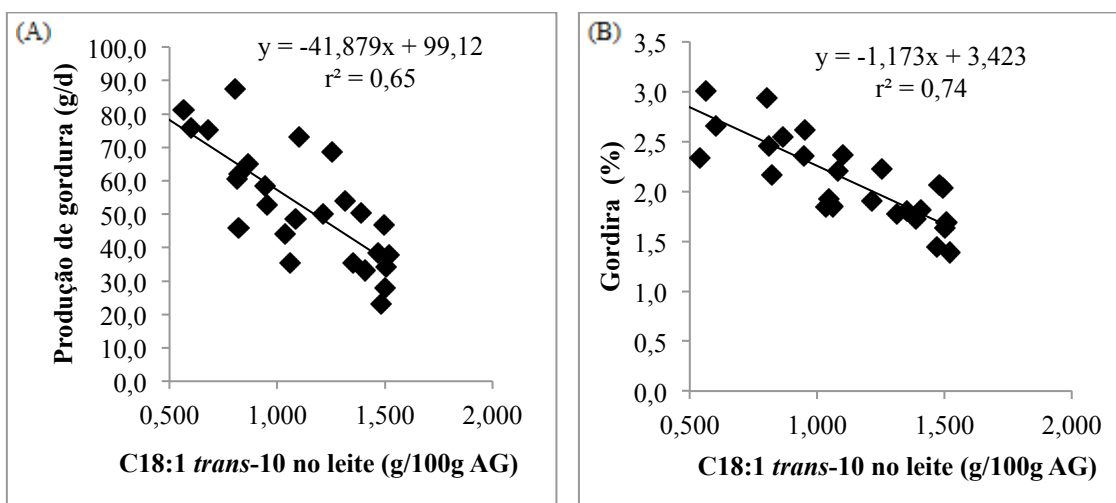
Figura 5 - Relação entre concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite de cabras e a redução da produção (A) e teor (B) de gordura do leite de cabras Toggenburg.



Fonte: produção do próprio autor

Outro ácido graxo que apresentou uma relação inversa, porém, linear com a gordura do leite, foi o C18:1 *trans*-10 (Figura 6).

Figura 6 - Relação entre concentração de C18:1 *trans*-10 no leite e a redução da produção (A) e teor (B) de gordura do leite de cabras Toggenburg.



Fonte: produção do próprio autor

Alguns pares de ácidos graxos representam a relação produto/substrato da enzima Estearoil-CoA Dessaturase ( $\Delta 9$ -dessaturase) e são uma medida indireta da sua atividade na glândula mamária. Os índices de dessaturase foram calculados para cinco pares de ácidos graxos (14:1/14:0, 16:1/16:0, 17:1/17:0 18:1*cis*-9/18:0 e CLA *cis*-9, *trans*-11/C18:1 *trans*-11) que representam a relação produto/substrato para esta enzima (Tabela 5). Em relação ao CLA0, o fornecimento de doses crescentes de CLA reduziu linearmente quatro índices de dessaturase, sendo o índice CLA *cis*-9, *trans*-11/C18:1 *trans*-11o único não alterado.

Tabela 5 - Efeito das doses crescentes de CLA nas diferentes origens do perfil de ácidos graxos e índices de dessaturase do leite de cabras Toggenburg.

| AG (g/100g de AG) <sup>b</sup>              | Tratamentos <sup>a</sup> |       |       |       | EPM <sup>c</sup> | P <sup>e</sup> |
|---|--------------------------|-------|-------|-------|------------------|----------------|
|   | CLA0                     | CLA15 | CLA30 | CLA45 |                  | L <sup>d</sup> |
| Somatório                                   |                          |       |       |       |                  |                |
| < C16                                       | 28,66                    | 26,67 | 24,35 | 23,30 | 0,66             | <0,01          |
| C16   | 25,17                    | 24,65 | 23,57 | 21,95 | 0,35             | <0,01          |
| > C16                                       | 42,15                    | 44,78 | 47,46 | 49,42 | 0,78             | <0,01          |
| ∑ C18:1- <i>trans</i>                       | 3,75                     | 4,81  | 5,98  | 6,29  | 0,23             | <0,01          |
| ∑ C18:1- <i>cis</i>                         | 20,96                    | 20,07 | 19,05 | 18,82 | 0,66             | 0,12           |
| ∑ C18:1                                     | 24,71                    | 24,89 | 25,04 | 25,11 | 0,55             | 0,59           |
| ∑ Saturados                                 | 63,59                    | 66,91 | 65,75 | 64,71 | 1,54             | 0,76           |
| ∑ AGMI <sup>f</sup>                         | 25,48                    | 25,55 | 25,63 | 25,62 | 0,57             | 0,84           |
| ∑ AGPI <sup>g</sup>                         | 3,76                     | 3,63  | 4,01  | 4,34  | 0,10             | <0,01          |
| Índices de dessaturase <sup>h</sup>         |                          |       |       |       |                  |                |
| 14:1/14:0+14:1                              | 0,01                     | 0,009 | 0,006 | 0,005 | 0,0005           | <0,01          |
| 16:1/16:0+16:1                              | 0,019                    | 0,018 | 0,016 | 0,015 | 0,0007           | <0,01          |
| 17:1/17:0+17:1                              | 0,27                     | 0,24  | 0,21  | 0,18  | 0,01             | <0,01          |
| 18:1 <i>cis</i> -9/18:0+18:11 <i>cis</i> -9 | 0,59                     | 0,53  | 0,49  | 0,46  | 0,01             | <0,01          |
| CLA <sup>i</sup>                            | 0,30                     | 0,27  | 0,26  | 0,27  | 0,01             | 0,09           |

<sup>a</sup> Os tratamentos foram 0, 15, 30 e 45 g/d de CLA (CLA0, CLA15, CLA30 e CLA45, respectivamente).

<sup>b</sup> Ácido Graxo.

<sup>c</sup> Erro padrão da média (n=8).

<sup>d</sup> Efeito linear (L) da resposta ao CLA. Não foi observado efeito quadrático e cúbico.

<sup>e</sup> Significância (P<0,05).

<sup>f</sup> Ácidos graxos Monoinsaturados.

<sup>g</sup> Ácidos graxos Poli-insaturados.

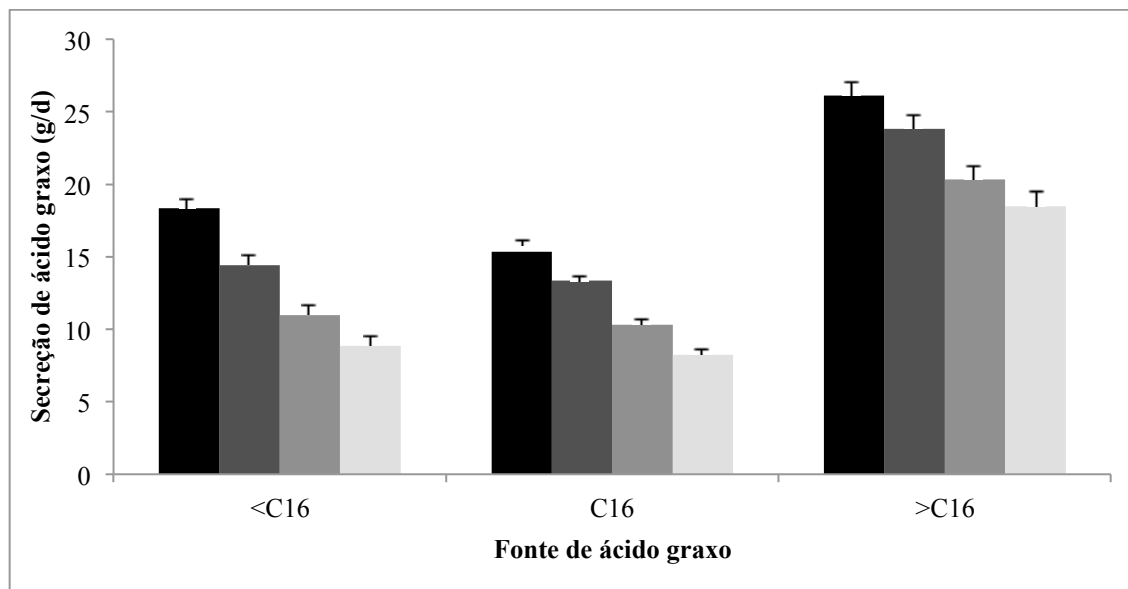
<sup>h</sup> Valores representam a relação produto/(produto + substrato) para Δ<sup>9</sup>-dessaturase.

<sup>i</sup> C18:2 *cis*-9, *trans*-11/ C18:2 *cis*-9, *trans*-11+ C18:1 *trans*-11.

