

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA - UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS - CAV
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAL
MESTRADO EM PRODUÇÃO ANIMAL

MICHEL BALDIN

**DESEMPENHO, COMPOSIÇÃO DO LEITE E BALANÇO
ENERGÉTICO DE CABRAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM
ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) NÃO PROTEGIDO DA BIO-
HIDROGENAÇÃO RUMINAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de mestre no Curso de
Pós-Graduação em Ciência Animal da
Universidade do Estado de Santa Catarina –
UDESC.

Orientador: Dr. Dimas E. de Oliveira
Co-orientador: Dr. Marco A. S. da Gama

LAGES – SC

2012

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

MICHEL BALDIN

**DESEMPENHO, COMPOSIÇÃO DO LEITE E BALANÇO
ENERGÉTICO DE CABRAS LEITEIRAS SUPLEMENTADAS COM
ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) NÃO PROTEGIDO DA BIO-
HIDROGENAÇÃO RUMINAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

Aprovado em: 25/06/2012

Homologado em: / /2012

Banca Examinadora:

Orientador/presidente: Dr. Dimas E. de Oliveira
(UDESC/Lages - SC)

Membro: Dr. Henrique M. N. Ribeiro Filho
(UDESC/Lages – SC)

Membro: Dr. Marco A. S. da Gama
(EMBRAPA/Juiz de Fora – MG)

Lages, Santa Catarina
25 de Junho de 2012

A meu pai, minha mãe e irmã,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela saúde,
A minha família pelo apoio incondicional,
A todos os colegas e amigos que me ajudaram,
Ao meu orientador pela oportunidade e auxílio,
Ao meu co-orientador, pela excelente contribuição,
Aos Professores do Departamento de Produção Animal e Alimentos que me ajudaram,
A FAPEMIG pelo recurso concedido para realização do projeto,
A CAPES pela bolsa concedida.

RESUMO

BALDIN, Michel. **Desempenho, composição do leite e balanço energético de cabras leiteiras suplementadas com Ácido Linoleico Conjugado (CLA) não protegido da bio-hidrogenação ruminal.** 2012. 77f. 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 suplementos de CLA protegidos da bio-hidrogenação ruminal contendo o isômero CLA *trans*-10, *cis*-12 tem resultado em inibição da síntese de gordura do leite em vacas, ovelhas e cabras. Ésteres metílicos de CLA tem sido tão efetivos quanto ácidos graxos livres em inibir a síntese de gordura do leite quando infundidos pós-ruminalmente em vacas, porém sua eficácia como um suplemento incluído na dieta de ruminantes em lactação não tem sido avaliado. O presente estudo investigou os efeitos da suplementação com CLA *trans*-10, *cis*-12 na forma de ésteres metílicos não protegidos da bio-hidrogenação ruminal sobre o desempenho, composição do leite e balanço energético de cabras leiteiras. Dezoito cabras multíparas da raça Toggenburg foram aleatoriamente alocadas em um dos seguintes tratamentos de um delineamento experimental “cross-over” (14 dias de tratamento e 7 dias de intervalo): 1) Controle: 30 g/dia de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa (Megalac-E) ou 2) CLA: 30 g/d de um suplemento de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) na forma de ésteres metílicos. Os suplementos lipídicos foram misturados a um concentrado e fornecidos aos animais individualmente, como componentes de uma TMR dividida em três refeições diárias. A ingestão de matéria seca, a produção de leite, o conteúdo e a secreção de proteína e lactose do leite e a contagem de células somáticas não foram afetadas pela suplementação com CLA. Por outro lado, o conteúdo e a secreção de gordura do leite foram reduzidos em 19,9 e 17,9%, respectivamente, quando as cabras receberam o tratamento CLA. A redução na secreção de gordura foi uma consequência de uma menor secreção tanto nos ácidos graxos pré-formados como nos ácidos graxos sintetizados “*de novo*”. O tratamento CLA modificou também o perfil de ácidos graxos do leite, o que incluiu uma redução na concentração de ácidos graxos saturados (2,5%), um aumento nos ácidos graxos mono e poliinsaturados (5,6 e 5,4%, respectivamente), e um pronunciado aumento (1576%) na concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite. Consistente com o elevado teor de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite, todos os

índices de dessaturação de ácidos graxos foram reduzidos pelo tratamento CLA. A redução na gordura do leite causada pelo tratamento CLA proporcionou uma redução de 22% na energia exigida para lactação, a qual foi acompanhada por uma melhora no balanço energético estimado (+ 45 Mcal/dia), maior nível de glicose sanguínea (54,89 vs. 58,13 mg/dL) e uma tendência para aumento no ganho de peso (45,18 vs. 45,57 kg). Foi estimado que aproximadamente 7,2% do CLA *trans*-10, *cis*-12 escapou da bio-hidrogenação ruminal e comparações indiretas com dados obtidos de outros estudos sugerem equivalente redução na gordura do leite quando suplementos de CLA são incluídos na dieta na forma de ésteres metílicos ou fontes protegidas da bio-hidrogenação ruminal. Deste modo, os resultados sugerem que ésteres metílicos de CLA podem ser uma alternativa em relação aos suplementos de CLA protegidos da bio-hidrogenação ruminal devido a facilidades operacionais e vantagens no custo de produção. Referente às relações entre o peso metabólico dos animais e a extensão da redução na gordura do leite, houve uma diminuição na concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite conforme o peso metabólico aumentou, e a redução na gordura do leite esteve curvilinearmente relacionada tanto com a ingestão de CLA *trans*-10, *cis*-12 como com a concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 na gordura do leite. De um modo geral, estes resultados sugerem que cabras mais pesadas podem necessitar uma maior dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 para atingir uma determinada concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite ou uma determinada redução na síntese de gordura do leite.

Palavras-chave: ácidos graxos do leite. ácido linoleico conjugado. balanço energético. cabras Toggenburg.

ABSTRACT

BALDIN, Michel. **Performance, milk composition and energy balance of lactating goats supplemented with a rumen unprotected conjugated linoleic acid (CLA).** 2012. 77f. Thesis (Master of Science in Animal Science – Area: Animal Production) – Santa Catarina State University. Graduate Program in Animal Science, Lages, 2012.

Feeding *trans*-10, *cis*-12 CLA supplements in a rumen-protected form has been shown to inhibit the milk fat synthesis in cows, ewes and goats. Methyl esters of CLA were shown to be as effective as free fatty acids when infused post-ruminally, but their efficacy as a feed supplement has not been addressed in studies with lactating ruminants. The present study investigated the effects of an unprotected *trans*-10, *cis*-12 CLA supplement as methyl esters on performance, milk composition and energy status of dairy goats. Eighteen multiparous Toggenburg goats were randomly assigned to the following dietary treatments in a crossover experimental design (14 d treatment periods separated by a 7 d washout interval): 1) Control: 30 g/d of calcium salts of long chain fatty acids (Megalac-E) or 2) CLA: 30 g/d of a rumen unprotected CLA supplement (29.9% of *trans*-10, *cis*-12 CLA) as methyl esters. Lipid supplements were mixed into a concentrate and fed individually to animals three times a day as a TMR component. Dry matter intake, milk yield, milk protein and lactose content and secretion, and SCC were unaffected by CLA treatment. On the other hand, milk fat content and yield were reduced by 19.9 and 17.9% in CLA-fed goats, respectively. Reduced milk fat yield in CLA-fed goats was a consequence of a lower secretion of both preformed and “*de novo*” synthesized fatty acids. The CLA treatment also changed the milk fatty acid profile, which included a reduction in the concentration of saturated fatty acids (2.5%), increased mono and polyunsaturated fatty acids (5.6 and 5.4%, respectively), and a pronounced increase (1576%) in milk fat *trans*-10, *cis*-12 CLA. Consistent with the high milk fat *trans*-10, *cis*-12 CLA content, all desaturase indexes were reduced in milk fat from CLA-fed goats. The milk fat depression induced by CLA reduced the energy required for milk production by 22%, which was accompanied by an improvement in the estimated energy balance (+0.45 Mcal/d), higher blood glucose level (54.89 vs. 58.13 mg/dL) and a trend for increased body weight (45.18 vs. 45.57 kg). Approximately 7.2% of *trans*-10, *cis*-12 CLA was estimated to escape

from rumen bio-hydrogenation and indirect comparisons with data obtained from other studies suggest equivalent milk fat reduction between dietary CLA in the methyl ester form and rumen protected sources. Thus, despite the apparent low degree of rumen protection, results suggest that methyl esters of CLA could be an alternative to rumen protected CLA supplements due to manufacturing and cost advantages. Regarding to the relationship between the animal's metabolic body weight and the extent of reduction in milk fat, there was a decrease in the concentration of *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat as the goat's metabolic body weight increased, and decrease in milk fat content was curvilinearly related either to the dietary *trans*-10, *cis*-12 CLA or to the milk fat concentration of *trans*-10, *cis*-12 CLA. Overall, these finds suggest that heavier goats may require a greater *trans*-10, *cis*-12 CLA dose in the diet to achieve a particular *trans*-10, *cis*-12 CLA concentration in milk fat or a particular reduction in milk fat synthesis.

Key words: conjugated linoleic acid. energy balance. milk fatty acids. Toggenburg goats

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos da suplementação com ácido linoleico conjugado (CLA) <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 sobre a composição e perfil de ácidos graxos do leite de cabras.....	21
Tabela 2 - Ingredientes e composição química da Ração Totalmente Misturada (TMR).....	27
Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos dos suplementos lipídicos.....	28
Tabela 4 - Desempenho e composição do leite de cabras Toggenburg suplementadas com ácido linoleico conjugado (CLA).....	34
Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos (AG) da gordura do leite de cabras Toggenburg suplementadas ácido linoleico conjugado (CLA).....	35
Tabela 6 - Concentração e índices de dessaturação dos ácidos graxos (AG) da gordura do leite de cabras Toggenburg suplementadas ácido linoleico conjugado (CLA)	37
Tabela 7 - Produção de leite corrigida, concentração de energia no leite, ganho de peso diário e concentração de metabólitos sanguíneos de cabras Toggenburg suplementadas com ácido linoleico conjugado (CLA).....	39

LISTA DE FIGURAS

Figura - 1	Variação temporal da produção de leite (A) e dos teores de proteína (B) e lactose (C) do leite.....	41
Figura - 2	Variação temporal do teor (A) e da secreção (B) de gordura do leite....	42
Figura - 3	Secreção de ácidos graxos (AG) no leite.....	43
Figura - 4	Concentração dos ácidos graxos (AG) saturados, monoinsaturados (AGMI) e poliinsaturados (AGPI) na gordura do leite.....	45
Figura - 5	Secreção de ácidos graxos <i>trans</i> - C18:1 (A), <i>trans</i> -10 C18:1(B), ácido linoleico conjugado (CLA) <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 (C) e CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 (D) no leite.....	47
Figura - 6	Concentração dos isômeros dos ácidos graxos (AG) <i>trans</i> -C18:1 na gordura do leite.....	48
Figura - 7	Variação temporal da secreção diária de energia no leite.....	51
Figura - 8	Balanço energético.....	52
Figura - 9	Relação entre o peso metabólico e o conteúdo de ácido linoleico conjugado (CLA) <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 no leite.....	54
Figura - 10	Mudança no teor de gordura do leite em função da ingestão de CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 (A) e em função do conteúdo de CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 no leite (B).....	55

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT	iii
1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Introdução	15
2.2 Regulação nutricional da síntese da gordura do leite	15
2.3 Ácido linoleico conjugado (CLA) <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12.....	16
2.4 Regulação nutricional da síntese de gordura do leite em cabras	17
2.4.1 Relação concentrado:volumoso da dieta	17
2.4.2 Suplementação com lipídios.....	18
2.4.3 Suplementação com CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12.....	19
2.5 Efeitos do CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12 na glândula mamária	22
2.6 Balanço Energético.....	23
3 HIPÓTESES.....	24
4 OBJETIVOS	25
4.1 Objetivo Geral	25
4.2 Objetivos específicos.....	25
5 MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1 Local, animais e instalações	26
5.2 Dieta Experimental	26
5.3 Delineamento experimental e tratamentos	27
5.4 Coleta de amostras e avaliações	29
5.4.1 Alimentos.....	29
5.4.2 Leite	29
5.4.3 Peso vivo e parâmetros metabólicos.....	29
5.4.4 Análises químicas	30
5.4.5 Análise de ácidos graxos	30

5.5 Cálculos	31
5.6 Análise Estatística.....	32
6 RESULTADOS	34
6.1 Desempenho e composição do leite.....	34
6.2 Perfil de ácidos graxos do leite.....	35
6.3 Balanço Energético.....	38
6.4 Correlações envolvendo o Peso Metabólico e a Composição do leite	39
7 DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO.....	57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
APÊNDICE A – PRODUÇÃO DE LEITE.....	67
APÊNDICE B – PERCENTUAL DE GORDURA DO LEITE.....	69
APÊNDICE C – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE	71
APÊNDICE D – ENTRADAS DO SAS	77

1 INTRODUÇÃO

A inibição da síntese da gordura do leite de ruminantes promovida pelo isômero *trans*-10, *cis*-12 do ácido linoleico conjugado (CLA) têm sido relativamente bem estabelecida (BAUMAN et al., 2011). Em vacas lactantes 0,045 g de CLA *trans*-10, *cis*-12 por kg de peso vivo reduzem em até 45% a gordura do leite com as respostas encontrando um “nadir” a partir do 3º ou 4º dia do início da suplementação (HARVATINE et al., 2009).

Considerado que a gordura é o componente mais energético do leite (BAUMAN e GRIINARI, 2003), suplementos contendo CLA *trans*-10, *cis*-12 poderiam melhorar o balanço energético em animais lactantes por reduzirem a energia exigida para síntese do leite (GRIINARI e BAUMAN, 2006). A energia “economizada” pode ser então redirecionada no organismo e utilizada para outras finalidades como a síntese do outros componentes do leite (BERNAL-SANTOS et al., 2003; MEDEIROS et al., 2010) ou melhorar o desempenho reprodutivo de vacas leiteiras (BAUMAN et al., 2011) quando a dieta não é capaz de suprir as exigências nutricionais dos animais. Além disso, o aumento da expressão de genes que codificam enzimas lipogênicas no tecido adiposo de vacas recebendo infusão abomasal de CLA *trans*-10, *cis*-12 sugere que a energia “economizada” devido a redução na síntese de gordura do leite poderia também ser usada para reposição das reservas corporais de gordura (HARVATINE et al., 2009).

Similarmente ao observado em estudos com vacas, o CLA *trans*-10, *cis*-12 também tem inibido a síntese da gordura do leite em cabras. No estudo conduzido por Lock et al. (2008), a dose mais alta (6 g/d) de CLA *trans*-10, *cis*-12 na forma de lipídio encapsulado reduziu o conteúdo e a secreção da gordura do leite em 18 e 21%, respectivamente. Em um estudo subsequente, a suplementação na dieta com doses crescentes de CLA (7,47, 14,9 e 22,4 g/d de *trans*-10, *cis*-12 CLA) na forma de sais de cálcio reduziu a síntese de gordura do leite em um modo dose-dependente (SHINGFIELD et al, 2009). Notavelmente, ambos os estudos forneceram evidências que a magnitude da depressão na gordura do leite induzida pela suplementação com CLA *trans*-10, *cis*-12 em cabras parece ser menos pronunciada quando comparada com vacas e ovelhas. Este fato poderia estar relacionado tanto com um maior metabolismo ruminal do suplemento CLA no rúmen de cabras (LOCK et al., 2008) ou uma

menor responsividade da glândula de cabras aos efeitos do CLA *trans*-10, *cis*-12 (SHINGFIELD et al., 2009).

Devido a facilidades operacionais e vantagens no custo de produção, os ésteres metílicos de CLA poderiam ser uma alternativa interessante em relação aos suplementos de CLA protegidos da bio-hidrogenação ruminal (ex. sais de cálcio e lipídios encapsulados). Além disso, ésteres metílicos de CLA foram tão eficientes quanto ácidos graxos livres em inibir a síntese de gordura do leite quando infundidos pós-ruminalmente em vacas lactantes (de VETH et al., 2004). No entanto, sua eficiência como um suplemento incluído na dieta de ruminantes em lactação não tem sido avaliada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAOSTAT, 2009), o rebanho mundial caprino é de aproximadamente 879,7 milhões de animais, representando 24,8% dos ruminantes domésticos criados (bovinos, bubalinos, camelos, caprinos e ovinos), contribuindo com cerca de 2,2% da produção mundial de leite e 1,8% da produção de carne. No Brasil, o rebanho é estimado em 14 milhões de animais e a produção anual de leite em 21 milhões de litros (MAPA, 2011).