Fonte: produção do próprio autor

O fornecimento de doses crescentes de CLA resultou na redução da secreção de todos os ácidos graxos que, quando agrupados de acordo com a sua origem, denotam uma maior depressão da secreção dos ácidos graxos provenientes da síntese *de novo* (Figura 7). Entretanto, alguns ácidos graxos tiveram a sua secreção aumentada conforme o incremento da dose de CLA.

Figura 7 - Secreção de ácidos graxos do leite de cabras Toggenburg em resposta ao fornecimento das doses crescentes de CLA *trans*-10, *cis*-12 (CLA0 (■), CLA15 (■), CLA30 (■) e CLA45 (■)) de acordo com a origem dos ácidos graxos: oriundos da síntese *de novo* (<C16), extraídos da circulação sanguínea (>C16) e de ambas as fontes (C16:0 e C16:1).

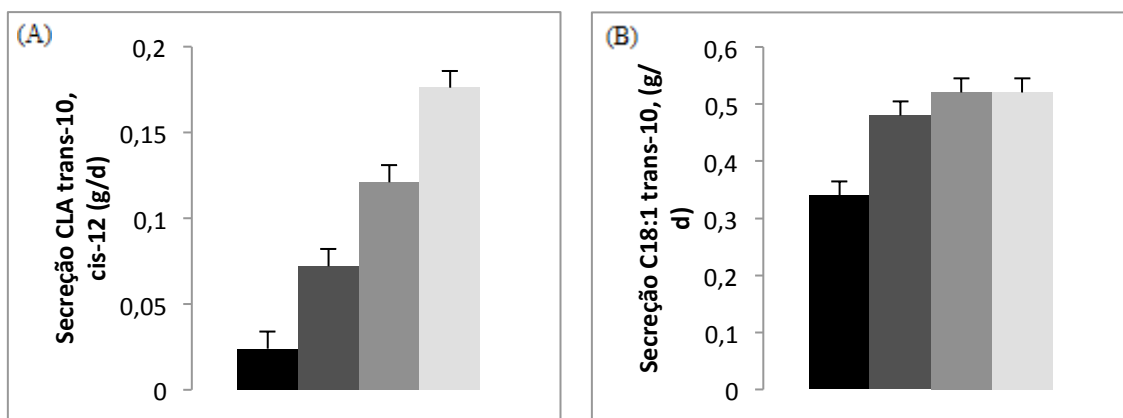


Fonte: produção do próprio autor

A secreção do CLA *trans*-10, *cis*-12 aumentou linearmente ( $P < 0,01$ ) (Figura 8, A) de 0,02 (CLA0) para 0,07, 0,12 e 0,18 g/d para os tratamentos CLA15, CLA30 e CLA45, respectivamente. O ácido graxo C18:1 *trans*-10 também teve a sua secreção aumentada linearmente ( $P < 0,01$ ) (Figura 8, B). O valor inicial foi 0,34 para o tratamento CLA0 aumentando para 0,48 0,52 e 0,52 g/d para os tratamentos CLA15, CLA30 e CLA45, respectivamente. Outros ácidos graxos como o CLA *cis*-9, *trans*-11, C18:1 *trans*-11 e outros C18:1 *trans* não sofreram efeitos dos tratamentos.



Figura 8 - Efeito de doses de CLA *trans*-10, *cis*-12 (CLA0 (■), CLA15 (■), CLA30 (■) e CLA45 (■)) sobre a secreção de CLA *trans*-10, *cis*-12 (A) e a secreção do C18:1 *trans*-10 (B) no leite de cabras Toggenburg.



Fonte: produção do próprio autor

Com base na secreção do CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite foi estimada a bio-hidrogenação ruminal deste ácido graxo. Utilizando a Equação 5 proposta por de Veth et al. (2004), estimou-se uma bio-hidrogenação média de 95,7, 95,2 e 94,8%, para os tratamentos CLA15, CLA30 e CLA45 (respectivamente), sendo que estes valores não diferiram entre si ( $P>0,05$ ) resultando em 0,19, 0,43 e 0,70 g/d de CLA *trans*-10, *cis*-12 chegando ao abomaso, respectivamente, para os tratamentos CLA15, CLA30 e CLA45. Para este mesmo isômero e utilizando como base a sua secreção no leite foi calculada a eficiência de transferência da dose fornecida. Através da correção com a quantidade de CLA *trans*-10, *cis*-12 observada no tratamento CLA0 (controle), foi encontrado uma eficiência de transferência de 1,18, 1,17 e 1,21% para os tratamentos CLA15, CLA30 e CLA45, respectivamente, sendo que as mesmas não diferiram entre si ( $P>0,05$ ).

O balanço energético (BE) calculado está apresentado na Tabela 6. As doses crescentes de CLA não afetaram o BE no dia 0 tanto para as primíparas como para as multíparas. No entanto, no dia 12, o BE de ambas as categorias foi afetado positivamente, aumentando de forma linear ( $P<0,01$ ). Os parâmetros metabólicos avaliados (glicose e ácidos graxos não esterificados (AGNE)), não foram afetados ( $P>0,05$ ) pelas doses crescentes de CLA.

Tabela 6 - Balanço energético de cabras leiteiras Toggenburg determinado nos dias 0 e 12 do período de suplementação de doses crescentes de CLA.

|                                | Tratamentos <sup>c</sup> |       |       |       | EPM <sup>f</sup> | Valor-P <sup>g</sup> |
|--------------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|------------------|----------------------|
|                                | CLA0                     | CLA15 | CLA30 | CLA45 |                  | L <sup>e</sup>       |
| <b>Primíparas</b>              |                          |       |       |       |                  |                      |
| BE dia 0, Mcal/d <sup>d</sup>  | 0,49                     | 0,40  | 0,59  | 0,68  | 0,21             | 0,42                 |
| BE dia 12, Mcal/d <sup>d</sup> | 0,40                     | 0,37  | 0,60  | 0,55  | 0,15             | <0,01                |
| <b>Múltipara</b>               |                          |       |       |       |                  |                      |
| BE dia 0, Mcal/d <sup>d</sup>  | 0,88                     | 0,67  | 0,72  | 0,97  | 0,21             | 0,42                 |
| BE dia 12, Mcal/d <sup>d</sup> | 0,32                     | 0,75  | 0,88  | 1,24  | 0,15             | <0,01                |

<sup>c</sup> Os tratamentos foram 0, 15, 30 e 45 g/d de CLA (CLA0, CLA15, CLA30 e CLA45, respectivamente)

<sup>d</sup> Balanço energético (BE) referente aos dias 0 e 12 do período experimental; BE=consumo de energia metabolizável (EM) – (EM manutenção + EM lactação).

<sup>e</sup> Efeito linear (L) da resposta ao CLA

<sup>f</sup> Erro padrão da média (n=8).

<sup>g</sup> Significância (P<0,05)

Fonte: produção do próprio autor

## 7. DISCUSSÃO

Dentre os isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA), o *trans*-10, *cis*-12 é o único que apresenta uma série de evidências que indicam a sua influência na síntese da gordura do leite. Essa constatação se baseia em experimentos que utilizaram infusões abomasais (BAUMGARD et al., 2000; BAUMGARD et al., 2001) ou formas protegidas da bio-hidrogenação ruminal desse isômero (de VETH et al., 2005). Dessa forma, os efeitos anti-lipogênicos observados no presente experimento são atribuídos ao isômero *trans*-10, *cis*-12, pois o isômero *cis*-9 *trans*-11, também presente no suplemento, não possui efeitos sobre a lipogênese mamária (BAUMGARD et al., 2000).

O aumento gradativo das doses de CLA *trans*-10, *cis*-12 resultou em quedas crescentes no teor e produção da gordura do leite das cabras, caracterizando uma resposta dose-dependente. A comparação inicial da relação entre dose-resposta obtida neste trabalho com outros estudos com cabras, sugere uma magnitude de depressão da gordura do leite semelhante entre os trabalhos, apesar de o presente estudo ter utilizado uma fonte desprotegida da bio-hidrogenação ruminal. Um dos fatores que possivelmente contribuiu para a observação deste efeito foi o aumento da produção e teor de gordura do leite das cabras quando suplementadas apenas com o tratamento controle (CLA0). Uma maneira de visualizar este efeito foi através da comparação da produção e teor de gordura do leite entre os dias 0 e 12 nos PS. Considerando os valores obtidos no dia 0 como 100%, foi possível fazer uma correção e determinar o efeito dos tratamentos (dia 12) em relação ao período de não suplementação lipídica. Como a comparação inicial entre os tratamentos eram feitas com base nos valores obtidos no dia 12 de PS, o aumento na gordura do leite causado pelo controle deu a falsa impressão de uma maior redução. Dessa forma, a redução no teor e produção de gordura do leite apresentados na Figura 4 após a correção são menores que o inicialmente encontrado. Esta ação do tratamento controle (Megalac-E) sobre a gordura do leite corrobora os resultados de experimentos prévios nos quais a adição de gordura na dieta de cabras levou ao aumento do teor de gordura do leite (BERNARD et al., 2009a; BERNARD et al., 2009b; SHINGFIELD et al., 2009b).

A redução da gordura causada pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 pode culminar na melhoria no aporte energético, visto que a gordura do leite representa mais do que 50% do custo energético para a síntese do leite (TYRELL et al., 1965). Esta melhora no aporte energético foi demonstrada através do balanço energético (Tabela 6), que já era positivo.

Apesar disto, não houve alterações de indicadores como o peso vivo, ECC ou metabólitos sanguíneos associados à homeostase energética. No entanto, cabe ressaltar, que a não observação em alterações de medidas como o ECC pode ser devido à falta de sensibilidade que envolve essa medida (WILDMAN et al., 1982); ou no caso dos AGNE, que nem sempre refletem o BE, não tendo os seus níveis reduzidos com o aumento do BE (KAY et al. 2007). Entretanto isto não significa que não possa haver alterações no metabolismo animal em resposta a este isômero de CLA. Segundo Harvatine, Perfield e Bauman (2009), a redução da gordura do leite de vacas é acompanhada por um aumento na expressão de enzimas lipogênicas no tecido adiposo, fator que pode representar o aumento das reservas corporais em situações de suplementação deste isômero de CLA que quando medida de uma forma menos sensível, como o ECC é passível de não ser notada.

A energia economizada pelo fornecimento do isômero *trans*-10, *cis*-12 pode resultar na partição de nutrientes para outras características produtivas (ex: produção de leite). No entanto, aparentemente, esta partição de nutrientes tende a estar relacionada com o *status* energético do animal. Condições como início da lactação ou quando os animais encontram-se em pastagens, geram um balanço energético negativo, sendo as situações onde ocorre a partição de nutrientes (KAY et al., 2006; KAY et al., 2007; MEDEIROS et al., 2010). Com base nos cálculos apresentados na Tabela 6 e no período de lactação dos animais do presente experimento, percebe-se que os animais se encontravam em balanço energético positivo. Este fato pode suportar a não observação de modificações da produção de leite, do conteúdo de sólidos não gordurosos e da produção desses sólidos do leite.

A observação dos efeitos do CLA *trans*-10, *cis*-12 sobre a gordura do leite nos leva a observarmos duas situações no presente trabalho: **1ª)** A escolha das doses - o critério aqui empregado se baseou em Oliveira et al., (2008), que forneceu o mesmo suplemento de CLA para ovelhas lactantes. Segundo esses autores, a dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 escolhida se baseou em uma possível bio-hidrogenação de 95%, sendo que, a quantidade esperada do isômero que deveria alcançar o abomaso e resultar em uma depressão aproximada de 20 a 25% da gordura do leite era de 0,4 g/d, conforme descrito previamente por Lock et al. (2006). As doses de CLA *trans*-10, *cis*-12 aqui empregadas reproduziram 0, 50, 100 e 150 % da dose utilizada por Oliveira et al. (2008), e representam respectivamente os tratamentos CLA0, CLA15, CLA30 e CLA45; **2ª)** A forma lipídica (ésteres metílicos) do CLA *trans*-10, *cis*-12 - o uso de ésteres metílicos, uma forma não protegida sequer parcialmente da bio-hidrogenação, aparentemente não se mostrou deletério para os animais

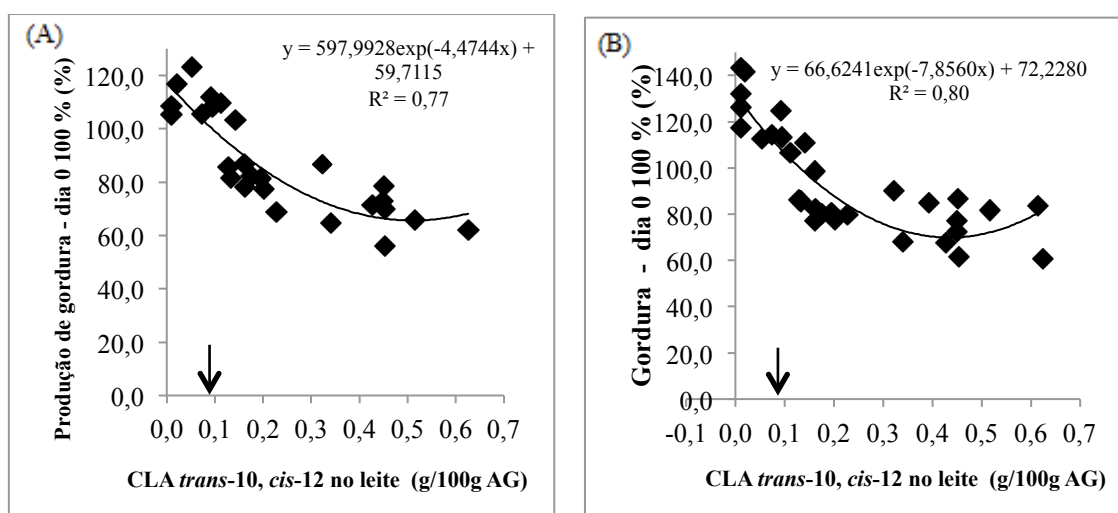
e resultou em ações conhecidas deste isômero de CLA em cabras. Isso vem ao encontro de estudos com vacas lactantes que avaliaram os efeitos de diferentes formas dos suplementos (ésteres metílicos vs. ácido graxo livre) infundidos no abomaso resultando em depressão da gordura do leite (de VETH et al., 2004).

A depressão da gordura do leite também pôde ser relaciona com teor de CLA *trans*-10, *cis*-12 (g/100g de AG) no leite (Figura 5). Essa relação também foi observada em experimentos com cabras (SHINGFIELD et al., 2009b) e vacas (de VETH et al., 2004). Com o intuito de comparar os efeitos do isômero *trans*-10, *cis*-12 na produção de gordura do leite de espécies de ruminantes a equação n°3 ( $y = -48,36 + 50,17 * \exp^{-7,0165}$ ) desenvolvida por de VETH et al. (2004) para vacas foi utilizada. Esta equação utiliza como variável independente o teor deste isômero de CLA no leite e através dela foi possível visualizar que para um mesmo teor de CLA *trans*-10, *cis*-12, há uma menor depressão da gordura do leite em cabras. Em média, os tratamentos CLA15, CLA30 e CLA45 resultaram, respectivamente, em 0,14, 0,29 e 0,47 g/100g do CLA *trans*-10, *cis*-12 na gordura do leite, e isto foi associado a uma depressão de 8,1, 26,1 e 32,7% da secreção de gordura do leite. Quando esses valores médios da concentração do CLA *trans*-10, *cis*-12 são aplicados nesta equação, reduções na produção de gordura do leite foram de 29,1, 40,1 e 45,8%, sendo os dois últimos valores, próximos ao ponto máximo da depressão da gordura do leite registrada, que é de 50% (BAUMGARD et al., 2001; BAUMAN et al., 2008). Essa discrepância de valores entre caprinos e bovinos sugerem uma menor sensibilidade inerente aos caprinos, uma suposição também já levantada em outros trabalhos com cabras (ANDRADE e SCHIMIDELY, 2006; LOCK et al., 2008; SHINGFIELD et al., 2009). Outro fator que sugere uma maior insensibilidade em cabras perante as outras espécies de ruminantes, pode se basear nos efeitos do CLA *trans*-10, *cis*-12 sobre ovelhas observados por Oliveira et al. (2012). Segundo esses autores, a suplementação de 8,97 g/d de CLA *trans*-10, *cis*-12 produziu efeito deletérios sobre a produção de leite, o conteúdo e produção de lactose do leite, produção de proteína do leite e acarretou no aumento da CCS do leite e ainda, a completa parada da secreção leite por uma ovelha recebendo o tratamento com CLA *trans*-10, *cis*-12. Ainda segundo esses autores, esses efeitos podem estar associados com uma possível involução mamária e/ou apoptose, causada por uma alta dose de deste ácido graxo. A dose de 8,97 g/d de CLA *trans*-10, *cis*-12 utilizada por Oliveira et al. (2012) corresponde ao tratamento CLA30 do

presente experimento, no entanto, aqui não ocorreu nenhuma alteração deletéria da composição do leite nem na maior dose utilizada (CLA45).