A gordura do leite é o componente que mais facilmente sofre modificações induzidas por fatores nutricionais (BAUMAN et al., 2006), ocorrendo variações na quantidade secretada e também no perfil de ácidos graxos. Contudo, cabras leiteiras respondem diferente de vacas às alterações na composição da dieta, tanto para produção como para composição do leite, dificultando a extensão de modelos de predição entre as duas espécies (SAMPELAYO et al., 2007). Com relação às modificações na gordura do leite, há poucas informações para cabras comparativamente à vacas (CHILLIARD et al., 2003), sobretudo referente a suplementação com ácido linoleico conjugado (Conjugated Linoleic Acid - CLA). Além disso, os estudos que incluíram CLA na dieta de cabras leiteiras forneceram o suplemento via infusão intravenosa ou abomasal, lipídio encapsulado ou como sais de cálcio de ácidos graxos. Deste modo, permanecem passíveis de investigação os efeitos da utilização de CLA não-protégido da bio-hidrogenação ruminal sobre a produção e a composição de leite de cabras.

2.2 REGULAÇÃO NUTRICIONAL DA SÍNTESE DA GORDURA DO LEITE

A produção de leite com baixo teor de gordura foi primeiramente observada em vacas, com a utilização de dietas que forneciam grandes quantidades de carboidratos rapidamente fermentáveis (baixa fibra e alto concentrado), e/ou dietas suplementadas com óleos de pescado ou óleos vegetais (BAUMAN e GRIINARI, 2001). Essa condição ficou conhecida

como Depressão da Gordura do Leite (DGL) e foi inicialmente associada a um aumento no aporte de ácidos graxos *trans*- C18:1 para a glândula mamária (GRIINARI et al., 1998).

Os ácidos graxos *trans* são formados a partir da bio-hidrogenação parcial de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) no rúmen (JENKINS et al., 2007), sugerindo que alterações nas vias normais de fermentação bacteriana ocorrem previamente a DGL (BAUMAN e GRIINARI, 2001). O estudo conduzido por Griinari et al. (1999), o qual avaliou as relações entre modificações nos padrões de fermentação ruminal, concentração de ácidos graxos no leite e DGL, identificou uma relação linear entre a concentração de *trans*-10 C18:1 e o isômero CLA *trans*-10, *cis*-12 na gordura do leite ($r^2 = 0,70$). Do mesmo modo, houve uma relação curvilinear entre a redução na produção de gordura do leite e o aumento da concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 na gordura do leite de vacas alimentadas com dieta alto concentrado /baixa fibra, suplementada com óleo de girassol. Mais tarde, Baumgard et al. (2000) confirmaram, através de infusão abomasal de fontes purificadas de ácidos graxos, que o CLA *trans*-10, *cis*-12 é o principal isômero responsável pela inibição da síntese e modificação do perfil de ácidos graxos da gordura do leite. A redução na secreção de gordura do leite alcança valor máximo (~50%) entre o quarto e quinto dia de suplementação, e retorna a níveis normais em um padrão de tempo similar quando tratamento com CLA é interrompido (BAUMAN et al., 2008).

2.3 ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO (CLA) *TRANS*-10, *CIS*-12

Os ácidos graxos com cadeia de 18 carbonos e duas duplas ligações separadas por uma ligação simples formam os isômeros do CLA. Em cada dupla ligação, é possível ao átomo de hidrogênio estar na configuração *cis* ou *trans*, possibilitando a formação de vários isômeros. Entretanto, as duplas insaturações mais comuns ocorrem no carbono 9 e 11 ou 10 e 12, a partir do terminal carboxila (LAWSON et al., 2001). Os isômeros CLA *cis*-9, *trans*-11 e CLA *trans*-10, *cis*-12 representam entre 75-90% e 3-5% respectivamente, do CLA encontrado nos produtos oriundos de ruminantes (PARODI, 2003).

Visto que em mamíferos os ácidos graxos são dessaturados no máximo até a posição “ Δ^9 ” (JACOBS et al., 2011), todo CLA *trans*-10, *cis*-12 encontrado na gordura do leite ou tecido adiposo de ruminantes é oriundo da absorção intestinal deste ácido graxo, produzido exclusivamente no rúmen como um intermediário da bio-hidrogenação do ácido linoleico, ou da inclusão deste ácido graxo na dieta dos animais (BAUMAN et al., 2008).

O efeito inibitório do CLA *trans*-10, *cis*-12 sobre a síntese de gordura do leite foi inicialmente confirmado em vacas (BAUMGARD et al., 2000), com um estabelecimento consistente das vias e processos regulatórios (BAUMGARD et al., 2002). Adicionalmente foi estabelecida a existência de uma inter-relação entre os processos fermentativos no rúmen e o metabolismo na glândula mamária, onde ácidos graxos específicos produzidos naturalmente no rúmen afetam a expressão de genes que regulam a síntese de gordura do leite (BAUMAN et al., 2006). Mais recente, o CLA *trans*-10, *cis*-12 demonstrou também efeitos anti-lipogênicos na glândula mamária de pequenos ruminantes (SINCLAIR et al., 2010; SHINGFIELD et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012).

2.4 REGULAÇÃO NUTRICIONAL DA SÍNTESE DE GORDURA DO LEITE EM CABRAS

2.4.1 Relação concentrado:volumoso da dieta

A regulação nutricional do conteúdo e da secreção da gordura do leite difere entre as espécies de ruminantes (CHILLIARD et al., 2007). Como exemplo, tem-se a relação entre o aumento de ácidos graxos *trans* e a DGL, condição bem estabelecida em vacas, porém menos clara em cabras.

Diversos estudos têm avaliado os efeitos de modificações na relação concentrado:volumoso da dieta sobre a composição do leite de cabras, e as respostas encontradas variam amplamente. Resultados descritos por Chilliard e Ferlay (2004) demonstraram que o nível de concentrado na dieta não causou efeito sobre a produção de leite, nem sobre os componentes do leite. Estudos posteriores, avaliando os efeitos da relação concentrado:volumoso, também descreveram que o aumento do concentrado na dieta não causou modificações no conteúdo ou produção de gordura do leite de cabras (ANDRADE e SCHMIDELY, 2006; OILLER et al., 2009; ROUEL et al., 2005). Igualmente, Chilliard et al. (2007) compilaram os dados de experimentos que avaliaram o efeito de dietas contendo alto concentrado/baixa fibra sobre a composição do leite de cabras e, em nenhum experimento o aumento do concentrado na dieta reduziu o conteúdo da gordura do leite.

Diferentemente, outros estudos perceberam diminuição do conteúdo de gordura do leite quando os níveis de concentrado na dieta aumentaram (SCHMIDELY e SAUVANT, 2001; ABIJAOUDET al., 2000), ou aumento significativo no percentual e secreção de gordura diária em função da maior quantidade de forragem na dieta de cabras leiteiras (MELE

et al., 2005). O aumento da quantidade de concentrado na dieta, sem suplementação lipídica, aumentou a produção de leite, diminuiu a gordura do leite e aumentou ligeiramente a concentração de *trans*10 C18:1, contudo sem elevar a concentração de CLA *trans*10, *cis*12 na gordura do leite (SCHMIDELY e SAUVANT, 2001). Diante disso, fica evidente a existência de respostas variadas na composição do leite de cabras frente à variação na relação concentrado:volumoso ou quando lipídios são incluídos na dieta.

2.4.2 Suplementação com lipídios

Estudos conduzidos para investigar a influência da adição de diferentes fontes de gordura sobre a composição do leite de cabras têm demonstrado quase como uma regra geral, que a suplementação lipídica aumenta a produção e o conteúdo de gordura do leite (BROW-CROWDER et al., 2001; MELE et al., 2005; MIR et al., 1999). Suplementos lipídicos ricos em AGPI não induziram a DGL em cabras, como foi claramente observado em vacas (BAUMAN e GRIINARI, 2001), confirmando a existência de diferenças entre as duas espécies quanto à regulação nutricional da síntese de gordura do leite.

Por outro lado, o fornecimento de dietas muito baixas em lipídios diminuiu a produção de leite e o conteúdo de gordura do leite de cabras (CHILLIARD et al., 2003). Comparado com dietas sem suplementação lipídica, tanto a inclusão de 20% de soja extrusada (SCHMIDELY et al., 2005) ou 7% de óleo de girassol ou linhaça (CHILLIARD et al., 2006) na matéria seca, aumentaram o conteúdo e a produção de gordura do leite de cabras, mesmo em dietas com alto concentrado.

As respostas à suplementação lipídica em cabras, em termos de composição de ácidos graxos do leite são muito próximas das observadas em vacas (BERNARD et al., 2005). Em ambas as espécies, os ácidos graxos saturados de cadeia média (C10:0 a C16:0), são os que mais facilmente podem ser alterados por fatores dietéticos (CHILLIARD et al., 2007), enquanto os ácidos graxos de cadeia curta (C4:0, C6:0 e em menor extensão C8:0), sofrem alterações leves com a suplementação lipídica (CHILLIARD et al., 2003).

Mir et al. (1999) incluíram quatro níveis de óleo de canola (0, 40, 80 e 120 g/d) na dieta de cabras e observaram que o maior e o menor percentual de gordura do leite foram obtidos com a inclusão de 120 e 0 g/d de óleo, respectivamente. Com relação ao perfil de ácidos graxos, houve um aumento quadrático na quantidade de C18:1 e uma diminuição quadrática dos ácidos graxos de cadeia curta e média em resposta aos níveis crescentes de óleo de canola. Mais recentemente, Bernard et al. (2005) suplementaram cabras com sementes

de linhaça ou óleo de girassol rico em ácido oleico (11,2 e 3,5% da ingestão de matéria seca - IMS, respectivamente). Ambos os suplementos diminuíram a secreção dos ácidos graxos saturados com comprimento de cadeia entre C10 e C17 comparados a dieta controle (sem suplementação). Ao mesmo tempo, houve um aumento no percentual e secreção de C18:0 na gordura do leite.

Conforme revisado por Chilliard et al. (2006), quando a fonte de gordura é composta por AGPI, a composição e o grau de proteção desse suplemento contra a bio-hidrogenação ruminal determinarão a quantidade de AGPI na gordura do leite. Schmidely et al., (2005) forneceram diferentes níveis de soja extrusada (fonte de C18:2) para cabras leiteiras alimentadas com dietas contendo alto concentrado e a inclusão da soja aumentou a produção de leite, produção e conteúdo de gordura do leite e aumentou a concentração de C18:0 e C18:1 na gordura do leite.

Chilliard et al. (2006) revisaram o efeito de 36 dietas e concluíram que a inclusão de óleos ricos em ácido oleico, linoleico ou linolênico em dietas com alto concentrado (>50%) ou silagem de milho, aumentou a concentração de *trans*-10 C18:1 no leite. Conforme estes autores, a produção de gordura do leite foi negativamente correlacionada com a concentração de *trans*-10 C18:1 no leite. Igualmente, em dietas contendo elevado teor de amido suplementadas com óleo de girassol, houve um aumento na concentração de *trans*-10 C18:1, contudo a produção de gordura do leite e a secreção de ácidos graxos de cadeia curta e média, bem como a atividade Δ^9 Dessaturase, aumentaram (BERNARD et al., 2005). Esses resultados indicaram que outros fatores além do *trans*-10 C18:1 poderiam exercer um papel regulador da lipogênese na glândula mamária de cabras.

Quando o suplemento lipídico fornecido é uma gordura saturada, protegido ou não da bio-hidrogenação ruminal, a gordura do leite parece ser enriquecida com os ácidos graxos correspondentes no alimento, com aumento simultâneo de ácidos graxos monoinsaturados com o mesmo número de carbonos dos saturados presentes na dieta (SAMPELAYO et al., 2007).

2.4.3 Suplementação com CLA *trans*-10, *cis*-12

Em vacas, a redução da gordura do leite inicia após o dia 3-4 de suplementação e ocorre de um modo dose-dependente em resposta a infusão duodenal ou utilização de suplementos protegidos da bio-hidrogenação ruminal contendo CLA *trans*-10, *cis*-12 (de VETH et al., 2004). Quando analisados coletivamente, os estudos que forneceram CLA

contendo o isômero *trans*-10, *cis*-12 para cabras em lactação observaram respostas variadas, possivelmente devido às diferenças de delineamento experimental (Tabela 1).

Estudo realizado por Gulati et al. (2000), avaliando a proteção de isômeros do CLA contra bio-hidrogenação ruminal e a incorporação destes na gordura do leite, foi um dos primeiros trabalhos a reportar o aumento da concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 na gordura do leite acompanhado por modificações no perfil de ácidos graxos do leite de cabras. Conforme os autores, a suplementação com CLA reduziu a secreção dos ácidos graxos C10 a C14 e também diminuiu a relação C18:1/C18:0, indicando possíveis alterações tanto na síntese “*de novo*” como na esterificação de ácidos graxos na glândula mamária, embora os resultados foram obtidos a partir de um número reduzido de animais e um curto período de suplementação.

Posteriormente, Erasmus et al. (2004) forneceram 1,3; 2,6 e 3,9 g/d de CLA (17,5% *trans*-10, *cis*-12) protegido da bio-hidrogenação ruminal, equivalente a 50, 100 e 150% da dose recomendada pelo fabricante para vacas de leite (base no peso vivo) e nenhuma modificação foi observada no conteúdo ou produção de gordura do leite. Um segundo ensaio foi então conduzido utilizando as doses de 30 e 60 g/d de CLA, representando um aumento de 10 a 20 vezes na dose recomendada para vacas leiteiras e o conteúdo de gordura do leite foi reduzido 0,07 e 0,57 unidades percentuais pelas doses 30 e 60 g/d, respectivamente o que levou os autores a concluírem que doses muito maiores de CLA *trans*-10, *cis*-12 deveriam ser utilizadas em cabras para se obter os mesmos efeitos sobre a gordura do leite previamente observados em vacas. Resultados semelhantes foram descritos por Schmidely e Morand-Fehr (2004), após suplementação de cabras leiteiras com CLA (1,0 g/d *cis*-9, *trans*-11 e 0,2 g/d *trans*-10, *cis*-12) via infusão intravenosa durante dois dias. Os autores não observaram alterações no conteúdo e na produção de gordura do leite, nem no perfil de ácidos graxos e na concentração dos isômeros de CLA na gordura do leite.

Em seguida, Andrade e Schmidely (2006) avaliaram os efeitos da infusão duodenal durante três dias de uma alta dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 em cabras lactantes e não foram observadas alterações no conteúdo e produção de gordura do leite, nem sobre a concentração dos ácidos graxos saturados com cadeia entre C4 e C16. Entretanto, houve um aumento nas concentrações de *trans*-10 C18:1, *trans*-11 C18:1 e CLA *trans*-10, *cis*-12 na gordura do leite,

Tabela1 - Efeitos da suplementação com ácido linoleico conjugado (CLA) *trans*-10, *cis*-12 sobre a composição e perfil de ácidos graxos do leite de cabras.

Referência	Gulati et al., 2000	Erasmus et al., 2004	Schmidely e Morand-Fehr, 2004	Andrade e Schmidely, 2006	Lock et al., 2008	Shingfield et al., 2009
Parâmetro						
Via de suplementação	Dieta	Dieta	Intravenosa	Duodenal	Dieta	Dieta
Nº de animais	2	8	4	8	30	8
Dose CLA <i>t</i> 10, <i>c</i> 12 (g/d)	10,9	11,0	0,2	2,0	6,0	22,4
Duração do estudo (dias)	4	8	2	3	14	10
Redução na gordura do leite (%)						
Conteúdo	-	0,57	n.s.	n.s.	18,0	32,6
Produção	-	-	n.s.	n.s.	21,0	40,8
Secreção de ácidos graxos						
≤C16	Reduciu	-	n.s.	n.s.	Reduciu	Reduciu
>C16	Aumentou	-	n.s.	Aumentou	Aumentou	n.s.
18:1/18:0†	Reduciu	-	-	Reduciu	Reduciu	Reduciu
Eficiência de Transferência (%)	25,5	-	-	17,8	1,8	2,0
CLA <i>t</i> 10, <i>c</i> 12 (g/100g AG)‡	2,49	-	-	0,39	0,19	0,58

(†) Índice dessaturase para C18:1; (‡) Concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 na gordura do leite; (-) não relatado; (n.s.) não significativo.

Fonte: Produção do próprio autor.

acompanhado por uma redução na relação *cis*-9, *trans*-11 C18:2/*trans*-11 C18:1. Os autores concluíram que a lipogênese na glândula mamária de cabras não foi reduzida pelo CLA *trans*-10, *cis*-12, contudo a dessaturação de ácidos graxos de cadeia longa pareceu ter sido diminuída.