A menor sensibilidade das cabras ao CLA *trans*-10, *cis*-12 aparenta ser ainda menor em menores concentrações deste ácido graxo no leite. Na Figura 9 é apresentado o mesmo princípio de comparação entre o dia 0 (sem suplementação lipídica) e o dia 12 (efeito estabelecido dos tratamentos) mostrado anteriormente. Por meio deste gráfico, é possível visualizar que em torno da concentração de 0,1 g/100g de AG, de CLA *trans*-10, *cis*-12 na gordura do leite, alguns animais não apresentaram redução da produção ou do teor de gordura do leite. Essa concentração, quando aplicada à Equação nº 3 de Veth et al. (2004) utilizada anteriormente, corresponderia a uma redução de aproximadamente 23% na produção de gordura do leite em vacas. Essa faixa de concentração engloba o tratamento CLA15 e que nos leva às seguintes suposições: **1)** nesse tratamento, a maior parte da gordura suplementada foi composta pelo Megalac-E que poderia ter influenciado, reduzindo os efeitos do CLA *trans*-10, *cis*-12; **2)** essa concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 representa uma variação pela qual os caprinos suportam o aumento do *trans*-10, *cis*-12 no leite sem serem acometidos de uma redução na secreção de gordura do leite.

Figura 9 - Relação entre a concentração do CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite e a produção (A) e o teor (B) de gordura do leite de cabras Toggenburg, onde o dia 0 é considerado como 100%.



Na primeira suposição, a redução da síntese da gordura do leite não teria sido observada em função de uma maior suplementação de gordura na dieta com uma baixa quantidade de CLA *trans*-10, *cis*-12. Dentre os fatores que poderiam desencadear este

efeito, um deles seria a própria suplementação de gordura em si, que tende a causar o aumento da gordura do leite caprino (CHILLIARD et al., 2003; CHILLIARD e FERLAY, 2004) e dessa forma, poderia haver uma atenuação dos efeitos do CLA *trans*-10, *cis*-12 na redução do teor de gordura do leite. Outro fator que pode influenciar a primeira situação seria o consumo de ácidos graxos de cadeia longa, que segundo Shingfield et al. (2009b) pode reduzir os efeitos da suplementação do CLA *trans*-10, *cis*-12. No tratamento CLA15 encontramos justamente a descrição conjunta desses fatores, pois o sabão de cálcio utilizado neste experimento (Megalac-E) se caracteriza por ter alto percentual da sua composição formado por ácidos graxos de cadeia longa e compunha cerca de 66% da gordura total suplementada nesse tratamento. Na segunda situação, encontramos um fator que seria inerente à espécie, onde a concentração de 0,1 g/100g de AG pode representar alguma das diferenças existentes entre caprinos e os demais ruminantes no que se refere à regulação do metabolismo lipídico mamário. Até o presente momento, o autor desconhece algum trabalho que tenha avaliado o efeito da suplementação do CLA *trans*-10, *cis*-12 na expressão de genes relacionados à lipogênese na glândula mamária em caprinos. Entretanto, baseando-se em trabalhos que mediram a expressão gênica de enzimas lipogênicas (Acetil-CoA Carboxilase e Sintase de Ácido Graxo) em resposta a suplementação lipídica na dieta de caprinos, é possível relacionar essa maior resistência dos caprinos a uma regulação pós-transcricional do metabolismo lipídico mamário, pois nesses trabalhos foram observadas alterações no perfil de ácidos graxos do leite sem concomitante alteração da expressão gênica destas enzimas (BERNARD et al., 2009a; BERNARD et al., 2009b; BERNARD et al., 2009c; OLLIER et al., 2009; BERNARD et al., 2011) e a ação conhecida do CLA *trans*-10, *cis*-12 é justamente sobre um fator de transcrição (SREBP) que coordena a expressão destas enzimas lipogênicas (HARVATINE e BAUMAN, 2006).

A gordura do leite é composta em sua maioria por ácidos graxos (JENSEN et al., 2002), cujo conjunto determina o perfil de ácidos graxos do leite. Os ácidos graxos que compõem esse perfil podem ser provenientes da síntese *de novo* (C4 até C14 e parte do C16) ou da captação da corrente sanguínea de ácidos graxos pré-formados ( $\geq$ C18 e parte do C16) oriundos da dieta e/ou da mobilização de tecidos (BAUMAN e GRIINARI, 2003). O CLA *trans*-10, *cis*-12 tem a capacidade de alterar esse perfil de ácidos graxos do leite através da redução da síntese da maioria dos ácidos graxos, porém, com maior efeito sobre aqueles provenientes da via da síntese *de novo*. A redução da síntese *de novo* dos ácidos

graxos ocorre devido a uma diminuição da expressão gênica de enzimas lipogênicas na glândula mamária (PIPEROVA et al., 2000; BAUMGARD et al., 2002a). Essas enzimas são reguladas por uma família de fatores de transcrição chamados de SREBP que possui uma função central no metabolismo de lipídios na glândula mamária bovina (BIONAZ e LOOR et al., 2008) e que, em situações onde ocorre a depressão da gordura do leite, há uma diminuição da sua expressão e da sua forma nuclear ativa (PETERSON et al., 2004; HARVATINE e BAUMAN, 2006).

Neste estudo, a inclusão de níveis crescentes de CLA *trans*-10, *cis*-12 na dieta acarretou em uma alteração do perfil de ácidos graxos com reduções do percentual (g/100g de AG) dos ácidos graxos  $\leq$ C16 e aumento do percentual (g/100g de AG) dos ácidos graxos  $>$ C16 (Tabela 4), indo ao encontro de experimentos prévios com vacas (BAUMGARD et al., 2001), ovelhas (LOCK et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2012) e cabras (SHINGFIELD et al., 2009). Este aumento no percentual de ácidos graxos  $>$ C16 se deve, principalmente, ao aumento no percentual dos ácidos graxos C18:0 e C18:1-*trans*. No entanto, este aumento pode apenas refletir uma associação entre as doses crescentes de um suplemento contendo ácidos graxos com 18 carbonos e o metabolismo ruminal dos ácidos graxos. Considerando que ácidos graxos na forma de ésteres metílicos também sofrem o processo de bio-hidrogenação (MAIA et al., 2010), o escape ruminal desses ácidos graxos mais reduzidos pode ter sido elevado conforme o aumento das doses do suplemento desprotegido da bio-hidrogenação. O aumento da incorporação de ácidos graxos pré-formados quando estes têm a sua disponibilidade aumentada é uma característica conhecida dos caprinos (CHILLIARD et al., 2003; CHILLIARD et al., 2007), assim, o aumento desses ácidos graxos no leite pode representar esse aumento da sua disponibilidade para a glândula mamária.

Dentre os ácidos graxos C18:1-*trans*, o que apresentou maiores incrementos na sua concentração conforme o aumento das doses de CLA *trans*-10, *cis*-12 foi o ácido graxo C18:1 *trans*-10. O C18:1 *trans*-10 é formado no rúmen em condições onde a bio-hidrogenação ruminal é alterada por certos fatores da dieta (alto concentrado/baixa forragem e/ou suplementação de óleos insaturados) que causam a síndrome da DGL mas neste experimento formou-se como intermediário da bio-hidrogenação parcial do próprio CLA *trans*-10, *cis*-12.

Neste trabalho, a suplementação lipídica contendo o CLA *trans*-10, *cis*-12 forneceu uma fonte para a possível formação do C18:1 *trans*-10 sem depender de uma alteração



específica no ambiente ruminal, pois estes dois ácidos graxos compõem uma mesma via da bio-hidrogenação, onde o CLA *trans*-10, *cis*-12 é o seu precursor (GRIINARI e BAUMAN 2003), permitindo que ocorresse maiores concentrações deste ácido graxo no leite que em outras situações dietéticas em caprinos (OLLIER et al., 2009; BERNARD et al., 2009a; BERNARD et al., 2009c; BERNARD et al., 2010). Apesar disso, a concentração observada do C18:1 *trans*-10 se mantém ainda bem abaixo dos valores encontrados em vacas (SHINGFIELD e GRIINARI, 2007), mesmo para o tratamento CLA45, que era a maior dose de CLA *trans*-10, *cis*-12. Bernard et al. (2009b) relataram uma situação semelhante, e descreveram um aumento da secreção desse ácido graxo e não encontraram redução na produção e no teor de gordura do leite ou alteração na expressão gênica ou atividade das enzimas lipogênicas na glândula mamária ou tecido adiposo de caprinos suplementados com óleo de linhaça ou de girassol em dietas a base de silagem de milho. No presente estudo, o aumento da concentração do C18:1 *trans*-10 e a sua relação com a queda na produção e teor de gordura do leite (Figura 6) pode, no entanto, refletir a sua relação com a bio-hidrogenação do CLA *trans*-10, *cis*-12. A ação direta do C18:1 *trans*-10 em caprinos ainda não foi testada mas, segundo resultados obtidos com vacas (LOCK et al., 2007) pode-se dizer que não há efeitos desse ácido graxo sobre a lipogênese mamária em determinadas concentração no leite. Em vacas, a ação C18:1 *trans*-10 ainda se mantém em impasse, pois alguns autores sugeriram um efeito direto desse ácido graxo quando avaliado em maiores doses (SHINGFIELD e GRIINARI, 2007; SHINGFIELD et al., 2009a).

A inclusão do CLA *trans*-10, *cis*-12 na dieta tem demonstrado inibir a atividade e a expressão gênica da enzima Esteroil-CoA Dessaturase tanto em estudos com cultivo celular de adipócitos de roedores (CHOI et al., 2000), como da glândula mamária de bovinos (BAUMGARD et al., 2002). Essa enzima catalisa a dessaturação dos ácidos graxos através da introdução de uma dupla ligação *cis* no carbono nove, um fator importante para a fluidez do leite (SHINGFIELD et al., 2010). A sua atividade na glândula mamária pode ser estimada através da relação produto/substrato para alguns pares de ácidos graxos que sofrem ação dessa enzima. Dentre os pares apresentados na Tabela 5, apenas a relação CLA *cis*-9, *trans*-11/C18:1 *trans*-11 não foi reduzida com o aumento da dose de CLA. Essa ausência de efeito do CLA *trans*-10, *cis*-12 sobre o índice CLA *cis*-9, *trans*-11/C18:1 *trans*-11 + *cis*-9, *trans*-11 pode ser relacionado com a presença deste isômero de CLA no suplemento utilizado nos tratamentos, refletindo apenas uma

transferência para o leite. Ao avaliar os outros índices percebemos que a dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 que efetivamente causou uma redução foi a partir daquela do tratamento CLA30. Isto corrobora o observado em vacas que é necessário uma dose CLA *trans*-10, *cis*-12 que cause uma redução em torno de 25% na produção de gordura do leite para que inicie uma redução da dessaturação dos ácidos graxos na glândula mamária (BAUMGARD et al., 2001). Os relatos de Lock et al. (2008) demonstraram uma situação semelhante ao observado no presente trabalho, onde, somente a dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 que reduziu a produção de gordura em 21% foi capaz de reduzir os índices de dessaturase em cabras. O único índice que apresenta redução no tratamento CLA15 é o 18:1/18:0, no entanto, esses números devem ser olhados com cautela. Ao analisar a Tabela 4, podemos ver que não houve diferença na redução da concentração do ácido oleico (C18:1 *cis*-9) no leite, o que reflete a presença deste ácido graxo no suplemento lipídico utilizado. Assim, o que parece ter afetado mais esse índice de dessaturação foi o aumento na concentração do ácido esteárico (C18:0), que teve um alto incremento conforme o aumento das doses de CLA e desta forma, causando um maior impacto na redução do índice calculado.

A secreção de ácidos graxos do leite também foi afetada pela ação do CLA *trans*-10, *cis*-12. O aumento das doses desse isômero reduziu a secreção tanto dos ácidos graxos proveniente da síntese *de novo*, quanto os pré-formados, porém, os primeiros foram mais afetados. Esta observação vai ao encontro do relatado em vacas (BAUMGARD et al., 2001; de VETH et al., 2004) e cabras (LOCK et al., 2008) que, respectivamente, usaram doses do CLA *trans*-10, *cis*-12 infundidas no abomaso ou suplementadas na dieta na forma encapsulada. Este resultado contrasta com os observados por Shingfield et al. (2009b), que relataram a redução da secreção apenas dos ácidos graxos procedentes da síntese *de novo*, enquanto os pré-formados não sofreram efeito dos tratamentos. Essa discrepância na secreção entre o observado aqui e por Shingfield et al. (2009b) pode estar relacionada com o consumo de ácidos graxos com 18 carbonos. No presente trabalho, o Megalac-E caracteriza-se por possuir grande parte da sua composição formada por ácidos graxos C18 (Tabela 2), de modo que, o aumento das doses de CLA *trans*-10, *cis*-12 não aumentou o consumo deste tipo de ácido graxo. O sabão de cálcio utilizado por Shingfield et al. (2009b) é caracterizado por possuir principalmente ácidos graxos com 16 carbonos, e assim, o aumento das doses do suplemento lipídico contendo o CLA aumentava o consumo de ácidos graxos C18, podendo manter a secreção deste tipo de ácido graxo no leite. Essa diferença pode ser exemplificada através da comparação entre a secreção de ácidos graxos

pré-formados no leite em ambos os trabalhos. Neste estudo, independentemente do tratamento, os ácidos graxos pré-formados eram a maior fração que compunha o leite das cabras. Já no trabalho de Shingfield et al. (2009b) a maior fração dos ácidos graxos que formava a gordura do leite, para a maioria dos tratamentos, era proveniente da síntese *de novo*.

Pelo emprego da secreção corrigida do CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite e aplicando-se a Equação nº5 proposta por de Veth et al. (2004) foi possível estimar a bio-hidrogenação ruminal deste isômero de CLA. Independentemente dos tratamentos a bio-hidrogenação foi em torno de 95%. Esse valor sugere que para ácidos graxos na forma de ésteres metílicos, a bio-hidrogenação se comporta da maneira semelhante aos ácidos graxos associados ao glicerol, pois se assemelha ao encontrado na literatura (JENKINS et al., 2008) e ao utilizado para calcular a dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 fornecida na dieta. Apesar de ser amplamente bio-hidrogenado, o CLA *trans*-10, *cis*-12 ao lado do C18:1 *trans*-10, foram os únicos ácidos graxos que não tiveram a sua secreção reduzida pelos aumento das doses do isômero de CLA contido nos tratamentos. O aumento da secreção do C18:1 *trans*-10 vem ao encontro ao comentado anteriormente que este ácido graxo é um intermediário da via da bio-hidrogenação ruminal em que CLA *trans*-10, *cis*-12 é o seu precursor. O aumento da secreção do CLA *trans*-10, *cis*-12, reflete, quase que exclusivamente, o aumento da dose deste ácido graxo fornecido via alimentação. Apesar disso, a eficiência de transferência das doses foi abaixo do relatado por outros estudos envolvendo o uso do CLA *trans*-10, *cis*-12 na dieta de cabras (LOCK et al., 2008; SHINGFIELD et al., 2009b) e vacas (de VETH et al., 2005). Essa menor eficiência de transferência era esperada, pois a forma do suplemento utilizada, não permitia uma proteção contra o metabolismo ruminal dos lipídios, diferentemente dos trabalhos anteriormente relatados.

## 8. CONCLUSÕES

A inclusão de doses CLA *trans*-10, *cis*-12, mesmo desprotegido da bio-hidrogenação ruminal, na dieta dos animais reduz de forma progressiva a produção e teor de gordura do leite em cabras. No entanto, a queda na gordura não é acompanhada por alterações na produção de leite, componentes não gordurosos do leite ou parâmetros metabólicos ligados a homeostase energética.

As doses crescentes do CLA *trans*-10, *cis*-12 altera o perfil de ácidos graxos do leite, gerando reduções na concentração (g/100g de ácido graxo) dos ácidos graxos oriundos principalmente da síntese *de novo* e aumentando àqueles da circulação sanguínea. Quando a secreção de ácidos graxos (g/d) é avaliada, o aumento na quantidade desse isômero na dieta reduz a síntese de todos os ácidos graxos quando estes são agrupados de acordo com a sua origem.

Seguindo uma tendência contrária ao observado para a maioria dos ácidos graxos, o crescente nível de CLA na dieta leva ao aumento da sua secreção e concentração no leite de cabras. Apesar disso, comparações diretas com outras espécies de ruminantes sugere uma menor sensibilidade por parte das cabras aos efeitos do CLA *trans*-10, *cis*-12.

## 9. REFERÊNCIAS

ANDRADE, P. V. D.; SCHMIDELY, P. Effect of duodenal infusion of trans10, cis12-CLA on milk performance and milk fatty acid profile in dairy goats fed high or low concentrate diet in combination with rolled canola seed. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.46, p.31–48, 2006.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of the Association of the Analytical Chemists**. 17 ed. Washington, 2000. v.2.

BAUMAN, D. E.; CURRIE, B. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. **J. Dairy Sci.**, v.63, p.1514-1529.

BAUMAN, D. E.; BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; GRIINARI, J. M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, v.48, p.1-15, 1999.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v.70, p.15–29, 2001.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Ann. Rev. Nutr.**, v.23, p.203–227, 2003.

BAUMAN, D. E.; PERFIELD, J. W.; HARVATINE, K. J.; BAUMGARD L. H. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: lactation and the ruminant model. **J. Nutr.**, v.138, p.403-409, 2008.

BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; DWYER, D. A.; SAEBO, A.; BAUMAN, D. E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits fat synthesis. **Am. J. Physiol.**, v.278, p.179-184, 2000.

BAUMGARD, L. H.; SANGSTER, J. K.; BAUMAN, D. E. Milk fat synthesis in dairy cows is progressively reduced by increasing supplemental amounts of *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid (CLA). **J. Nutr.**, v.131, p.1764-1769, 2001.

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

BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; DWYER, D. A.; BAUMAN, D. E. Effects of conjugated linoleic acids (CLA) on tissue response to homeostatic signals and plasma variables associated with lipid metabolism in lactating dairy cows. **J. Anim Sci.**, v.80, p.1285-1293, 2002b.