Em sequência, Lock et al. (2008) demonstraram que o CLA *trans*-10, *cis*-12 reduz a síntese de gordura do leite em cabras de maneira similar ao observado em vacas leiteiras e ovelhas. Os autores suplementaram duas doses de CLA *trans*-10, *cis*-12 (3,0 e 6,0 g/d) como um lipídio encapsulado durante 14 dias, e observaram redução na produção de gordura de 8 e 21% e no conteúdo de gordura de 5 e 18% para a menor e a maior dose, respectivamente. Conforme os autores, a redução observada na gordura do leite foi devido à diminuição na síntese “*de novo*” de ácidos graxos e na captação de ácidos graxos pré-formados. Entretanto, em uma comparação dose-resposta, os dados obtidos sugerem que a redução na síntese de gordura do leite foi menor em cabras comparado a vacas leiteiras ou ovelhas.

Recentemente, Shingfield et al. (2009) incluíram CLA (7,47; 14,9 e 22,4 g/d de CLA *trans*-10, *cis*-12) na forma de sais de cálcio na dieta de cabras leiteiras durante 10 dias. Quando o CLA substituiu o milho grão no concentrado, houve uma redução de 19,9, 27,9 e 32,3% na produção de gordura do leite e de 16,2, 22,7 e 29,4% no conteúdo de gordura do leite, da menor para a maior dose de CLA *trans*-10, *cis*-12, respectivamente. Em um segundo experimento, a substituição de sais de cálcio de óleo de palma por CLA na dieta reduziu 17,5, 39,0 e 49,3% a produção de gordura do leite e 24,0; 33,8 e 35,8% o conteúdo de gordura do leite, da menor para a maior dose, respectivamente. Em ambos os ensaios, a suplementação com CLA aumentou a concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 na gordura do leite. Conforme os autores, a redução na gordura do leite foi devido a uma diminuição na secreção de ácidos graxos sintetizados “*de novo*” na glândula mamária, sem nenhuma alteração na captação de ácidos graxos pré-formados, levando a uma modificação no perfil de ácidos graxos do leite, com maior participação dos ácidos graxos de cadeia longa.

2.5 EFEITOS DO CLA *TRANS*-10, *CIS*-12 NA GLÂNDULA MAMÁRIA

Estudos têm demonstrado um efeito direto do CLA *trans*-10, *cis*-12 sobre a redução na abundância do mRNA para Acetyl CoA Carboxilase (ACC), Sintase de Ácidos Graxos (FAS), Acil Glicerol Fosfato Acil Transferase (AGPAT), Estearoil CoA Dessaturase (Δ^9 Dessaturase) e Lipo Proteína Lipase (LPL) na glândula mamária de vacas leiteiras (SHINGFIELD e GRIINARI, 2007), e esses resultados são consistentes com a redução na expressão de genes

que codificam enzimas envolvidas com síntese “*de novo*”, absorção, transporte e dessaturação de ácidos graxos e síntese de triglicerídeos (BAUMGARD et al., 2002). Similarmente, lipídios encapsulados (LOCK et al., 2008) ou sais de cálcio (SHINGFIELD et al., 2009) contendo CLA *trans*-10, *cis*-12 reduziram a secreção de gordura do leite de cabras entre 8 a 49,3%, dependendo do nível de suplementação. Ambos estudos constataram uma redução na secreção dos ácidos graxos de cadeia curta e média, acompanhada por um aumento no conteúdo de *trans*-10, *cis*-12 na gordura do leite. Deste modo, foi sugerido que o CLA *trans*-10, *cis*-12 inibe a síntese “*de novo*” de ácidos graxos na glândula mamária de cabras de forma similar ao observado em vacas. Do mesmo modo, Andrade e Schmidely (2006) concluíram que a infusão duodenal de CLA *trans*-10, *cis*-12 reduz a atividade da enzima Δ^9 Dessaturase, baseando-se na relação produto:substrato para esta enzima.

Diferente de vacas, em cabras os estudos que avaliaram os efeitos de suplementação com CLA *trans*-10, *cis*-12 não examinaram diretamente os mecanismos de regulação na abundância de genes ou na transcrição de enzimas lipogênicas chaves na síntese de ácidos graxos do leite. Assim, na maioria dos trabalhos, a atividade de enzimas lipogênicas foi estimada com base no perfil de ácidos graxos secretados na gordura do leite assumindo que os mecanismos de atuação do CLA *trans*-10, *cis*-12 são semelhantes entre bovinos e caprinos.

A extensão de modelos baseados em estudos com vacas leiteiras para explicar a DGL em cabras pode apresentar limitações, visto que respostas diferentes foram observadas mesmo quando a fonte de lipídio utilizada foi a mesma. Comparações indiretas entre as espécies indicam que a redução na secreção ácidos graxos com cadeia entre C10:0 a C16:0 em cabras suplementadas com óleo de linhaça ou de girassol de 27% e 32% respectivamente, foi menor que a redução correspondente de 46% e 69% observada em vacas recebendo o mesmo tipo de suplemento (SHINGFIELD et al., 2010). Analisando 24 dietas que causaram DGL, Bernard et al. (2008) observaram que a maior concentração observada de *trans*-10 C18:1 em cabras foi muito menor que em vacas, e que não houve aumento significativo de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite de cabras recebendo essas dietas.

2.6 BALANÇO ENERGÉTICO

O início da lactação e a alimentação de animais de alta produção somente com pastagens, são situações onde frequentemente os nutrientes ingeridos tornam-se insuficientes para atender as demandas da lactação (BAUMAN et al., 2008) e, entre os constituintes do leite, a síntese da gordura demanda o maior custo energético.

Harvatine et al. (2009) descreveram que uma redução de 10% na síntese de gordura do leite equivaleria a uma redução de 6% na energia exigida para produção de leite, contribuindo para melhorar o balanço energético. Entretanto, em vacas, a maior parte dos estudos avaliando suplementação com CLA *trans*-10, *cis*-12 e DGL foi conduzida com animais em balanço energético positivo (BAUMAN et al., 2008). Além disso, torna-se difícil identificar efeitos sobre a produção de leite, IMS e ganho de peso, quando os experimentos são avaliados individualmente (HARVATINE et al., 2009).

Resultados importantes foram descritos por Harvatine et al. (2009) onde, após a DGL causada pelo CLA *trans*-10, *cis*-12, um aumento na expressão de genes envolvidos com a síntese de lipídios no tecido adiposo foi observada. Esses dados sugerem que a energia “economizada” com a redução da gordura do leite foi redirecionada para reposição de reservas no tecido adiposo. Os autores realizaram ainda uma meta-análise ($n=14$) para investigar o metabolismo energético durante a DGL. O consumo voluntário de MS diminuiu 1,5/kg/d durante a DGL causada pelo CLA *trans*-10, *cis*-12, justificando ao menos parte da “sobra energética” proveniente da redução da gordura do leite.

Similarmente, Sinclair et al. (2010) relataram que a suplementação com CLA *trans*-10, *cis*-12 para ovelhas reduziu o conteúdo e a produção de gordura do leite (34 e 24%, respectivamente), e aumentou a produção de leite (13%). Estes resultados, juntamente com os publicados por Lock et al. (2006), sugerem que a energia “economizada” com a redução na síntese de gordura do leite após a suplementação com CLA *trans*-10, *cis*-12, poderia em certas circunstâncias, aumentar a produção de leite. Quando avaliados individualmente, os estudos conhecidos que suplementaram CLA *trans*-10, *cis*-12 para cabras em lactação não relatam nenhum efeito sobre produção de leite, conteúdo e produção de proteína do leite, IMS, peso vivo ou condição de escore corporal.

3 HIPÓTESES

O fornecimento de suplementos protegidos da bio-hidrogenação ruminal contendo CLA *trans*-10, *cis*-12 têm resultado em inibição da síntese de gordura do leite em vacas, ovelhas e cabras (SHINGFIELD et al., 2010). A energia economizada com a redução na gordura do leite pode ser utilizada para síntese de outros componentes do leite (BERNAL-SANTOS et al., 2003; MEDEIROS et al., 2010) ou ser utilizada para reposição das reservas corporais de gordura (HARVATINE et al., 2009). Quando infundidos pós-rúmen, os ésteres metílicos de CLA foram tão efetivos quanto o CLA na forma de ácidos graxos livres em

reduzir a gordura do leite de vacas (de VETH et al., 2004). Entretanto, sua eficácia como um suplemento incluído na dieta não tem sido avaliada em estudos com ruminantes em lactação. Diante disso, as seguintes hipóteses foram formuladas:

- 1) A inclusão de ésteres metílicos de CLA contendo o isômero *trans*-10, *cis*-12 na dieta de cabras leiteiras reduz o teor e a secreção de gordura do leite.
- 2) A suplementação de cabras lactantes com CLA *trans*-10, *cis*-12 reduz a energia exigida para lactação, o que deve resultar em uma diminuição na ingestão de matéria seca, ou aumento de produção de leite, ou melhora da condição corporal.
- 3) O fornecimento de CLA contendo os isômeros *trans*-10, *cis*-12 e *cis*-9, *trans*-11 modifica o perfil de ácidos graxos do leite e aumenta a secreção destes isômeros na gordura do leite.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho, composição do leite, perfil de ácidos graxos do leite e balanço energético de cabras leiteiras recebendo ésteres metílicos de CLA na dieta na forma de ração totalmente misturada (TMR).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a produção de leite, consumo de matéria seca e peso vivo.
- 2) Analisar a composição físico-química (gordura, proteína e lactose), perfil de ácidos graxos e contagem de células somáticas do leite.
- 3) Avaliar metabólitos plasmáticos (glicose, insulina e ácidos graxos não esterificados).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 LOCAL, ANIMAIS E INSTALAÇÕES

O experimento foi conduzido na Granja Água Limpa ($21^{\circ}31'43''$ S, $43^{\circ}16'36''$ O), município de Piau, estado de Minas Gerais, em trabalho conjunto com o Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite (Embrapa Gado de Leite). Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal – CETEA (protocolo nº: 10411), do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, de acordo com a legislação vigente e os princípios éticos publicados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Foram utilizadas 18 cabras da raça Toggenburg, multíparas e não prenhes, que ao início do experimento apresentavam os seguintes valores para produção de leite, dias em lactação e peso vivo: $2,05 \pm 0,12$ kg/dia (média ± erro padrão), 105 ± 3,9 e $49,75 \pm 2,3$ kg, respectivamente. Os animais foram mantidos em baias individuais com acesso *ad libitum* à água e sal mineral para caprinos. As cabras foram ordenhadas manualmente duas vezes ao dia, às 6:00 e 16:00h, e monitoradas durante todo o experimento em relação à presença de mastite através dos testes Caneca de Fundo Preto e “California Mastitis Test – CMT”.

5.2 DIETA EXPERIMENTAL

A dieta foi formulada com o Small Ruminant Nutrition System (TEDESCHI et al., 2010) para complementar ou exceder as exigências nutricionais calculadas de acordo com o NRC (2007). A dieta foi composta por silagem de milho como único volumoso, o qual foi fornecido misturado a um concentrado (41:59, em base de matéria seca - MS) composto por milho moído, farelo de soja, calcário calcítico e um núcleo vitamínico/mineral (Tabela 2), formando a Ração Totalmente Misturada (*Total Mixed Ration* - TMR). Os ingredientes que compuseram o concentrado foram misturados com uso de um misturador vertical, com capacidade para 500 kg. A mistura dos ingredientes da TMR foi realizada manualmente em um vasilhame com capacidade aproximada de 15 kg. As cabras receberam em média 1,10 kg

de MS de TMR ao dia (aproximadamente 2,4% do PV), fornecidos após a ordenha da manhã (7:00h), ao meio-dia (12:00h) e após a ordenha da tarde (18:00h). Durante o período experimental, a ingestão de matéria seca da TMR foi ajustada para 95% do consumo diário observado durante o período de adaptação de duas semanas. Este procedimento foi realizado para garantir a completa ingestão do concentrado presente na TMR, no qual os suplementos lipídicos (tratamentos) foram previamente misturados (conforme descrito no item a seguir).

Tabela 2 - Ingredientes e composição química da Ração Totalmente Misturada (TMR).

Composição ¹	TMR
Ingredientes, % MS	
Silagem de milho	41,0
Milho moído	39,5
Farelo de soja	15,9
Calcário calcítico (39%)	2,6
Premix Vitamínico-mineral	1,0
Composição química	
Matéria seca (MS), %	62,1
Proteína bruta, % da MS	13,6
Fibra em detergente neutro, % da MS	38,1
Fibra em detergente ácido, % da MS	16,8
Extrato etéreo, % da MS	3,2
Energia metabolizável, Mcal/kg de MS ²	2,7

¹ Ingredientes e composição química não incluem os tratamentos.

² Calculada conforme E (Kika) of the Garza Institute for Goat Research–Langston University.

Posteriormente ao completo consumo da última fração da TMR do dia, silagem de milho foi oferecida *ad libitum* a todos os animais. As sobras de silagem foram pesadas no dia seguinte, antes da ordenha na manhã, para determinação da IMS diária.

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTOS

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em um arranjo “cross-over”, com dois períodos de tratamento de 14 dias intercalados por um intervalo de 6

dias, durante o qual os tratamentos foram suspensos para minimizar algum efeito residual. Os seguintes tratamentos foram avaliados: 1) Controle: 30 g/d de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa (Megalac-E®, Church & Dwight, Nova Ponte, MG, Brasil) ou 2) CLA: 30 g/d de um suplemento lipídico (CLA Luta-60®, BASF AG, São Paulo, SP, Brasil) não protegido da bio-hidrogenação ruminal, na forma de ésteres metílicos (Tabela 3).

Tabela 3 - Perfil de ácidos graxos (AG) dos suplementos lipídicos (g/100g de ácido graxo).

AG (g/100 g de AG totais)	Suplemento ¹	
	Controle	CLA
C4:0 a C11:0	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 a <i>trans</i> -16	4,76	nd
C18:1 <i>cis</i> -9	18,64	27,40
C18:1 <i>cis</i> -11 a <i>cis</i> -13	2,33	nd
Isômeros C18:2 não-conjugados	0,84	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
Σ AG de cadeia longa (>C18)	1,49	nd
Não identificados	4,52	3,00

¹ Controle: sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa; CLA: ésteres metílicos de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) não protegidos da bio-hidrogenação; nd: não detectado.

A dose de CLA foi estimada de acordo com o procedimento descrito por Lock et al. (2006; 2008), o qual consiste de uma extração para cabras leiteiras, em base de peso metabólico, de resultados publicados a partir de estudos que suplementaram CLA *trans*-10, *cis*-12 para vacas leiteiras. Foi assumido que 0,4 g/d de CLA *trans*-10, *cis*-12 alcançando o abomaso resultaria em uma redução de 20 a 25% na secreção de gordura do leite. Considerado que o suplemento CLA continha 29,9% de CLA *trans*-10, *cis*-12 e estimando uma bio-hidrogenação de 95% (JENKINS et al., 2008), a dose de 30 g/d de CLA deveria ser

fornecida na dieta para liberar 0,4 g/d de CLA *trans*-10, *cis*-12 no abomoso e promover a depressão na gordura do leite entre 20 a 25%.

A dose total dos tratamentos (suplementos lipídicos – 30 g/d) foi dividida em três partes iguais (10 g), cada parte foi misturada manualmente com o concentrado no momento do fornecimento, que por sua vez foi misturado à silagem de milho formando a TMR. A TMR contendo os tratamentos foi fornecida três vezes ao dia nos horários anteriormente descritos.

5.4 COLETA DE AMOSTRAS E AVALIAÇÕES

5.4.1 Alimentos

A ingestão de matéria seca foi registrada, individualmente, diariamente durante todo o período experimental. Amostras de silagem de milho e do concentrado foram coletadas semanalmente durante o período experimental e armazenadas à -20 °C. No final do experimento, amostras compostas foram formadas para determinação das suas composições químicas.

5.4.2 Leite

A produção de leite, obtida através de ordenha manual, foi registrada, individualmente, diariamente durante todo o período experimental. Amostras de leite foram representativas das ordenhas da manhã e da tarde, coletadas a cada dois dias em frascos com conservante (bromopol tablet; D&F Control System, San Ramon, CA, Estados Unidos da America) e enviadas no mesmo dia da coleta, em isopor com gelo para o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite para análise da composição química e da contagem de células somáticas (CCS). No último dia de cada período de tratamento (dia 14), amostras de leite foram coletadas em frascos sem conservante e armazenadas a -20 °C para posterior análise do perfil de ácidos graxos.