BEAM, T. M.; JENKINS, T. C.; MOATE, P. J. R.; KOHN, A.; PALMQUIST, D. L. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. **J. Dairy Sci.** v.83, p.2564 - 2573, 2000.

BELL, J. A.; KENNELLY, J. J. Short Communication: postprandial infusion of conjugated linoleic acids negatively impacts milk synthesis in holstein cows. **J. Dairy Sci.**, v.86, p.1321 – 1324, 2003.

BERNAL-SANTOS, G.; PERFIELD II, J. W.; BARBANO, D. M.; BAUMAN, D. E.; OVERTON, T. R. Production responses of dairy cows to dietary supplementation with conjugated linoleic acid (CLA) during the transition period and early lactation. **J. Dairy Sci.**, v.86, p.3218 – 3228, 2003.

BERNARD L.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y. Expression and nutritional regulation of lipogenic genes in the ruminant lactating mammary gland. **Adv Exp Med Biol**, v.606, p.67–108, 2008.

BERNARD, L.; ROUEL J.; LEROUX C.; FERLAY A.; FAULCONNIER Y.; LEGRAND P.; CHILLIARD, Y. Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in alpine goats fed vegetable lipids. **J Dairy Sci**, v.88, p.1478–1489, 2005.

BERNARD, L.; SHINGFIELD, K. J.; ROUEL J.; FERLAY A.; CHILLIARD, Y. Effect of plant oils in the diet on performance and milk fatty acid composition in goats fed diets based on grass hay or maize silage **Br. J. Nutr.**, v.101, p.213-224, 2009a.

BERNARD, L.; BONNET, M.; LEROUX, C.; SHINGFIELD, K. J.; CHILLIARD, Y. Effect of sunflower-seed oil and linseed oil on tissue lipid metabolism, gene expression, and milk fatty acid secretion in Alpine goats fed maize silage-based diets. **J Dairy Sci**, v.92, p.6083–6094, 2009b.

BERNARD L.; LEROUX, C.; FAULCONNIER, Y; DURAND, D.; SHINGFIELD, K. J.; CHILLIARD, Y. Effect of sunflower-seed oil or linseed oil on milk fatty acid secretion and lipogenic gene expression in goats fed hay-based diets. **J. Dairy Res.**, v.76, p.241–248, 2009c.

BERNARD, L.; MOURIOT, J.; ROUEL, J.; GLASSER, F.; CAPITAN, P.; PUJOS-GUILLOT, E.; CHARDIGNY, J. M.; CHILLIARD, Y. Effects of fish oil and starch added to a diet containing sunflower-seed oil on dairy goat performance, milk fatty acid composition and in vivo  $\Delta 9$ -desaturation of [ $^{13}\text{C}$ ]vaccenic acid. **Br. J. Nutr.**, v.104, p.346-354, 2010.

BERNARD, L.; LEROUX, C.; ROUEL, J.; BONNET, M.; CHILLIARD, Y. Effect of the level and type of starchy concentrate on tissue lipid metabolism, gene expression and milk fatty acid secretion in Alpine goats receiving a diet rich in sunflower-seed oil. **Br. J. Nutr.**, v.103, p.1-13, 2011.

BIONAZ, M.; LOOR, J. J. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. **BMC Genomics**, v.366, p.1-21, 2008.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **J. Dairy Sci.**, v.86, p.1751-1770, 2003.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.44, p.467–492, 2004.

CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A.; BERNARD, L.; ROUEL, J.; DOREAU, M. Diet, rumen biohydrogenation, cow and goat milk fat nutritional quality. **Eur J Lipid Sci Tech**, v.109, p.828–855, 2007.

CHOI, Y.; KIM, Y.-C.; HAN, Y.-B.; PARK, Y.; PARIZA, M. W.; NTAMBI, J. M. The *trans*-10,*cis*-12 isomer of conjugated linoleic Acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. **J. Nutr.**, v.130, p.1920-1924, 2000.

CHOUINARD, P. I., CORNEAU, L., SAEBO, A., BAUMAN, D. E. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.82, p.2737-2745, 1999.

CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. **J. Lipid Res.**, v.23, p.1072, 1982.

CORL, B. A.; BAUMGARD, L. H.; DWYER, D. A.; GRIINARI, J. M.; PHILLIPS, B.S. ; BAUMAN, D. E. The role of  $\Delta^9$ -desaturase in the production of *cis*-9, *trans*-11 CLA. **J. Nutr. Bioche.** v.12, p.622-630, 2001.

CRUZ-HERNANDEZ, C.; KRAMER, J. K. G.; KENNELLY, J. J.; GLIMM, D. R.; SORENSEN, B. M.; OKINE, E. K.; GOONEWARDENE, L. A.; WESELAKE, R. J. Evaluating the conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in milk fat of dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.3786-3801, 2007.

DABDOUB, S. M.; SHOOK, G. E. Phenotypic relations among milk yield, somatic cell count and clinical mastitis. **J. Dairy Sci.** v. 34 (Suppl.1):163–164, 1984.

de VETH, M. J.; GRIINARI, J. M.; PFEIFFERC, A. M.; BAUMAN, D. E. Effect of CLA on milk fat synthesis in dairy cows: comparison of inhibition by methyl esters and free fatty acids, and relationships among studies. **Lipids**, v.39, p.365-372, 2004.



de VETH, M. J.; GULATI, S. K.; LUCHINI, N. D.; BAUMAN, D. E. Comparison of calcium salts and formaldehyde-protected conjugated linoleic acid in inducing milk fat depression. **J. Dairy Sci.**, v.88, p.1685-1693, 2005.

de VETH, M. J.; BAUMAN, D. E.; KOCH, W.; MANN, G. E.; PFEIFFER, A. M.; BUTLER, W. R. Efficacy of conjugated linoleic acid for improving reproduction: a multi-study analysis in early-lactation dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.92, p.2262-2269, 2005.

DOEPEL, L.; LAPIERRE, H.; KENNELLY, J. J. Peripartum performance and metabolism of dairy cows in response to prepartum energy and protein intake. **J. Dairy Sci.**, v.85, p.2315-2334, 2002.

ERASMUS, L. J., BESTER, Z., FOURIE, T., COERTZE, R. J., HALL, L. Effect of level of rumen protected CLA supplementation on milk yield and composition in saanen goats. **South African J. Anim. Sci.**, v.34 (Suppl. 1): p.42-45, 2004.

FUENTES, M. C.; CALSAMIGLIA, S.; FIEVEZ, V.; BLANCH, M.; MERCADAL, D. Effect of pH on ruminal fermentation and biohydrogenation of diets rich in omega-3 or omega-6 fatty acids in continuous culture of ruminal fluid. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.169, p.35 – 45, 2011.

GERMAN, J. B.; GIBSON, R. A.; KRAUSS, R. M.; NESTEL, P.; LAMARCHE, B.; VAN STAVEREN, W. A.; STEIJNS, J. M.; DE GROOT, L. C. P. G. M.; LOCK, A. L.; DESTAILLATS, F. A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. **Eur. J. Nutr.**, v.48, p.191 – 203, 2009.

GRAZIOLA, F.; SOLIS, V. S.; CURI, R. Estrutura química e classificação dos ácidos graxos. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. (ORG). **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Barueri: Manole, 2002. p. 5 – 24.

GRIINARI, J. M.; DWYER, D. A.; MCGUIRE, M. A.; BAUMAN, D. E.; PALMQUIST, D. L.; NURMELA, K.V.V. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.1251-1261, 1998.

GRIINARI, J. M.; CORL, B. A.; LACY, S. H.; CHOUINARD, P. Y.; NURMELA, K. V. V.; BAUMAN, D. E. Conjugated Linoleic acid is synthesized endogenously in lactating cows by  $\Delta^9$  desaturase. **J. Nutr.**, v.130, p.2285-2291, 2000.

GRUMMER, R. R. Effect of feed on the composition of milk fat. **J. Dairy Sci.**, v.74, p.3244-3257, 1991.

HA, Y. L., GRIMM, N. K., PARIZA, M. W. Anticarcinogens from fried ground beef: heataltered derivatives of linoleic acid. **Carcinogenesis**, v.8, p.1881-1887, 1987.

HAENLEIN, G. F. W. Past, present, and future perspectives of small ruminant dairy research. **J. Dairy Sci.**, v.84, p.2097-2115.

HARVATINE, K. J.; BAUMAN, D. E. SREBP1 and Thyroid hormone responsive spot 14 (S14) are involved in the regulation of bovine mammary lipid synthesis during diet-induced milk fat depression and treatment with CLA. **J. Nutr.**, v.136, p.2468-2474, 2006.