5.4.3 Peso vivo e parâmetros metabólicos

Os animais foram pesados no primeiro e último dia de cada período de tratamento. As amostras de sangue foram coletadas no último dia de cada período de tratamento por venopunção jugular, em tubos do tipo “Vacutainer” (Zhejiang Kangshi Medical Devices Co., Hangzhou, China) de 5 mL contendo anti-coagulante (EDTA), sendo imediatamente

resfriadas em isopor com gelo, levadas ao laboratório e centrifugadas a 2.800 x g por 15 min. e o plasma obtido congelado a -20°C em tubos do tipo “Eppendorf” para análise de glicose, insulina e ácidos graxos não esterificados (AGNE). Ambos os procedimentos foram realizados imediatamente após a ordenha da manhã, antes do fornecimento da primeira fração da TMR.

5.4.4 Análises químicas

As amostras de silagem de milho e concentrado foram analisadas de acordo com a AOAC (2000) para MS (método 934.01), proteína bruta (método 988.05), extrato etéreo (método 925.38) e cinzas (método 923.03), enquanto o conteúdo de fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), nitrogênio insolúvel em detergente neutro (NDIN), nitrogênio insolúvel em detergente ácido (NIDA) e lignina (LIG) foram determinados de acordo com Van Soest et al. (1991). O conteúdo de FDN foi determinado com o uso de alfa-amilase termoestável e corrigido para cinzas.

Os componentes do leite (gordura, proteína, lactose e sólidos totais) foram determinado por espectrometria no infravermelho (FIL/IDL) utilizando o aparelho Bentley 2000 (Bentley Instruments Inc., Chaska, Minnesota, Estados Unidos) conforme AOAC 2000 (método 972.160) e a CCS determinada por citometria de fluxo, com coloração do DNA, excitação a laser e detecção da radiação representativa de cada bactéria na forma de pulso (FIL/IDL, Bentley, Bactocount IBC). A concentração plasmática de ácidos graxos não esterificados (AGNE) foi determinada por método enzimático-colorimétrico (NEFA C; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) usando microplaca de ELISA com 96 poços. A concentração de glicose foi determinada em analisador automático YSI 2700 (Biochemistry Analyzer, Yellow Springs, OH), e a insulina por radioimunoensaio (UNESP/Botucatu, Laboratório de Endocrinologia).

5.4.5 Análise de ácidos graxos

A gordura do leite foi extraída conforme descrito por Hara e Radin (1978) usando 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 fração gordurosa foi obtida previamente por centrifugação do leite a 17.800 x g por 30 min a 8 °C. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) do leite foram obtidos por transmetilação base-catalisada

usando um reagente de metilação (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 (CHOINARD et al., 1999). A mistura foi neutralizada com ácido oxálico (1 g ácido oxálico em 30 ml de éter dietílico) e cloreto de cálcio foi adicionado para remover resíduos de metanol. Os EMAG foram determinados por cromatografia gasosa (model 6890 N; Agilent Technologies, Barueri, São Paulo, Brasil), equipado com detector de ionização de chama (*flame-ionization detector – FID*) e coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 (100 m × 0,25 mm de diâmetro interno × 0,2 µm de espessura de filme; Varian Inc., Mississauga, ON). As condições de operação incluíram temperatura de injeção e detecção a 250 °C, H₂ como gás carreador (1 mL/min) e para o detector de ionização de chamas (35 mL/min), N₂ como gás *makeup* (30 mL/min) e ar sintético purificado (286 mL/min). A temperatura inicial foi de 45 °C, mantida por 4 min, aumentada 13 °C/min até 175 °C e mantida por 27 min, aumentada novamente 4 °C/min até 215 °C e mantida por 35 min (CRUZ-HERNANDEZ et al., 2007). Os EMAG foram identificados por comparação com três isômeros padrões de referência (Supelco37 mix 47885-U, Linoleic acid isomers mix 47791 e CLA isomers mix 05632; Sigma Aldrich®) como descrito por Kramer et al. (2001) e Cruz-Hernandez et al. (2007). A participação de cada ácido graxo (AG) na gordura do leite foi corrigida em relação à menor resposta observada no FID conforme descrito na tabela 1/coluna 1 do trabalho publicado por Wolff et al. (1995).

O perfil de ácidos graxos do MEGALAC-E (saís 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 (PALMQUIST e JENKINS, 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®), 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.

5.5 CÁLCULOS

A eficiência de transferência do CLA *trans*-10, *cis*-12 da dieta para o leite foi calculada através da comparação entre a secreção do isômero na gordura do leite (g/d) e a

quantidade do isômero provida pelo tratamento CLA (g/d). A quantidade de CLA *trans*-10, *cis*-12 que alcançou o abomaso foi estimada através da equação proposta por Veth et al., 2004 – Figura 5, p.6. Do mesmo modo, a bio-hidrogenação do CLA *trans*-10, *cis*-12 foi estimada através do quociente entre a quantidade do isômero alcançando o abomaso (g/d) e àquela provida pelo tratamento CLA (g/d). Em ambos os cálculos, a concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 observada no leite do tratamento controle (Megalac-E®) foi utilizado como um valor de correção para a quantidade observada no tratamento CLA (de VETH et al., 2005).

O balanço energético (BE) foi calculado utilizando a seguinte equação (NRC, 2001): BE = EM ingerida – (EM para manutenção + EM para produção). A EM ingerida foi calculada através da multiplicação da ingestão individual diária de matéria seca pelo valor energético da dieta mais a EM fornecida pelos suplementos lipídicos (Megalac-E®: 7,1 Mckal/kg e CLA LUTA-60®: 8,8 Mckal/kg; valores fornecidos pelos fabricantes). Os nutrientes digestíveis totais (NDT) dos alimentos foram calculados através da fórmula proposta por Weiss (1993). Para conversão do valor de NDT para energia metabolizável (EM) foi utilizado o sistema E (Kika) of the Garza Institute for Goat Research – Langston University (<http://www.luresext.edu/goats/research/me4.html>). A EM para manutenção foi calculada usando a seguinte equação (NRC, 2007): EM para manutenção = 110 kcal x PV^{0,75}. A EM para lactação foi calculada de acordo com a fórmula descrita por NSAHLAI et al., (2004): produção de leite × (1,4694 + (0,4025 × % de gordura do leite))) / 0,589.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados como um arranjo “cross-over” usando o PROC MIXED do pacote estatístico SAS (SAS INSTITUT, 2002). Os efeitos de sequência (Controle – CLA ou CLA – Controle) e tratamentos (Controle ou CLA) foram assumidos como efeitos fixos, os efeitos de período (1 ou 2) e animal dentro da sequência foram assumidos como efeitos aleatórios como indicado por Kuehl (2000). Para análises ao longo do tempo (ex. produção de leite e componentes do leite), utilizou-se como medidas repetidas assumindo animal dentro da sequência como efeito aleatório. O modelo de estrutura da matriz de covariância Auto-regressiva 1 foi utilizado. As médias e erro padrão da média (EPM) estão apresentados e as diferenças entre os tratamentos foram considerados significantes quando $P < 0,05$ e como tendência até $P < 0,10$.

As relações entre o peso metabólico do animal, a concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite e a variação observada na gordura do leite foram avaliadas através do procedimento NLIN (SAS INSTITUT, 2002). No modelo de decaimento exponencial $y = \beta_0 * e^{\beta_1 x} + \varepsilon$, “y” representa a concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite, “x” o peso metabólico do animal e “ ε ” é o termo do erro da regressão. No modelo de decaimento potencial $y = \beta_0 * x^{\beta_1} + \varepsilon$, “y” representa a mudança no conteúdo de gordura do leite, “x” a ingestão de CLA *trans*-10, *cis*-12 ou a concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite e “ ε ” é o termo do erro da regressão. A estimativa dos parâmetros foi obtida usando o algoritmo não-linear de Gauss-Newton, “default” do software. O quadrado médio do erro, a estrutura residual, os limites inferiores e superiores do intervalo de confiança (95%) e os valores do coeficiente de determinação foram usados para determinar a adequacidade dos modelos. Os dados situados fora do intervalo -2 a 2 do resíduo “studentizado” foram considerados *outliers* e removidos da análise.

6 RESULTADOS

6.1 DESEMPENHO E COMPOSIÇÃO DO LEITE

Os animais permaneceram em boas condições de saúde durante todo o experimento e não houve sobras da dieta completa fornecida garantindo o consumo dos tratamentos. Ainda, nenhum caso de mastite foi constatado.

Os dados de desempenho e composição do leite são mostrados na Tabela 3. A ingestão diária de matéria seca não diferiu entre os tratamentos ($P>0,05$), sendo $28,4 \pm 2,6$ g/kg d

Tabela 4 - Desempenho e composição do leite de cabras Toggenburg suplementadas com ácido linoleico conjugado (CLA).

Variável	Tratamentos			<i>P</i>
	Controle ¹	CLA ²	EPM	
Peso vivo, kg	45,18	45,57	10,45	0,087
IMS ³ , g/kg de PV/d	28,54	28,30	2,63	0,374
Produção de leite, g/d	1896	1910	0,28	0,263
Gordura				
%	4,11	3,29	0,39	<0,001
g/d	74,98	61,58	10,05	<0,001
Proteína				
%	2,81	2,80	0,18	0,269
g/d	51,32	51,68	72,89	0,441
Lactose				
%	4,20	4,22	0,25	0,118
g/d	75,81	76,74	11,28	0,168
Sólidos totais				
%	12,01	11,17	0,73	<0,001
g/d	219,14	206,65	29,13	<0,001
ELCCS ⁴	5,40	5,49	1,27	0,239

¹30 g/d de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa.

²30 g/d de ésteres metílicos de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) não protegidos da bio-hidrogenação.

³Ingestão de matéria seca.

⁴Escore Linear da Contagem de células somáticas do leite - ELCCS = LN(CCS/100)/(0,693147)+3 (NATIONAL MASTITIS COUNCIL, 1996).

peso vivo (média ± erro padrão) o valor médio observado para ambos os tratamentos. Com relação ao peso vivo, a inclusão de CLA na dieta tendeu ($P=0,08$) a aumentar este parâmetro (Tabela 4).

A suplementação da dieta com CLA não teve efeito ($P>0,05$) sobre a produção de leite, teor e secreção de proteína e lactose, e contagem de células somáticas do leite (Tabela 4). No entanto, houve redução de 19,9 e 17,9% no teor e na secreção de gordura do leite, respectivamente, em resposta ao tratamento com CLA, resultando em reduções no teor (7,0%) e na secreção (5,7%) de sólidos totais do leite.

6.2 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE

A redução na síntese da gordura do leite causada pela suplementação com CLA foi acompanhada por mudanças no perfil dos ácidos graxos (Tabela 5).

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos (AG) da gordura do leite de cabras Toggenburg suplementadas ácido linoleico conjugado (CLA).

AG (g/100g de AG)	Tratamento			<i>P</i>
	Controle ¹	CLA ²	EPM	
C4:0	2,62	2,84	0,072	0,006
C6:0	2,49	2,00	0,074	<0,001
C8:0	2,68	1,93	0,113	<0,001
C10:0	9,09	6,51	0,384	<0,001
C11:0	0,27	0,13	0,016	<0,001
C12:0	3,73	2,90	0,255	<0,001
C13:0	0,08	0,10	0,008	0,061
C14:0	9,08	9,09	0,297	0,925
C15:0 <i>iso</i>	0,18	0,21	0,009	0,002
C15:0 <i>anteiso</i>	0,30	0,33	0,009	0,041
C14:1 <i>cis</i> -9	0,11	0,06	0,007	<0,001
C15:0	0,73	0,80	0,019	0,009
C16:0	27,68	24,68	0,621	<0,001
C16:1 <i>cis</i> -9	0,58	0,47	0,023	0,001
C17:0	0,45	0,51	0,036	0,001
C17:1 <i>cis</i> -9	0,18	0,15	0,013	0,001
C18:0	10,24	15,83	0,607	<0,001
C18:1 <i>trans</i> -4	0,03	0,04	0,010	0,013
C18:1 <i>trans</i> -5	0,03	0,07	0,008	0,005
C18:1 <i>trans</i> -6 + <i>trans</i> -7 + <i>trans</i> -8	0,25	0,38	0,018	<0,001
C18:1 <i>trans</i> -9	0,38	0,50	0,039	0,036

C18:1 <i>trans</i> -10	0,60	1,53	0,071	<0,001
C18:1 <i>trans</i> -11	2,13	2,68	0,211	0,018
C18:1 <i>trans</i> -12	0,54	0,67	0,034	0,001
C18:1 <i>trans</i> -13+ <i>trans</i> -14	0,58	0,82	0,941	<0,001
C18:1 <i>cis</i> -9 + <i>trans</i> -15	18,50	16,54	0,941	0,070
C18:1 <i>cis</i> -11	1,09	1,13	0,039	0,443
C18:1 <i>cis</i> -12	0,66	1,05	0,063	<0,001
C18:1 <i>cis</i> -13	0,09	0,10	0,007	0,517
C18:1 <i>trans</i> -16	0,38	0,36	0,033	0,702
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -12	0,04	0,16	0,105	0,413
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	2,42	2,29	0,120	0,373
C20:0	0,18	0,20	0,011	0,044
C20:1 <i>cis</i> -11	0,04	0,06	0,007	0,015
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	0,18	0,22	0,017	0,126
CLA <i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11	0,98	0,83	0,070	0,064
CLA <i>trans</i> -10 <i>cis</i> -12	0,02	0,38	0,030	<0,001
C20:2 <i>cis</i> -11 <i>cis</i> -14	0,01	0,01	0,003	0,637
C22:0	0,04	0,05	0,003	0,040
C20:3 <i>cis</i> -8 <i>cis</i> -11 <i>cis</i> -14	0,02	0,02	0,003	0,779
C20:4 <i>cis</i> -5 <i>cis</i> -8 <i>cis</i> -11 <i>cis</i> -14	0,19	0,16	0,006	<0,001
C24:0	0,03	0,03	0,002	0,693
Não identificados	0,20	0,26	0,034	0,207

¹30 g/d de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa.

² 30 g/d de ésteres metílicos de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) não protegidos da bio-hidrogenação.

Quando agrupados de acordo com a origem (BAUMAN e GRIINARI, 2003), ácidos graxos sintetizados “*de novo*” pela glândula mamária (<C16), ácidos graxos captados da circulação (>C16) e ácidos graxos oriundos de ambas as fontes (C16 e C16:1) tiveram sua concentração na gordura do leite alterada em -14,2, +18,6 e -11,0%, respectivamente (Tabela 6).

Para determinação da secreção de AG totais, foi assumindo que a gordura do leite é composta por 98% de triacilglicerois (TAG), e que TAG contém 95% de AG (JENSEN, 2002). Assim, com relação à secreção diária, o CLA reduziu ($P<0,001$) a secreção de ácidos graxos totais no leite em 29,3% devido à diminuição na secreção dos ácidos graxos <C16 (37,9%), C16 e C16:1 (37,0%) e >C16 (17,1%).

A relação produto:substrato de cinco pares de ácidos graxos foi utilizada para calcular os índices de dessaturação de ácidos graxos e como uma medida indireta da atividade da enzima Estearoil CoA Dessaturase na glândula mamária (Tabela 6). Todos os índices foram reduzidos pelo CLA, resultando em uma redução média de 24,9% em relação ao grupo controle. Analisando os ácidos graxos de acordo com o grau de insaturação, o tratamento

CLA reduziu o percentual de ácidos graxos saturados e elevou o percentual de mono e de poliinsaturados (Tabela 6). Ainda, analisando a concentração (g/100g de AG) dos ácidos graxos poliinsaturados da série ômega-6 (ω -6) e ômega-3 (ω -3), o CLA reduziu ($P<0,01$) em 11,7% a relação ω -6/ ω -3 do leite (Controle: 14,7 vs. CLA: 13,6).

Tabela 6 - Concentração e índices de dessaturação dos ácidos graxos (AG) da gordura do leite de cabras Toggenburg suplementadas ácido linoleico conjugado (CLA).

	Tratamentos		EPM	<i>P</i>
	Controle ¹	CLA ²		
Grupos conforme a origem (g/100g)				
$\sum < C16$	31,36	26,92	0,929	<0,001
$\sum C16 \text{ e } C16:1$	28,25	25,15	0,634	<0,001
$\sum > C16$	40,19	47,67	1,363	<0,001
$\sum cis\text{-} C18:1$	20,26	18,73	1,233	0,186
$\sum trans\text{-} C18:1$	4,92	8,05	0,685	0,005
$\sum AG$ saturados	69,86	68,14	0,894	0,006
$\sum AG$ monoinsaturados	26,08	27,53	0,803	0,006
$\sum AG$ poliinsaturados	3,86	4,07	0,134	0,042
Relação ω -6/ ω -3 do leite	14,69	13,63	0,212	0,002
Dessaturases ³				
C14:1 <i>cis</i> -9/C14:0	0,012	0,007	0,001	<0,001
C16:1 <i>cis</i> -9/C16:0	0,020	0,019	0,001	0,037
C17:1 <i>cis</i> -9/C17:0	0,292	0,230	0,011	<0,001
C18:1 <i>cis</i> -9/C18:0	0,618	0,471	0,104	<0,001
CLA <i>c9t11/C18:1 t11</i>	0,322	0,233	0,026	<0,001

¹30 g/d de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa.

²30 g/d de ésteres metílicos de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) não protegidos da bio-hidrogenação.

³ Valores representam a relação produto/(substrato + produto) para a enzima Estearoil CoA Dessaturase (KELSEY, et al., 2003).

Com relação aos efeitos do CLA sobre os ácidos graxos *trans* C18:1, observou-se um aumento médio de 63,5% no teor destes ácidos graxos no leite (Tabela 6), embora a secreção diária destes ácidos graxos não tenha sido alterada ($P>0,05$). Examinando os isômeros dos ácidos graxos *trans* C18:1 individualmente, percebe-se que o CLA aumentou a concentração daqueles com dupla ligação *trans* entre os carbonos 4 e 14 (Tabela 5). Relativo ao ácido graxo *trans*-10 C18:1, a suplementação da dieta com CLA aumentou em 154 e 70% o teor e a secreção deste ácido graxo na gordura do leite, respectivamente.

Efeitos inversos foram observados entre os isômeros do ácido linoleico conjugado presentes no suplemento e secretados no leite. A suplementação com CLA não alterou a concentração ($P>0,05$), mas reduziu em 46,3% a secreção diária do isômero *cis*-9, *trans*-11

($P<0,001$). Por outro lado, aumentou 16 vezes (1567%) a concentração e 10 vezes (992%) a secreção diária do isômero *trans*-10, *cis*-12, quando comparado ao tratamento controle ($P<0,001$). Descontando do tratamento CLA o valor de CLA *trans*-10, *cis*-12 do leite no tratamento controle, a secreção de CLA *trans*-10, *cis*-12 correspondeu a 0,15 g/d para os animais suplementados com CLA. Este valor equivale a uma eficiência média de transferência estimada deste isômero da dieta para a gordura do leite (g ingerido/g secretado) de 1,72%. Ainda, subtraindo-se do tratamento CLA o valor de CLA *trans*-10, *cis*-12 observado no tratamento controle, a quantidade estimada de CLA *trans*-10, *cis*-12 presente no suplemento que escapou da bio-hidrogenação ruminal foi em média 7,3%. Este valor equivale a uma liberação diária estimada de 0,66g de CLA *trans*-10, *cis*-12 no abomaso dos animais suplementados com CLA.

6.3 BALANÇO ENERGÉTICO

O tratamento com CLA reduziu em 10,2% a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, reduzindo a concentração de energia no leite em 9,9% (Tabela 7).

Quando avaliado o peso dos animais durante todo o período experimental, ambos os tratamentos proporcionaram aumento do peso vivo. O ganho médio observado entre todos os animais foi de $34,7 \pm 12$ g de peso vivo/dia e o tratamento com CLA tendeu a aumentar ($P=0,06$) este parâmetro (Tabela 7). As concentrações plasmáticas de AGNE e de insulina não diferiram entre os tratamentos (Tabela 7). Por outro lado, a suplementação com CLA aumentou (54,89 vs. 58,13 mg/dL; $P<0,05$) a concentração plasmática de glicose (Tabela 7). O balanço energético, individual, diário em Mcal de energia metabolizável (EM) foi medido através da EM ingerida (Mcal/d) e a EM exigida para manutenção e produção de leite (Mcal/d). A energia para ganho não foi considerada tendo em vista que não houve diferença no ganho de peso diário. No início do período de suplementação (dia 0), os dois grupos experimentais estavam em condição de balanço energético negativo (Controle= -0,54 vs. CLA= -0,53 Mcal/d de EM, $P>0,05$). Ao final do período dos tratamentos (dia 14), as cabras que receberam CLA estavam em uma condição de balanço energético positivo, quando comparadas com as cabras que receberam o tratamento controle (Controle= -0,25 vs. CLA= 0,20 Mcal/d de EM, $P>0,001$).

Tabela 7 - Produção de leite corrigida, concentração de energia no leite, ganho de peso diário e concentração de metabólitos sanguíneos de cabras Toggenburg suplementadas com ácido linoleico conjugado (CLA).

Variável	Tratamentos		EPM	<i>P</i>
	Controle ¹	CLA ²		
PL 3,5% gordura (g/d) ³	2043,3	1834,7	0,266	<0,001
Energia no leite (Mcal/kg) ⁴	0,69	0,62	0,046	<0,001
Ganho médio diário (g/d)	20,83	48,61	12,18	0,060
AGNE (mmol/L) ⁵	0,293	0,288	0,039	0,858
Insulina	1,62	1,00	0,0319	0,109
Glicose (mg/dL)	54,89	58,13	1,154	0,013

¹30 g/d de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa.

²30 g/d de ésteres metílicos de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) não protegidos da bio-hidrogenação.

³Produção de leite corrigida para 3,5% de gordura (g) = produção de leite (g) x (313+11,2 x conteúdo de gordura (g/kg))/704 (SAUVANT, 1981).

⁴Concentração de energia no leite (Mcal/kg) = 0,0929 x %gordura + 0,0547 x %proteína bruta + 0,0395 x %lactose (NRC, 2001).

⁵Ácidos graxos não esterificados no plasma.

6.4 CORRELAÇÕES ENVOLVENDO O PESO METABÓLICO E A COMPOSIÇÃO DO LEITE

Os resultados que seguem descrevem respostas observadas somente com os animais submetidos ao tratamento CLA.

Os animais receberam diariamente 30 g de CLA cuja composição continha 29,9% de CLA *trans*-10, *cis*-12. Assim, cada animal recebeu 8,97 g/d de CLA *trans*-10, *cis*-12. Foi observado que o peso metabólico (PM) das cabras se situou na faixa entre 15,0 e 24,1 kg. Dividindo a dose (8,97 g/d) de CLA *trans*-10, *cis*-12 pelo peso metabólico, percebe-se a existência de uma faixa de variação na ingestão diária do suplemento (g/kg de PM). Os limites desta amplitude foram 0,373 e 0,598 g de CLA *trans*-10, *cis*-12 por kg de PM para o maior e o menor peso metabólico, respectivamente.

A concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 na gordura do leite (g/100g de AG) foi inversamente proporcional ao peso metabólico do animal ($r = -0,84$; $P < 0,001$). Por outro lado, a depressão no conteúdo de gordura (%) do leite esteve positivamente correlacionada tanto com a ingestão de CLA *trans*-10, *cis*-12 ($r = 0,77$; $P < 0,001$), como com a concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 na gordura do leite ($r = 0,69$; $P < 0,005$).

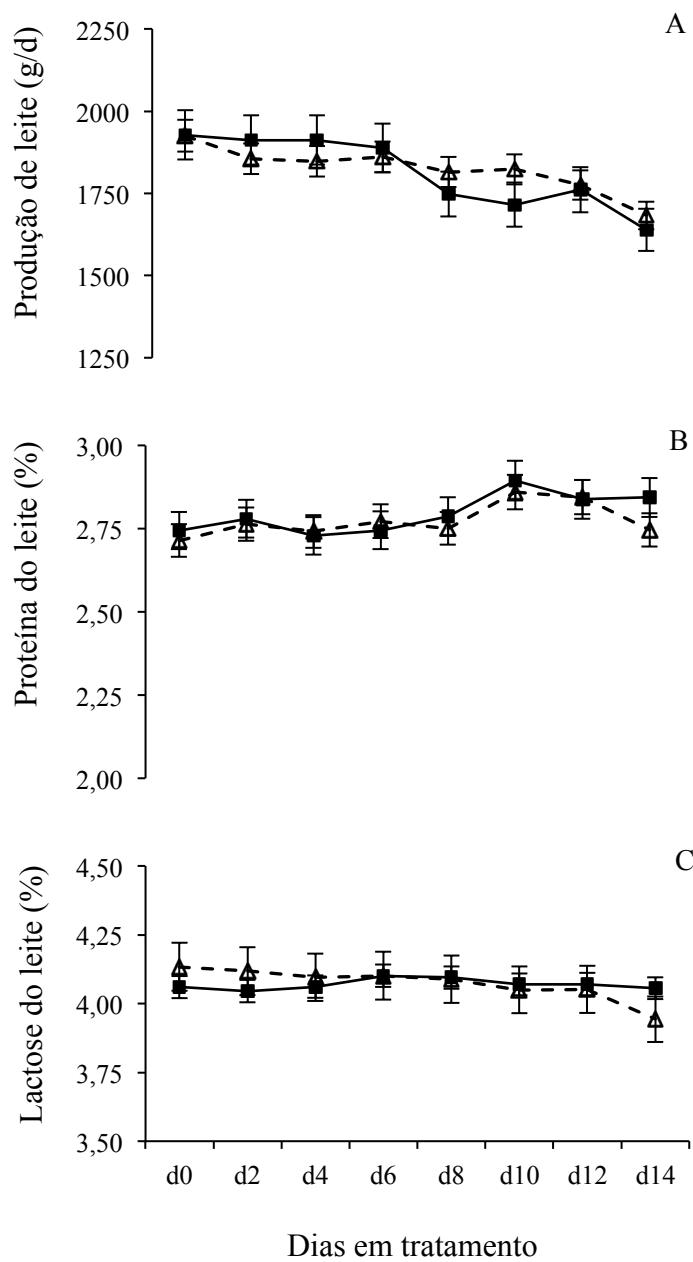
7 DISCUSSÃO

A infusão pós-ruminal de isômeros purificados identificou o CLA *trans*-10, *cis*-12 como um efetivo inibidor da lipogênese na glândula mamária de vacas (BAUMGARD et al., 2000). Estudos posteriores descreveram os mecanismos pelos quais este ácido graxo reduz a síntese de gordura e relações dose-resposta foram estabelecidas (BAUMGARD et al., 2002, de VETH et al., 2004, respectivamente). Mais tarde, a redução da gordura do leite causada pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 foi também observada quando ovelhas (Lock et al., 2006; Sinclair et al., 2007; 2010) e cabras lactantes (LOCK et al., 2008; SHINGFIELD et al., 2009) receberam suplementos lipídicos protegidos da bio-hidrogenação contendo o CLA *trans*-10, *cis*-12.

O presente estudo estende estas observações para a utilização de um suplemento lipídico contendo ésteres metílicos de CLA *trans*-10, *cis*-12 não protegido da bio-hidrogenação ruminal, fornecido como um ingrediente de uma TMR de cabras em lactação. Frente à ausência de resultados sobre a extensão com que suplementos de CLA não protegidos são bio-hidrogenados no rúmen, os dados revisados por Jenkins et al. (2008) foram utilizados para assumir uma bio-hidrogenação próxima a 95% do suplemento CLA. A suplementação com 8,97 g/d de CLA *trans*-10, *cis*-12 é comparável com trabalhos análogos previamente realizados com cabras leiteiras (6 g/d LOCK et al., 2008 e 7,47 g/d SHINGFIELD et al., 2009).

Neste estudo, nem a produção de leite nem o conteúdo e a secreção de proteína e lactose do leite foram alterados pela suplementação com CLA (Figura 1 e Tabela 4). Conforme revisado por Bauman et al. (2008), de um modo geral, os ensaios têm descrito que os efeitos do CLA *trans*-10, *cis*-12 são específicos para a gordura do leite, enquanto a produção e os outros componentes do leite são normalmente pouco ou nada afetados. Por outro lado, a suplementação com CLA diminuiu 19,9 e 17,9% o conteúdo e a secreção de gordura do leite, respectivamente (Tabela 4). Estes valores são comparáveis à redução de 20 a 25% utilizada como base para o cálculo da dose de CLA e com os valores médios de 17,5 a

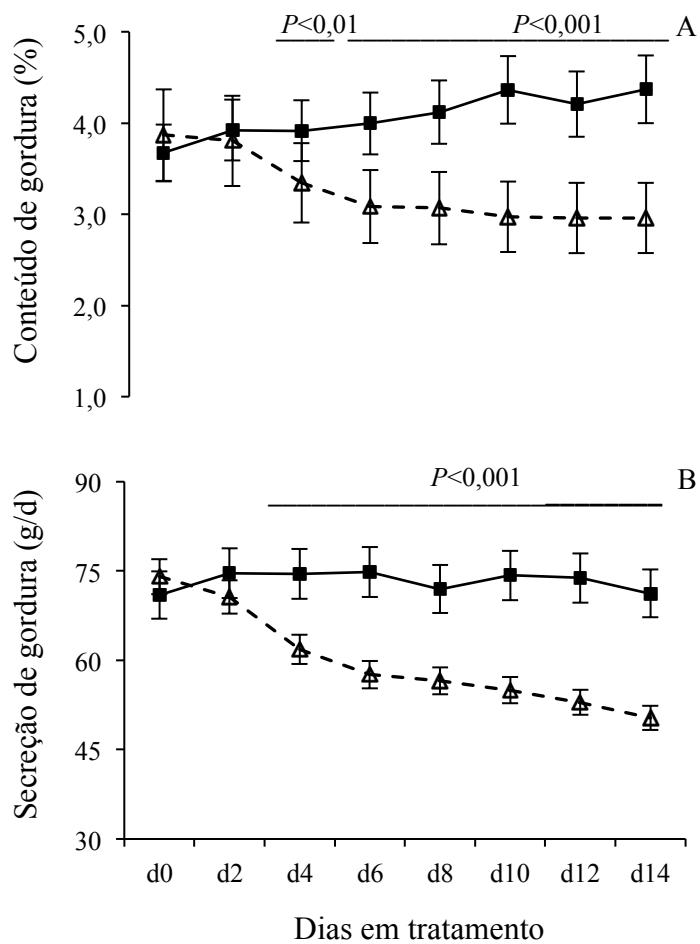
Figura 1 - Variação temporal da produção de leite (A) e dos teores de proteína (B) e lactose (C) do leite de cabras Toggenburg recebendo um suplemento lipídico controle (■; n = 18) ou ácido linoleico conjugado (CLA Δ; n = 18). O erro padrão é indicado pelas barras em cada ponto.



21% obtidos em experimentos que forneceram a mesma dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 (LOCK et al., 2008 e SHINGFIELD et al., 2009). A redução na síntese de gordura do leite foi observada a partir do quarto dia de suplementação com CLA (Figura 2). Este fato condiz inclusive com resultados descritos em vacas (Harvatine et al., 2008) e ovelhas (LOCK et al., 2006), demonstrando que os efeitos ocorrem sobre atividade enzimática na glândula mamária

e independem da espécie. As duas enzimas lipogênicas chaves envolvidas no mecanismo coordenado de redução na gordura do leite promovida pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 são a Acetil Coenzima A Carboxilase e a Ácido Graxo Sintase, as quais possuem uma meia-vida de 48 às 72h (CRAIG et al., 1972; VOLPE e VAGELOS, 1973), fato que provavelmente explica o início da redução na gordura do leite a partir do quarto dia de suplementação.

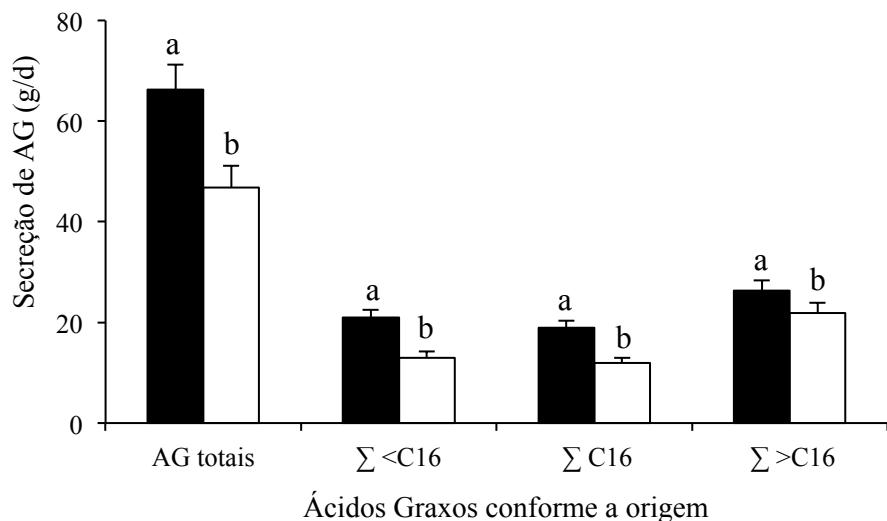
Figura 2 - Variação temporal do teor (A) e da secreção (B) de gordura do leite de cabras Toggenburg recebendo um suplemento lipídico controle (■; n = 18) ou ácido linoleico conjugado (CLA Δ; n = 18). O erro padrão é indicado pelas barras em cada ponto.