HARVATINE, K. J.; PERFIELD II, J. W.; BAUMAN, D. E. Expression of enzymes and key regulators of lipid synthesis is upregulated in adipose tissue during CLA-induced milk fat depression in dairy cows. **J. Nutr.**, v.139, p.849-854, 2009.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with low-toxicity solvent. **Analytical Bioche.**, v.90, p.420-426, 1978.

HARFOOT, C. G.; HAZLEWOOD, G. P Lipid metabolism in the rumen. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S (Org.). **The rumen microbial ecosystem**. 2. ed. [S. L.]: Blackie academic & professional. 380 – 425.

HORTON, J. D; SHAH, N.A.; WARRINGTON, J. A.; ANDERSON, N. N.; PARK, S. W.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Combined analysis of oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. **PANAS**, v.100, p.12027 – 12032, 2003.

HUTCHINSON, I.; DE VETH, M. J.; STANTON, C.; DEWHURST, R. J.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; BUTLER, S. Y. Effects of lipid-encapsulated conjugated linoleic

acid supplementation on milk production, bioenergetic status and indicators of reproductive performance in lactating dairy cows. **J. Dairy Res.**, v.78, p.308 – 317, 2011.

IP, C.; BANNI, S.; ANGIANI, E.; CARTA, G.; MCGINLEY, J.; THOMPSON, H. J.; BARBANO, D.; BAUMAN, D. E. Conjugated linoleic acid–enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. **J. Nutr.**, v.120, p.2135 – 2142, 1999.

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

JENKINS, T. C.; WALLACE, R. J.; MOATE, P. J.; MOSLEY, E. E. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **J. Ani. Sci.**, v.86, p.397-412, 2008.

KAY, J. K.; ROCHE, J. R.; MOORE, C. E.; BAUMGARD, L. H. Effects of dietary conjugated linoleic acid on production and metabolic parameters in transition dairy cows grazing fresh pasture. **J. Dairy Res.** v.73, p.367 – 377, 2006.

KAY, J. K.; MACKLE, T. R.; BAUMAN, D. E. ; THOMSON, N. A.; BAUMGARD, L.H. Effects of a supplement containing *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on bioenergetic and milk production parameters in grazing dairy cows offered ad libitum or restricted pasture. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.721-730, 2007.

KEATING, A. L.; ZHAO F. Q.; FINUCANE, K. A.; GLIMM, D. R.; KENNELY, J. J. Effect of conjugated linoleic acid on bovine mammary cell growth, apoptosis and stearoyl-CoA desaturase gene expression. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.34, p.284 – 292, 2008.

KELLY, M. L.; BERRY, J. R.; DWYER, D. A.; GRIINARI, J. M.; CHOUINARD, P. Y.; VAN AMBURGH, M. E.; BAUMAN, D. E. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. **J. Nutr.** v.1, p.881-885, 1998.

KELSEY, J. A.; CORL, B. A.; COLLIER, R. J.; BAUMAN, D. E. The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows **J. Dairy Sci.**, v.86, p.2588–2597, 2003.

KEMP, P.; LANDER, D. J.; GUNSTONE, N. D. F. D. The hydrogenation of some *cis*- and *trans*-octadecenoic acids to stearic acid by a rumen *Fusocillus* sp. **Br. J. Nutr.**, v.52, p.165 – 170, 1984.

KEPLER, C. R.; TUCKER, W. P.; TOVE, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. IV. Substrate specificity and inhibition of linoleate  $\Delta^{12}$ -*cis*,  $\Delta^{11}$ -*trans* isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. **J. Biol. Chem.**, v.245, p.3612–3620, 1970.

KIM, Y. J.; LIU, R. H.; RYCHLIK, J. L.; RUSSELL, J. B.; The enrichment of a ruminal bacterium (*Megasphaera elsdenii* YJ-4) that produces the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid. **J. Appl. Microbi.** v.92, p.976-982, 2002.

KINLAW, W. B.; CHURCH, J.L.; HARMON, J.; MARIASH, C.N. Direct evidence for role of “spot 14” protein in the regulation of lipid synthesis. **J. Biol. Chem.**, v.270, p.16615-16618, 1995.

KRAMER, J. K. G.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; DENG, Z. Y.; ZHOU, J.Q.; JAHREIS, G.; DUGAN, M. E. R. Analysis of conjugated linoleic acid and *trans* 18 : 1 isomers in synthetic and animal products. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.79, p.1137S–1145S, 2001.

LOCK, A. L.; BAUMAN, D. E. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. **Lipids**, v.39, p. 1197 – 1206, 2004.

LOCK, A. L.; TELES, B. M.; PERFIELD II, J. W.; BAUMAN, D. E.; SINCLAIR, L. A. A conjugated linoleic acid supplement containing *trans*-10, *cis*-12 reduces milk fat synthesis in lactating sheep. **J. Dairy Sci.**, v.89, p.1525–1532, 2006.

LOCK, A. L.; TYBURCZY, C.; DWYER, D. A.; HARVATINE, K. J.; DESTAILLATS, F.; MOULOUGUI, Z.; CANDY, L.; BAUMAN, D. E. *Trans*-10 octadecenoic acid does not reduce milk fat synthesis in dairy cows. **J. Nutr.**, v.137, p.71–76, 2007.

LOCK, A. L.; ROVAI, M.; GIPSON, T. A.; DE VETH, M. J. BAUMAN, D. E. A conjugated linoleic acid supplement containing trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating goats. **J. Dairy Sci.**, v.91, p.3291-3299, 2008.

LOOR, J. J.; HERBEIN, J.H. Exogenous conjugated linoleic acid Isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis. **J. Nutr.**, v.128, p.2411 – 2419, 1998.

LOURENÇO, M.; RAMOS-MORALES. E.; WALLACE, R. J. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. **Animal**, v.4, p. 1008 – 1023, 2010.

MAIA, M. R. G.; CHAUDHARY, L. C.; FIGUERES, L.; WALLACE, R. J. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. **Ant. van Leeuw.**, v.91, p. 303 – 314, 2007.

MAIA, M. R. G.; CHAUDHARY, L. C.; BESTWICK, C. S.; RICHARDSON, A. J.; McKAIN, N.; LARSON, T. R.; GRAHAM, I. A.; WALLACE, R. J. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. **BMC Microbiol.**, v.50, p. 1 – 10, 2010.

MEDEIROS, S. R.; OLIVEIRA , D. E.; AROEIRA, L. J. M.; MCGUIRE, M. A.; BAUMAN, D. E.; LANNA, D. P. D. Effects of dietary supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid to grazing cows in early lactation. **J. Dairy Sci.**, v.93, p.1126-1137, 2010.

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

MIGLIETTA, A.; BOZZO, F.; BOCCA, C.; GABRIEL, L.; TROMBETTA, A.; BELOTTI, S; CANUTO, R. A. Conjugated linoleic acid induces apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells through ERK/MAPK signaling and mitochondrial pathway. **Cancer Letters**, v. 234, p. 149-157, 2006.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Carcinogens and Anticarcinogens in the Human Diet: A Comparison of Naturally Occurring and Synthetic Substances.**

Washington: Committee on Comparative Toxicity of Naturally Occurring Carcinogens, 1996. 417p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). **Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids.** Washington: Committee on Nutrient Requirements of Small Ruminants, 2007. 362p.

NOBLE, R. C.; MOORE, J. H.; HARFOOT, C. G. Observations on the pattern of biohydrogenation of esterified and unesterified linoleic acid in the rumen. **Br. J. Nutr.** v.31, p.99 – 108, 1974.

ODENS, L. J.; BURGOS, R.; INNOCENTI, M.; VANBAALE, M. J.; BAUMGARD, L. H. Effects of Varying doses of supplemental conjugated linoleic acid on production and energetic variables during the transition period. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.293 – 305, 2007.

OLIVEIRA, D. E. ; SOARES, M. P.; BIANCHETT, F. J. ; FORNASIER, R.; FACHINELLO, M. ; GIRARDI, M. ; FERNANDES, D. ; SOSTER, D. ; GAMA, M. A. S. ; JUCHEM, S. O. ; TEDESCHI, L. O. . Unprotected conjugated linoleic acid (CLA) negatively affects milk production and secretion of milk components in dairy ewes. In: 2008 ADSA - ASAS Joint Annual Meeting, 2008, Indianápolis. **Anais eletrônicos...** Journal of Dairy Science. Savoy : American Dairy Science Association, 2008. v. 91. E-Suple.1, p. 438-438.

OLIVEIRA, D. E.; GAMA, M. A. S.; FERNANDES, D.; TEDESCHI, L. O.; BAUMAN, D. E. An unprotected conjugated linoleic acid supplement decreases milk production and secretion of milk components in grazing dairy ewes. . **J. Dairy Sci.**, v.95, p.1437-1446, 2012.