A suplementação com CLA alterou o perfil de ácidos graxos da gordura do leite (Tabela 5). As alterações incluíram uma redução na proporção dos ácidos graxos de cadeia curta e média (C4 a C16) e um aumento nos ácidos graxos de longa (>C16). Referente à secreção de ácidos graxos, a suplementação com CLA reduziu a secreção tanto de ácidos

graxos sintetizados “*de novo*” como os captados da circulação (Figura 3). Este fato evidencia que o aumento na participação dos ácidos graxos de cadeia longa não foi suficiente para compensar os efeitos inibitórios do CLA sobre a síntese de gordura, diferente do observado por Shingfield et al. (2009), quando o CLA substituiu sais de cálcio de ácidos graxos de óleo de palma. Conforme revisado por Bauman et al. (2008), o CLA *trans*-10, *cis*-12 diminui a expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na síntese “*de novo*”, absorção e transporte de ácidos graxos e síntese de triglicerídeos. Porém, a síntese “*de novo*” de ácidos graxos parece ser a via mais afetada pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 (GRIINARI e BAUMAN, 2006). Consistente com isto, no presente estudo, a redução na secreção de AG menores ou iguais a C16 correspondeu a aproximadamente 75% da redução na secreção total de ácidos graxos (Figura 3), demonstrando uma menor inibição da absorção e incorporação de ácidos graxos pré-formados em relação aos ácidos graxos sintetizados “*de novo*”.

Figura 3 - Secreção de ácidos graxos (AG) no leite de cabras Toggenburg recebendo um suplemento lipídico controle (■) ou ácido linoleico conjugado (CLA □). Os AG estão categorizados de acordo com a origem: <C16 representam AG sintetizados “*de novo*”; >C16 representam AG pré-formados captados da circulação sanguínea; C16 e C16:1 representam AG derivados de ambas as fontes. O erro padrão é indicado pelas barras acima de cada coluna. Dentro de cada categoria, efeitos de tratamento com diferenças significativas são indicados pelas letras acima das colunas ($P<0,001$ para todas).



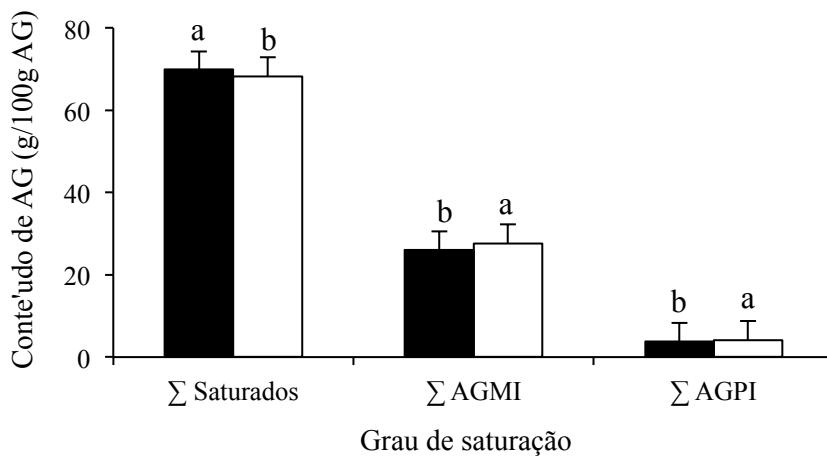
A enzima Estearoil CoA Dessaturase catalisa a conversão de ácidos graxos saturados (C10:0 a C18:0) em ácidos graxos monoinsaturados homólogos (CORL et al., 2001). Os índices de dessaturação de ácidos graxos são normalmente utilizados como indicadores

indiretos da atividade dessa enzima (KESLEY et al., 2003), por apresentarem alta correlação com a abundância do mRNA e com a atividade enzimática, fato estabelecido inclusive *in vivo* em caprinos (BERNARD et al., 2008; BERNARD et al., 2005). Estudos prévios demonstraram que o CLA *trans*-10, *cis*-12 reduz a abundância do mRNA para a enzima Estearoil CoA Dessaturase no tecido mamário de bovinos (BAUMGARD et al., 2002; HARVATINE e BAUMAN, 2006). Consistente com isso, neste estudo, a suplementação com CLA reduziu os índices de dessaturação de ácidos graxos (Tabela 6), sugerindo que a atividade da Estearoil CoA Dessaturase foi reduzida em decorrência do tratamento utilizado. Estudos com vacas têm demonstrado que os isômeros *trans*-10, *trans*-12 e *trans*-9, *trans*-11 do CLA também reduzem o índice de dessaturação de ácidos graxos do leite (PERFIELD et al., 2006; 2007). Entretanto, neste estudo, nenhum desses dois isômeros de CLA foram detectados na gordura do leite, sugerindo que a redução na atividade da enzima Estearoil CoA Dessaturase foi promovida pelo CLA *trans*-10, *cis*-12. Observações equivalentes foram obtidas em trabalhos prévios com o fornecimento de CLA *trans*-10, *cis*-12 para cabras lactantes (ANDRADE e SCHMIDELY, 2006; LOCK et al., 2008; SHINGFIELD et al., 2009). Coletivamente, os resultados obtidos em cabras sugerem uma alta sensibilidade da enzima Estearoil CoA Dessaturase a regulação pós-transcricional promovida pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 (BERNARD et al., 2009a).

A inclusão de CLA na dieta aumentou o teor de ácidos graxos mono e poliinsaturados (Figura 4). Quando incluídos de forma não protegida na dieta, os ácidos graxos poliinsaturados são extensivamente (>90%) bio-hidrogenados no rúmen (JENKINS et al., 2008). O escape ruminal de ácidos graxos parcialmente bio-hidrogenados pode explicar o aumento do teor de ácidos graxos monoinsaturados do leite, observado após a suplementação com uma fonte de CLA não protegida da bio-hidrogenação ruminal.

Coincidemente, o teor de ácidos graxos saturados no leite foi reduzido pela suplementação com CLA. Este fato pode estar relacionado com (1) a redução na síntese “*de novo*” promovida pelo CLA, já que grande parte dos ácidos graxos saturados do leite é sintetizada por esta via; (2) o aumento no teor de ácidos graxos mono e poliinsaturados causou uma redução proporcional no teor de ácidos graxos saturados. Reduzir o conteúdo de ácidos graxos saturados e aumentar do conteúdo de ácidos graxos da série ω-3 em produtos de ruminantes têm sido o objetivo pesquisas recentes (JENKINS et al., 2008). Fato relevante, neste estudo, a suplementação com CLA reduziu o teor de ácido araquidônico (C20:4) e, em decorrência disso, a relação ω-6/ω-3 do leite foi reduzida, ficando mais próxima da relação 5:1 preconizada nas dietas para humanos (RIBEIRO et al., 2011).

Figura 4 - Concentração dos ácidos graxos (AG) saturados, monoinsaturados (AGMI) e poliinsaturados (AGPI) na gordura do leite de cabras Toggenburg recebendo um suplemento lipídico controle (■) ou ácido linoleico conjugado (CLA □). O erro padrão é indicado pelas barras acima de cada coluna. Dentro de cada categoria, efeitos de tratamento com diferenças significativas são indicados pelas letras acima das colunas ($P<0,05$ para todas).



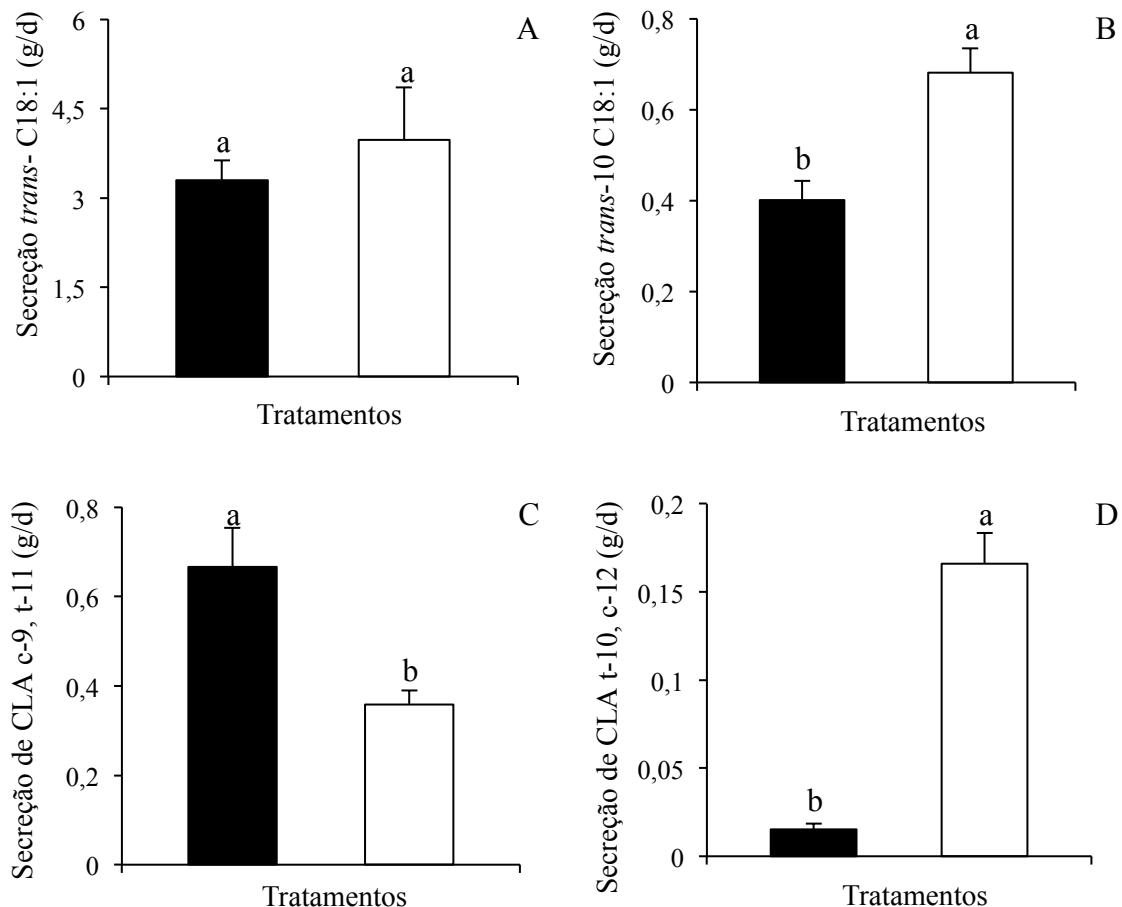
No presente estudo a suplementação com CLA aumentou o teor do ácido graxo pentadecanoico (C15:0, C15:0 *iso* e C15:0 *anteiso*), um ácido graxo de cadeia ímpar e ramificada onde os termos *iso* e *anteiso* designam a posição da ramificação na molécula do ácido graxo. Estudos têm demonstrado que alguns ácidos graxos de cadeia ramificada possuem propriedades anti-carcinogênicas e, a incubação com ácido 13-metiltetradecanoico (15:0 *iso*) induziu a morte celular por apoptose em linhagens de carcinomas do cólon, do estômago, do fígado, pulmão, próstata e adenocarcinoma mamário e pancreático in vitro (YANG et al., 2000). Estudos posteriores mostraram que ambos os isômeros (*iso* e *anteiso*) de alguns ácidos graxos de cadeia ramificada foram efetivos em inibir a síntese de ácidos graxos em células de câncer de mama humano in vitro (WONGTANGTINTHARN et al., 2004). Os ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada da gordura do leite são em grande parte derivados do escape de bactérias ruminais e em menor parte, podem ser sintetizados “*de novo*” na glândula mamária (VLAEMINCK et al., 2006). É conhecido que o CLA *trans*-10, *cis*-12 reduz a síntese “*de novo*” de ácidos graxos (BAUMGARD et al., 2000), e que ácidos graxos de cadeia poliinsaturados alteram o perfil bacteriano ruminal (MAIA et al., 2010). Esses fatos sugerem que o aumento no teor do ácido pentadecanoico pode estar mais relacionado com o escape de bactérias ruminais, do que com a síntese na glândula mamária.

A inclusão de CLA na dieta também foi associada a uma redução na concentração dos ácidos graxos *cis*- C18:1. Este resultado difere do observado quando cabras receberam diferentes óleos vegetais (BERNARD et al., 2009b), e de outros estudos indicando que suplementos lipídicos contendo ácidos graxos C18:2 n-6 ou 18:3 n-3 aumentam o teor de ácidos graxos *cis*- C18:1 no leite de vacas e cabras (CHILLIARD et al., 2007; SHINGFIELD et al., 2008). O isômero *cis*-9 representou mais de 85% do total dos ácidos graxos *cis* C18:1 identificados no leite, assim, a inibição da dessaturação do ácido C18:0 à C18:1 *cis*-9 promovida pelo CLA *trans*-10, *cis*-12, possivelmente explica a redução na concentração dos ácidos graxos *cis* C18:1.

Os ácidos graxos *trans* C18:1 são produzidos pelos microrganismos ruminais como intermediários da bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados (GRIINARI et al., 1999). Consistente com isto, a bio-hidrogenação parcial do CLA no rúmen pode ter aumentado a disponibilidade de ácidos graxos *trans* C18:1 no duodeno, aumentando assim a captação e incorporação e secreção desses ácidos graxos na gordura do leite (Figura 5A). Aumentos expressivos ocorreram nos isômeros *trans*-11 e *trans*-10 C18:1 (Figura 6), de modo que estes dois ácidos graxos corresponderam a aproximadamente 60,5% de todos isômeros *trans*-C18:1 do leite quando as cabras receberam CLA. O ácido vacênico (*trans*-11 C18:1) é o principal isômero *trans* C18:1 (35 a 40%) encontrado no leite de cabras (CHILIARD et al., 2003). Além disso, é o precursor para síntese endógena do isômero *cis*-9, *trans*-11 do CLA através da ação da enzima Estearoil CoA Dessaturase, podendo contribuir com mais de 75% do CLA *cis*-9, *trans*-11 secretado na gordura do leite (CORL et al., 2001).

A concentração de *trans*-10 C18:1 foi aumentada em resposta a suplementação com CLA, de modo que a secreção deste isômero no leite aumentou (Figura 5B), mesmo frente à redução na síntese de gordura (17,9%) promovida pelo CLA. O aumento do teor de *trans*-10 C18:1 pode estar relacionado com: (1) uma isomerização que converte o ácido oleico (C18:1 *cis*-9) em *trans*-10 C18:1, realizada por bactérias que se desenvolvem em condições alteradas de ambiente ruminal (JENKINS et al., 2008) ou (2) uma bio-hidrogenação parcial do isômero CLA *trans*-10, *cis*-12 contido no suplemento. O teor de *trans*-10 C18:1 na gordura do leite esteve positivamente correlacionado à concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 (0,73; $P<0,001$). Resultados semelhantes foram obtidos com a suplementação de óleos vegetais na dieta de cabras leiteiras (BERNARD et al., 2009b), sugerindo que ambos ácidos graxos podem ser formados como intermediários da bio-hidrogenação durante o metabolismo do ácido linoleico (C18:2) no rúmen. Em vacas, a depressão da gordura do leite foi claramente associada com o aumento na concentração de *trans*-10 C18:1 no leite (GRIINARI et al., 1998). No presente

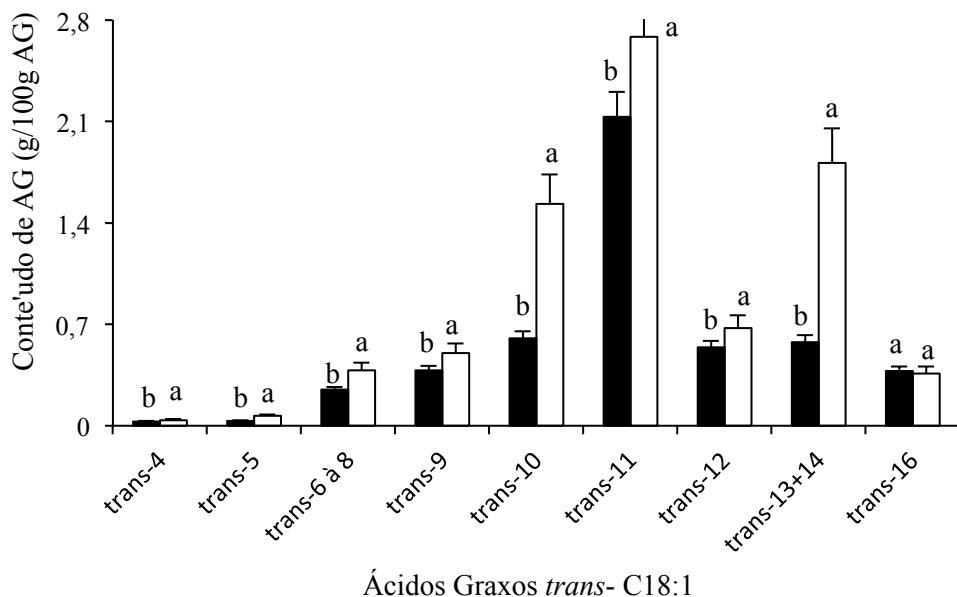
Figura 5 - Secreção de ácidos graxos *trans*- C18:1 (A), *trans*-10 C18:1(B), ácido linoleico conjugado (CLA) *cis*-9, *trans*-11 (C) e CLA *trans*-10, *cis*-12 (D) no leite de cabras Toggenburg recebendo um suplemento lipídico controle (■) ou ácido linoleico conjugado (CLA □). O erro padrão é indicado pelas barras acima de cada coluna. Efeitos de tratamento com diferenças significativas são indicados pelas letras acima das colunas (Figura A, $P>0,05$; Figura B, C e D, $P<0,001$).



estudo, entretanto, nenhuma associação pode ser identificada entre a concentração de *trans*-10 C18:1 no leite e a depressão da gordura do leite. De um modo geral, o aumento de *trans*-10 C18:1 não têm sido associado com a redução na síntese de gordura em cabras, contrariando o observado em vacas (CHILLIARD et al., 2003).

O suplemento CLA utilizado continha a mesma proporção dos isômeros *trans*-10, *cis*-12 e *cis*-9, *trans*-11. No entanto, o fornecimento de CLA não alterou o conteúdo de CLA *cis*-9, *trans*-11 no leite (Tabela 4). Este resultado pode estar relacionado com três acontecimentos. O primeiro deles envolveria uma bio-hidrogenação de parte do suplemento controle, visto que a formação de sais de cálcio não garante completa proteção contra a bio-hidrogenação no

Figura 6 - Concentração dos isômeros dos ácidos graxos (AG) *trans*-C18:1 na gordura do leite de cabras Toggenburg recebendo um suplemento lipídico controle (■) ou ácido linoleico conjugado (CLA □). O erro padrão é indicado pelas barras acima de cada coluna. Dentro de cada categoria, efeitos de tratamento com diferenças significativas são indicados pelas letras acima das colunas (valor de *P* descrito na Tabela 4).



rúmen (JENKINS et al., 2007), permitindo o metabolismo de alguns AGPI contidos no lipídeo controle e liberação de intermediários como C18:1 *trans*-11 (precursor da síntese de CLA na glândula mamária) e o próprio CLA *cis*-9, *trans*-11, aumentando assim o conteúdo de CLA *cis*-9, *trans*-11 no tratamento controle. O segundo teria relação com a inibição da enzima Estearoil CoA Dessaturase promovida pelo CLA *trans*-10, *cis*-12, considerado o aumento/disponibilidade do substrato vacênico no tratamento CLA. Por fim, um extenso metabolismo ruminal do isômero *cis*-9, *trans*-11 do CLA, previamente reportado após a suplementação com CLA não protegido da bio-hidrogenação (HUANG et al., 2009). O aumento no teor de ácidos graxos intermediários (C18:1 *trans*-11) e produto final (C18:0) provenientes da bio-hidrogenação do CLA *cis*-9, *trans*-11 (JENKINS et al., 2008), suportam esta possibilidade. Com relação à produção diária, o tratamento CLA reduziu a secreção de CLA *cis*-9, *trans*-11 na gordura do leite (Figura 5C), notoriamente pela redução na gordura do leite observada neste tratamento.

A suplementação com CLA aumentou a concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 na gordura do leite (Tabela 4). A média de 0,38 g/100g de ácidos graxos observada neste estudo é consistente com os valores previamente descritos (0,19 a 0,26 g/100g de ácidos graxos) em trabalhos que suplementaram doses similares de CLA *trans*-10, *cis*-12 para cabras leiteiras

(LOCK et al., 2008; SHINGFIELD et al., 2009). Em decorrência do amplo aumento na concentração, a secreção de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite também aumentou (Figura 5D), mesmo frente à redução de 17,9% na secreção de gordura do leite promovida pelo CLA. A infusão pós-ruminal de fontes purificadas de CLA têm demonstrado que os isômeros CLA *trans*-9, *cis*-11 (PERFIELD et al., 2007) e CLA *cis*-10, *trans*-12 (SÆBØ et al., 2005) também exercem efeitos anti-lipogênicos em bovinos. Entretanto, no presente estudo, ambos os isômeros do CLA não foram identificado na gordura do leite. A administração duodenal de isômeros *trans* C18:1 (*trans*-9 a *trans*-12) e *cis* C18:1 (*cis*-11 e *cis*-12) tem demonstrado não afetar a síntese de gordura do leite em vacas (SHINGFIELD e GRIINARI, 2007). Conjuntamente, estes resultados reforçam que a redução na gordura do leite observada neste estudo, não exclusivamente, mas em sua maior parte, foi causada pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 contido no suplemento.

A expressão de enzimas lipogênicas é coordenada simultaneamente por uma classe de fatores de transcrição conhecidos como reguladores principais de síntese lipídica, e um destes é a família “Sterol Response Element Binding Protein 1” – SREBP-1 (BAUMAN et al., 2008). Em estudo conduzido por Harvatine e Bauman (2006), a expressão do SREBP-1 e de proteínas associadas com a ativação do SREBP-1 foi reduzida em resposta a infusão intravenosa com CLA *trans*-10, *cis*-12. Além disso, a inibição do Spot-14, que é um gene responsável ao SREBP-1 que codifica uma proteína nuclear fortemente associada com a regulação da síntese de ácidos graxos em tecidos lipogênicos, incluindo a glândula mamária, diminuiu a síntese de novo de ácidos graxos, reduzindo a concentração de gordura do leite de vacas infundidas com CLA *trans*-10, *cis*-12 (BAUMAN et al., 2008). De um modo geral, o mecanismo pelo qual o CLA *trans*-10, *cis*-12 reduz a lipogênese na glândula mamária envolveria um efeito direto sobre a abundância do mRNA de enzimas envolvidas com síntese “*de novo*”, absorção e transporte de ácidos graxos e síntese de triglicerídeos (BAUMGARD et al., 2002). O presente estudo não avaliou diretamente estes mecanismos de regulação, entretanto evidências como a redução da síntese e captação de ácidos graxos e a diminuição dos índices de dessaturação, sugerem que os processos de regulação em caprinos são semelhantes aos previamente descritos com vacas.

A eficiência com que uma fonte de CLA não protegida da bio-hidrogenação ruminal inibe a síntese de gordura do leite pode diferir da observada quando fontes protegidas são fornecidas. Considerando que a biodisponibilidade do CLA no intestino delgado e a captação do CLA pela glândula mamária são similares, ou seja, independem do tipo de CLA fornecido (ex. não protegido, sais de cálcio ou infusão abomasal), a diferença na eficiência poderia estar

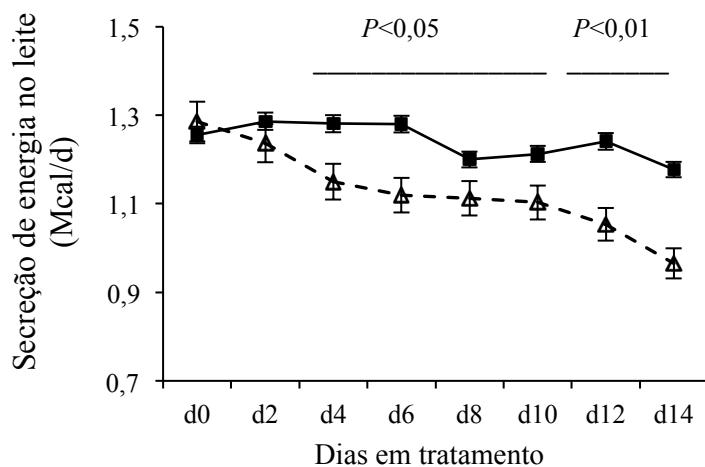
relacionada a passagem pelo rúmen. Isto incluiria um maior metabolismo ruminal do suplemento CLA não protegido, com uma intensa bio-hidrogenação, reduzindo o fluxo intestinal de CLA *trans*-10, *cis*-12, bem como o suprimento para a glândula mamária. Utilizando a equação desenvolvida por de Veth et al. (2004), que correlacionou a dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 infundida no abomaso e a quantidade de CLA *trans*-10, *cis*-12 secretada no leite, foi estimado que 7,3% do CLA *trans*-10, *cis*-12 contido no suplemento escapou da bio-hidrogenação ruminal. Isto equivale à liberação de 0,66g de CLA *trans*-10, *cis*-12 no abomaso diariamente, sendo este valor 60% maior que o previsto pelos cálculos realizados para a escolha da dose de CLA. Assim, apesar do extenso metabolismo no rúmen, a eficiência de transferência do CLA *trans*-10, *cis*-12 do suplemento lipídico para a gordura do leite foi de 1,72%. Este valor é comparável ao observado quando doses similares de CLA *trans*-10, *cis*-12 (g/kg de peso metabólico) foram incluídas na dieta na forma de lipídio encapsulado ou sais de cálcio (1,89 e 2,22%; LOCK et al., 2008 e SHINGFIELD et al., 2009, respectivamente).

O teor de CLA *trans*-10, *cis*-12 (g/100g de ácidos graxos) do leite tem sido utilizado como indicador da magnitude na redução da síntese de gordura do leite de vacas (de VETH et al., 2004; GIESY et al., 2002) e cabras (SHINGFIELD et al., 2009). Na tentativa de comparar os valores com os descritos em outros experimentos com cabras leiteiras, as equações desenvolvidas por Shingfield et al. (2009) foram utilizadas para predizer a redução na secreção ($y = 2,0 - 80,15x$; $r^2 = 0,95$) e no teor ($y = -38,23 + 41,89^{exp-4,3556x}$; $r^2 = 0,99$) da gordura do leite, em relação ao teor de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite. Com um intervalo de previsão de 95%, o teor médio de CLA *trans*-10, *cis*-12 observado (0,38 g/100g de ácidos graxos) corresponderia a uma redução de 21 a 32% na secreção e de 24 a 31% no teor de gordura do leite. A redução observada foi 17,9 e 19,9% para secreção e conteúdo de gordura, respectivamente, sugerindo equivalente redução da gordura do leite induzida pela dieta entre suplementos de CLA na forma de ésteres metílicos ou formas protegidas da bio-hidrogenação ruminal, enquanto a pequena diferença entre os estudos pode estar relacionada a efeitos de raça, produção de leite ou estágio da lactação.

A gordura é o componente mais energético do leite, assim a redução na síntese de gordura diminui a energia exigida para lactação (HARVATINE et al., 2009). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a redução na gordura do leite, foi suficiente para diminuir a exigência em energia líquida de lactação. Utilizando o modelo proposto pelo NRC (2001), a redução de 17,9% no teor de gordura do leite promovida pela suplementação com CLA causou uma redução de 9,9% na concentração de energia (Mcal/kg) no leite (Tabela 7). Por consequência, houve uma redução crescente na secreção diária de energia no leite (Mcal/d) a

partir do quarto dia de suplementação com CLA (Figura 7), o que coincidiu com o início da redução no teor de gordura do leite (Figura 2). A suplementação da dieta com CLA também reduziu em 10,2% a produção de leite corrigida para 3,5% de gordura, fato que corrobora a redução na energia exigida para lactação. O uso da produção de leite corrigida para gordura padroniza a produção de leite em uma base de produção de energia e possibilita a comparação mais precisa entre leites que diferem em produção e/ou percentual de gordura (SAUVANT et al., 1981).

Figura 7 - Variação temporal da secreção diária de energia no leite de cabras Toggenburg recebendo um suplemento lipídico controle (■; n = 18) ou ácido linoleico conjugado (CLA Δ; n = 18). O erro padrão é indicado pelas barras em cada ponto.

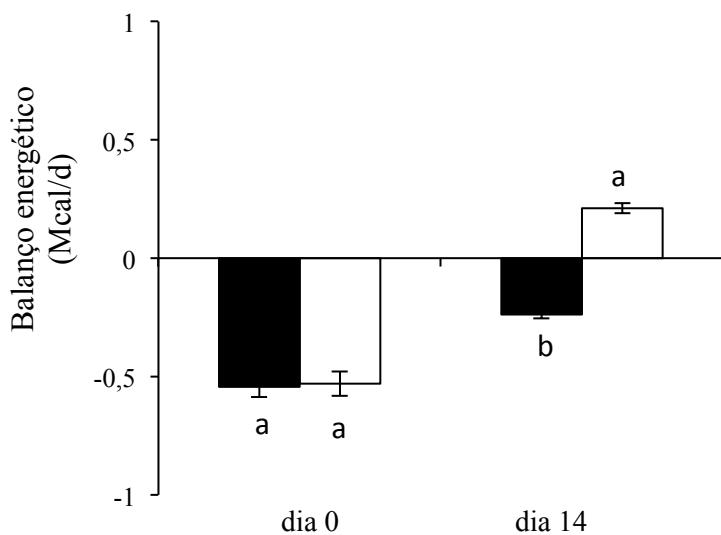


O perfil de ácidos graxos do leite pode ser utilizado para predizer o status nutricional de fêmeas em lactação. Conhecido que o tecido adiposo de ruminantes é rico em ácido palmítico, esteárico e oleico, a variação no teor de C18:0 + C18:1 *cis*-9 no leite está fortemente associado a mobilização de reservas corporais (CHILLIARD et al., 2003). No presente estudo, entretanto, o fornecimento de um suplemento contendo ácido oleico (27,4%) e a eluição conjunta dos isômeros *cis*-9 e *trans*-15 do ácido C18:1 durante a cromatografia gasosa, impossibilitaram a determinação do status nutricional a partir do perfil de ácidos graxos do leite.

No entanto, o status nutricional de animais lactantes pode ainda ser estimado pelo seu balanço energético, o qual contabiliza a diferença entre a energia ingerida e a energia exigida para manutenção e para produção de leite (CHILLIARD et al., 2003; ODENS et al., 2007). No presente estudo, a inclusão de CLA na dieta melhorou (+0,45 Mcal/d) o balanço

energético dos animais em relação ao tratamento controle (Figura 8). Dado que as cabras estavam produzindo volumes similares de leite e consumindo quantidades equivalentes de nutrientes durante o experimento, a melhora no balanço energético pode ser atribuída diretamente à redução da gordura do leite. Em outras palavras, a energia “economizada” com a redução na gordura do leite pode ter sido utilizada para outras funções no organismo. O presente estudo não examinou esta possibilidade diretamente, mas evidências indiretas, como aumento na expressão do mRNA de enzimas lipogênicas no tecido adiposo quando o CLA induziu a redução da gordura do leite em vacas (HARVATINE et al., 2009), suportam esta hipótese. Em vacas de leite, uma redução de 10% na síntese de gordura do leite reduz em mais de 6% a exigência de energia para lactação (NRC, 2001). Fazendo uma comparação direta com o presente estudo, a redução de 17,9% na síntese de gordura do leite foi acompanhada por uma redução de 22,6% na exigência de energia de lactação.

Figura 8 - Balanço energético de cabras Toggenburg recebendo um suplemento lipídico controle (■; n = 18) ou ácido linoleico conjugado (CLA Δ; n = 18). O erro padrão é indicado pelas barras acima e abaixo de cada coluna. Efeitos de tratamento com diferenças são indicados pelas letras acima das colunas (dia 0, $P>0,05$; dia 14, $P<0,005$).