OLLIER, S.; LEROUX, C.; DE LA FOYE, A.; BERNARD, L.; ROUEL, J.; CHILLIARD, Y. Whole intact rapeseeds or sunflower oil in high-forage or high-concentrate diets affects milk yield, milk composition, and mammary gene expression profile in goats. **J. Dairy Sci.**, v.92, p.5544-5560, 2009.

OSTROWSKA, E.; CROSS, R. F.; MURALITHARAN, M.; BAUMAN, D. E.; DUNSHEA, F. R. Effects of dietary fat and conjugated linoleic acid on plasma metabolite concentrations and metabolic responses to homeostatic signals in pigs. **Br. J. Nutr.** v.88, p.625 – 634, 2000.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: review. **J. Dairy Sci.**, v.63, p.1-14, 1980.

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

PALMQUIST, D. L.; LOCK, A. L.; SHINGFIELD, K. J.; BAUMAN, D. E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. **Adv. Food Nutr. Res.**, v. 50, p. 179 – 217, 2005.

PARK, Y.; ALBRIGHT, K. J.; STORKSON, J. M.; COOK, M. E.; PARIZA, M. W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, v.32, p. 853 – 858, 1997.

PERFIELD II, J. W.; BERNAL-SANTOS, G.; OVERTON, T. R.; BAUMAN, D. E. Effects of Dietary Supplementation of rumen-protected conjugated linoleic acid in dairy cows during established lactation. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.2609-2617, 2002.

PERFIELD II, J. W.; DELMONTE, P.; LOCK, A. L.; YURAWECZ, M. P.; BAUMAN, D. E. *Trans*-10, *Trans*-12 conjugated linoleic acid does not affect milk fat yield but reduces  $\Delta$ 9-desaturase index in dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.89, p.2259-2566, 2006.

PERFIELD II, J. W.; LOCK, A. L.; GRINARI, J. M.; SAEBØ, A.; DELMONTE, P.; DWYER, D. A.; BAUMAN, D. E. *Trans*-9, *Cis*-11 conjugated linoleic acid reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.2211-2218, 2007.

PETERSON, D. G.; MATITASHVILI, E. A.; BAUMAN, D. E. The inhibitory effect of *trans*-10, *cis*-12 CLA on lipid synthesis in bovine epithelial cells involves reduced

proteolytic activation of the transcription factor SREBP-1. **J. Nutr.**, v.134, p.2523–2527, 2004.

PIPEROVA, L. S.; TETER B. B.; BRUCKENTAL, I.; MILLS, SAMPUGNA, J.; YURAWECZ, M. P.; FRITSCH, J.; KU, K.; ERDMAN, R. A. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat-depressing diet. **J. Nutr.**, v.130, p.2568 – 2574. 2000.

POLAN, C. E.; McNEILL, J. J.; TOVE, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. **J. Bacteriol.** v. 88, p.1056-1064, 1964.

PULINA, G.; NUDDA, A.; BATTACONE, G.; CANNAS, A. Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.131, p.255-291, 2006.

RIBEIRO, C. V. D. M. R.; OLIVEIRA, D. E.; JUCHEM, S. O.; SILVA, T. M.; NALÉRIO, E. S. Fatty acid profile of meat and milk from small ruminants: a review. **R. Bras. Zootec.**, v.40, p.121-137, 2011.

RUDOLPH, M. C.; MCMANAMAN, J. L.; PHANG, T. L.; RUSSELL, T.; KOMINSKY, D. J.; SERKOVA, N. J.; STEIN, T.; ANDERSON, S. M.; NEVILLE, M. C. Metabolic regulation in the lactating mammary gland: a lipid synthesizing machine. **Physiol. Genomics**, v.28, p.323 – 336, 2007.

SAEBØ, A.; SAEBØ, P.-C.; GRIINARI, J. M.; SHINGFIELD, K. J. Effect of abomasal infusions of geometric isomers of 10,12 conjugated linoleic acid on milk fat synthesis in dairy cows. **Lipids**, v.40, p.823-832, 2005.

SALTER, A. M.; TARLING, E. J.. Regulation of gene transcription by fatty acids. **Animal**, v.4, p.1314-1320, 2007.

SANTORA, J. E.; PALMQUIST, D. L.; ROEHRIG, K.L. *Trans*-vaccenic acid is desaturated to conjugated linoleic acid in mice. **J. Nutr.** v.130, p.208-215, 2000.

SAS Institute Inc. **SAS/STAT**: Users Guide. Version 9.0. ed. Cary, NC, 2002.



SCHMIDELY, P.; MORAND-FEHR, P. Effects of intravenous infusion of trans-10, cis-12 or cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid (CLA) on milk fat synthesis and composition in dairy goats during mid-lactation. **South African J. Anim. Sci.**, v.34 (Suppl. 1):p.195-197, 2004.

SEELIG, S.; LIAW, C.; TOWLE, H. C.; OPPENHEIMER, J. H. Thyroid hormone attenuates and augments hepatic gene expression at a pretranslational level. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v.78, p.4733-4737, 1981.

SHIMANO, H.; HORTON, J. D.; SHIMOMURA, I.; HAMMER, R. E.; BROWN, M. S.; GOLDSTEIN, J. L. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. **J. Clin. Invest.**, v.99, p. 846–854, 1997.

SHINGFIELD, K. J.; SAEBØ, A.; SAEBØ, P.-C.; TOIVONEN, V.; GRIINARI, J. M. Effect of abomasal infusions of a mixture of octadecenoic acids on milk fat synthesis in lactating cows. **J. Dairy Sci.**, v.92, p.4317-4329, 2009a.

SHINGFIELD, K. J.; ROUEL, J.; CHILLIARD, Y. Effect of calcium salts of a mixture of conjugated linoleic acids containing trans-10, cis-12 in the diet on milk fat synthesis in goat. **Br. J. Nutr.**, v.101, p.1006-1019, 2009b.

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

SHINGFIELD, K. J.; GRIINARI, M. J. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. **Eur J Lipid Sci Tech**, v.109, p.799–816, 2007.

SINCLAIR, L. A.; LOCK, A. L.; EARLY, R.; BAUMAN, D. E. Effects of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid on bovine milk fat synthesis and cheese properties. **J. Dairy Sci.**, v.90, p.3326-3335, 2007

SINCLAIR, L. A.; WEERASINGHE, M. P. B.; WILKINSON, R. G.; DE VETH, M. J.; BAUMAN, D. E. A supplement containing trans-10, cis-12 Conjugated Linoleic Acid reduces milk fat yield but does not alter organ weight or body fat deposition in lactating ewes. **J. Nutr.**, v.140, p.1949-1955, 2010.

SUTTON, J. D. Altering milk composition by feeding. **J. Dairy Sci.**, v.72, p.2801-2814, 1989.

TEDESCHI, L. O.; CANNAS, A.; FOX, D. G. A. A nutrition mathematical model to account for dietary supply and requirements of energy and other nutrients for domesticated small ruminants: The development and evaluation of the small ruminant nutrition system. **Small Ruminant Res.**, v.3699, p.01-10, 2010.

TYRRELL, H. F.; REID, J. T. Prediction of the energy value of cow's milk. **J. Dairy Sci.**, v.48, p.1215-1223, 1965.

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

VILLAQUIRAN, M.; GIPSON, T.; MERKEL, R. C.; GOETSCH, A.; SAHLU, T. Body Condition Scoring for Improved Management In: Proc. 20th Ann. Goat Field Day, 2005 Langston – OK. **Anais eletrônicos...** Langston – OK: Langston University, 2005, p.111-117. Disponível em: <<http://www2.luresext.edu/goats/library/field/bcs07.pdf>> Acesso em 30 jul. 2010.

WALLACE, R. J.; McKAIN, N.; SHINGFIELD, K. J.; DEVILLARD, D. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. **J. Lipid Res.**, v.48, p.2247 – 2254, 2007.

WEISS, W. P.; CONRAD, H. R.; PIERRE, N. T. St. A theoretically-based model for predicting total digestible nutrient values of forages and concentrates. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.39, p.95 – 110, 1992.

WILDMAN E.E.; JONES G.M.; WAGNER P.E.; BOMAN R.L.; TROUTT H.F.; LESCH T.N. A dairy cow body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **J. Dairy Sci**, v. 65, p.495–501, 1982.

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

YURAWECZ, M. P.; ROACH, J. A. G.; SEHAT, N.; MOSSOBA, M. M.; KRAMER, J. K. G.; FRITSCH, J., STEINHART, H.; KU, Y. A new conjugated linoleic acid isomer, 7 trans, 9 cis-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. **Lipids** 33, 803–809, 1998.

ZHU, Q.; ANDERSON, G. W.; MUCHA, G. T.; PARKS, E. J.; METKOWSKI, J.K.; MARIASH, C.N. The Spot 14 Protein Is Required for *de Novo* Lipid Synthesis in the Lactating Mammary Gland. **Endocrinol.**, v.146, p.3343–3350, 2005.