Durante períodos em que a energia ingerida é adequada, a redução na gordura do leite causada pelo CLA coincide com mudanças pouco expressivas na ingestão de matéria seca (redução) e nas reservas corporais (aumento), dificultando a percepção da significância estatística destas diferenças (BAUMAN et al., 2008). Em algumas situações, no entanto, a redução na gordura do leite tem resultado em modificações na partição de nutrientes

suportando aumentos na produção de leite e proteína do leite em vacas (BERNAL-SANTOS et al., 2003; SHINGFIELD et al., 2004) e ovinos (LOCK et al., 2006; SINCLAIR et al., 2010). Estes efeitos têm sido observados no início da lactação ou em situações onde a ingestão de nutrientes não é suficiente para atender as exigências, o que é comparável ao balanço energético negativo notado ao início do período de suplementação do presente estudo. A suplementação com CLA tendeu ($P=0,06$) a aumentar o ganho médio diário, fato que se traduziu em uma tendência ($P=0,08$) de aumento no peso vivo. Este fato sugere que a energia “economizada” com a redução na síntese de gordura do leite foi realocada no organismo. Shingfield et al. (2004) quantificaram o balanço energético de vacas para avaliar a partição da energia “economizada” com a redução na síntese de gordura do leite. Os autores observaram que a suplementação com CLA reduziu em 35% a secreção de gordura do leite, reduzindo a energia exigida para síntese do leite. No entanto, a energia perdida por calor, metano e excretas não diferiu entre o grupo controle e os animais suplementados com CLA, demonstrando que a energia “economizada” ficou retida nos tecidos corporais.

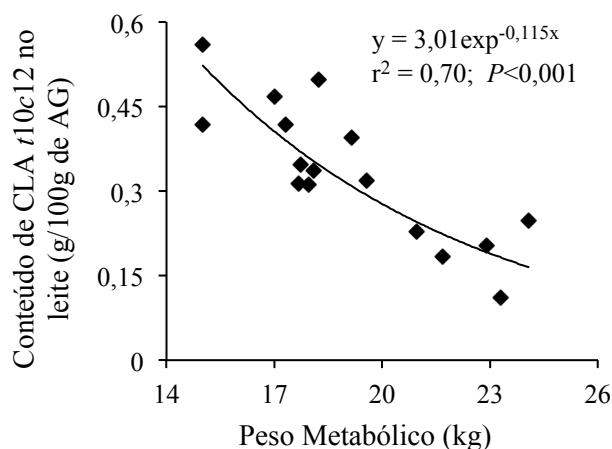
A redução na gordura do leite pode diminuir a captação de AGNE na glândula mamária, o que atenuaria a lipólise no tecido adiposo reduzindo os níveis plasmáticos de AGNE (GRIINARI e BAUMAN, 2006). Entretanto, a concentração plasmática de AGNE não foi alterada após a suplementação com CLA, apesar da redução observada na gordura do leite. Resultados semelhantes têm sido observados com o fornecimento de CLA para vacas em fase inicial de lactação (BERNAL-SANTOS et al., 2003; CASTAÑEDA-GUTIÉRREZ et al., 2005; SHINGFIELD et al., 2004). A diminuição do uso de precursores lipogênicos na glândula mamária durante a inibição da síntese de gordura causada pelo CLA, pode não reduzir os sinais lipolíticos no tecido adiposo, ao invés, pode aumentar a captação e oxidação de AGNE em outros tecidos, explicando a manutenção de níveis constantes no plasma (GRIINARI e BAUMAN, 2006).

No corrente estudo, a inclusão de CLA na dieta aumentou levemente (5,6%) a concentração de glicose circulante. Este acontecimento pode estar relacionado com os efeitos do CLA *trans*-10, *cis*-12 sobre a sensibilidade à insulina, hormônio central na regulação da homeostase plasmática da glicose. Brown et al. (2003) demonstraram que culturas de pré-adipócitos humanos tratadas com concentrações entre 3 e 30 μmol de CLA *trans*-10, *cis*-12, tiveram uma redução dose-dependente nos estímulos da insulina para a absorção, oxidação e incorporação da glicose dentro de lipídios celulares. Ainda, Poirier et al. (2006) evidenciaram que a suplementação com CLA *trans*-10, *cis*-12 contribuiu para o desenvolvimento da resposta inflamatória e resistência a insulina no tecido adiposo de camundongos. Conforme

revisado por Brown e McIntosh (2003), o CLA *trans*-10, *cis*-12 reduz a expressão do transportador de glicose insulino-sensível (GLUT4), o que induz a um estado de resistência a insulina, reduzindo assim a captação de glicose pelos adipócitos. Deste modo, o aumento da concentração plasmática de glicose não refletiria uma condição de sobra energética, mas sim um mecanismo parcial com que o CLA *trans*-10, *cis*-12 promove a partição de nutrientes em tecidos extra-mamário (ODENS et al., 2007).

Até o conhecimento do autor, este estudo identificou, de forma inédita, uma relação de dependência entre a quantidade de CLA *trans*-10, *cis*-12 ingerida por kg de peso metabólico e a participação deste isômero na gordura do leite. O conceito de peso metabólico foi inicialmente desenvolvido para comparação de taxas metabólicas entre espécies, subsequentemente, ele foi usado para cálculos de dosagem de drogas entre diferentes espécies e comparações de variáveis de desempenho animal (BLAXTER e SÆBØ, 1989). Diante disso, trabalhos preliminares (LOCK et al., 2006; 2008) utilizaram o peso metabólico para extrapolar de estudos realizados com vacas, a dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 a ser fornecida para pequenos ruminantes. Ambos os estudos demonstraram que se a extração tivesse sido com base no peso vivo, tanto a dose a ser fornecida como os efeitos sobre a síntese da gordura do leite teriam sido menores que os observados. O presente estudo realça a importância da observação do tamanho corporal mesmo para animais da mesma espécie, categoria e estado fisiológico, uma vez que houve uma redução crescente na concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite à medida que o peso metabólico aumentou (Figura 9).

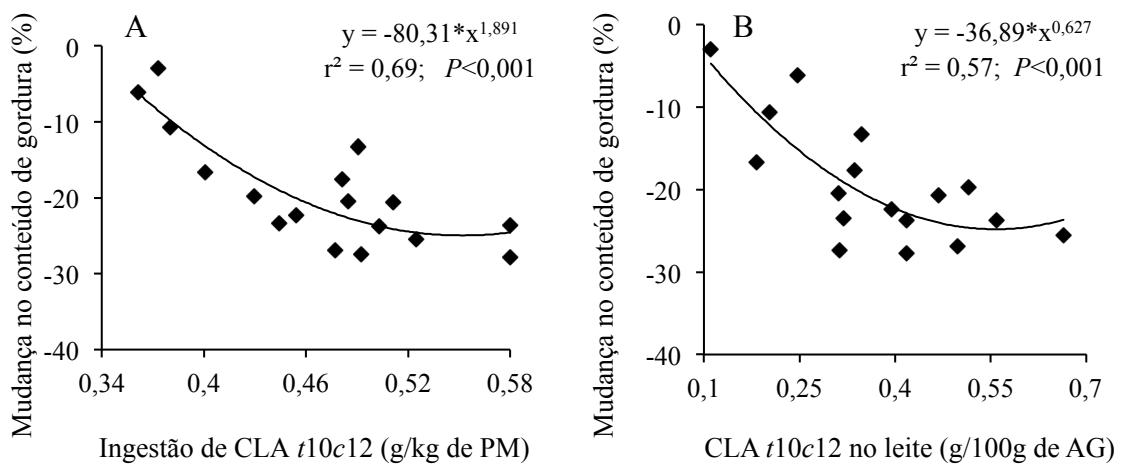
Figura 9 - Relação entre o peso metabólico e o conteúdo de ácido linoleico conjugado (CLA) *trans*-10, *cis*-12 no leite de cabras suplementadas com CLA (n=16).



Visto que nenhuma correlação entre peso metabólico e produção de leite pôde ser identificada, a razão para tal fato pode ter relação com; 1) a taxa de passagem da digesta: isso incluiria um maior metabolismo ruminal do suplemento CLA em cabras de maior peso metabólico. Visto que o *turnover* ruminal está relacionado ao peso do animal elevado a potência 0,25, em cabras mais leves o conteúdo ruminal seria mais frequentemente substituído que em cabras mais pesadas; 2) um efeito “diluitivo” do CLA no organismo: maior utilização de CLA *trans*-10, *cis*-12 em tecidos extra-mamários no animais mais pesados, assumindo que a incorporação no leite reflete o suprimento para a glândula mamária. De um modo geral, este resultado sugere que cabras mais pesadas podem necessitar de uma maior dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 para atingir uma determinada concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite.

Similarmente, o presente estudo corrobora a informação de que a magnitude da redução no conteúdo de gordura do leite está positivamente correlacionada tanto com a ingestão de CLA *trans*-10, *cis*-12 como com a concentração deste isômero no leite (Figura 10). A taxa metabólica basal pode explicar ao menos em parte tal acontecimento, e novamente o tamanho corporal teria um papel fundamental. Conforme revisado por Terpstra (2001), animais mais leves possuem uma maior taxa metabólica basal por kg de peso corporal que

Figura 10 - Mudança no teor de gordura do leite em função da ingestão de CLA *trans*-10, *cis*-12 (A) e em função do conteúdo de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite (B) de cabras suplementadas com CLA (A e B n=17).



animais mais pesados. Deste modo, conforme o autor, uma mesma dose de CLA expressa em mg de CLA por kg de peso metabólico resultaria em uma redução de gordura corporal maior em um rato do que em um ser humano. Condição similar foi observada no presente estudo, onde as maiores reduções na gordura do leite foram observadas nos animais de menor peso

metabólico, o qual foi sinônimo de uma maior ingestão (g/kg de PM) e uma maior concentração (g/100g de AG) de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite.

Os modelos gerados para descrever a redução no conteúdo de gordura do leite mostram que pequenos incrementos na ingestão ou na concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 abaixo do valor aproximado de 0,54 g/kg de PM e 0,51 g/100g de AG respectivamente, foram associados com uma redução relativamente grande no conteúdo de gordura do leite (Figura 10). Por outro lado, a ingestão ou concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 maior que aproximadamente 0,54 g/kg de PM e 0,51 g/100g de AG respectivamente, foi associada com pequenos incrementos na redução do conteúdo de gordura do leite. Em outras palavras, estes valores indicariam o limite a partir do qual o aumento da dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 suplementada resultaria em efeitos cada vez menos significativos sobre a síntese de gordura do leite. Este fato foi inicialmente observado em ensaios com vacas de leite (de VETH et al., 2004; GIESY et al., 2002), e evidências indicam que o CLA é capaz de suprimir somente uma parte dos receptores de sinalização, ou que a via de regulação possui um limite de responsividade/tolerância a regulação promovida pelo CLA *trans*-10, *cis*-12 (HARVATINE et al., 2008). A saturação de sítios de ligação das moléculas enzimáticas envolvidas com a síntese de gordura do leite também poderia explicar a redução na eficiência de inibição em altas doses de CLA *trans*-10, *cis*-12. O presente estudo não avaliou esta possibilidade diretamente, mas a elevada concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite pode ser um indicativo.

A análise dos modelos curvilineares apresentados na Figura 10 indica que ambos os platôs ocorrem quando a depressão do conteúdo de gordura atinge 19,3%. Interessantemente, este valor está bem abaixo da máxima depressão (50%) que o CLA *trans*-10, *cis*-12 é capaz de promover sobre a síntese de gordura do leite de vacas (BAUMAN e GRIINARI, 2003). Indiretamente, estes resultados realçam a menor responsividade dos caprinos aos efeitos inibitórios do CLA *trans*-10, *cis*-12 sobre a síntese de gordura do leite.

CONCLUSÃO

A inclusão de ésteres metílicos de CLA na dieta de cabras leiteiras é efetiva em transferir o isômero CLA *trans*-10, *cis*-12 para a gordura do leite, fato que é acompanhado por uma redução considerável na síntese de gordura do leite. Efeitos do CLA sobre a gordura do leite envolvem uma redução na secreção de ácidos graxos de todos os comprimentos de cadeia, e uma modificação no perfil com aumento na proporção dos ácidos graxos insaturados de cadeia mais longa. A redução na gordura do leite promovida pelo CLA tem o potencial de melhorar o balanço energético, e o aparente aumento na ganho de peso sugere que a energia economizada a partir da redução da síntese de gordura do leite pode ter permanecido retida nos tecidos corporais. Comparações indiretas sugerem equivalente depressão na gordura do leite promovida por suplementos de CLA incluídos na dieta na forma de ésteres metílicos ou na forma de fontes protegidas da bio-hidrogenação ruminal. Assim, apesar do aparente baixo grau de proteção contra o metabolismo ruminal, este trabalho sugere que ésteres metílicos de CLA podem ser uma alternativa em relação aos suplementos de CLA protegidos da bio-hidrogenação devido a facilidades operacionais e vantagens no custo de produção. Adicionalmente, este estudo demonstra as relações entre o peso metabólico e os efeitos relacionados à suplementação com CLA, onde de um modo geral, para uma mesma dose de CLA *trans*-10, *cis*-12, conforme o peso metabólico do animal aumenta, a extensão na depressão da gordura do leite diminui. De um modo geral, estes resultados sugerem que cabras mais pesadas podem necessitar uma maior dose de CLA *trans*-10, *cis*-12 para atingir uma determinada concentração de CLA *trans*-10, *cis*-12 no leite ou uma determinada redução na síntese de gordura do leite.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIJAOUDÉ, J.A.; MORAND-FEHR, P.; TESSIER, J.; SCHMIDELY, P.; SAUVANT, D. Influence of forage : concentrate ratio and type of starch in the diet on feeding behaviour, dietary preferences, digestion, metabolism and performance of dairy goats in mid lactation. **Animal Science**, v.71, p.359-368, 2000.

ANDRADE , P.V.D.; SCHMIDELY, P. Effect of duodenal infusion of *trans*10,*cis*12-CLA on milk performance and milk fatty acid profile in dairy goats fed high or low concentrate diet in combination with rolled canola seed. **Reproduction Nutrition Development**, 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.; GRIINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production and Science**, v.70, p.15–29, 2001.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v.23, p.203–227, 2003.

BAUMAN, D.E.; HARVATINE, K.J.; LOCK, A.L. Nutrigenomics, Rumen-Derived Bioactive Fatty Acids, and the Regulation of Milk Fat Synthesis. **Annual Review of Nutrition**, v.31, p.299–319, 2011.

BAUMAN, D.E.; MATHER, I.H.; WALL, R.J.; LOCK, A.L. Major Advances Associated with the Biosynthesis of Milk. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1235–1243, 2006.

BAUMAN, D.E.; PERFIELD II, J.W.; HARVATINE, K.J.; BAUMGARD, L.H. Regulation of Fat Synthesis by Conjugated Linoleic Acid: Lactation and the Ruminant Model. **The Journal of Nutrition**, v.138, p.403–409, 2008.

BAUMGARD, L.H., CORL, B.A., DWYER, D.A, SÆBØ, A. BAUMAN, D.E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits fat synthesis. **American Journal Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology**, v.278, p.R179-R184, 2000.

BAUMGARD, L.H.; MATITASHVII, 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. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2155-2163, 2002.

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. **Journal of Dairy Science**, 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. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 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. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.1478–1489, 2005.

BERNANRD, 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. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.6083–6094, 2009a.

BERNARD, L.; SHINGFIELD, K.; ROUELL, 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. **British Journal of Nutrition**, v.101, p.213–224, 2009b.

BROWN, J.M.; BOYSEN, M.S.; JENSEN, S.S.; MORRISON, R.F.; STORKSON, J.; CURRIE, R.L.; PARIZA, M.; MANDRUP, S.; MCINTOSH, M.K. Isomer-specific regulation of metabolism and PPAR signaling by CLA in human preadipocytes. **The Journal of Lipid Research**, v.44, p.1287–1300, 2003.

BROWN, J.M.; MC INTOSH, M.K. Conjugated Linoleic Acid in Humans: Regulation of Adiposity and Insulin Sensitivity. **The Journal of Nutrition**, v.133, p.3041–3046, 2003.

CASTAÑEDA-GUTIÉRREZ, E.; OVERTON, T.R.; BUTLER, W.R.; BAUMAN, D.E. Dietary Supplements of Two Doses of Calcium Salts of Conjugated Linoleic Acid During the Transition Period and Early Lactation. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.1078–1089, 2005.

CHILLIARD, Y., FERLAY, A. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. **Reproduction and Nutrition Development**, 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. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p.828–855, 2007.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J.; LAMBERET, G. A Review of Nutritional and Physiological Factors Affecting Goat Milk Lipid Synthesis and Lipolysis. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1751–1770, 2003.

CHILLIARD, Y.; ROUEL, J.; FERLAY, A.; BERNARD, L.; GABORIT, P.; RAYNAL-LJUTOVAC, K.; LAURET, A.; LEROUX, C. Optimising goat's milk and cheese fatty acid

composition. In: WILLIANS, C.; BUTTRISS, J. **Improving the fat content of foods**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2006. 560p.

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

CHRISTIE, W.W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. **Journal of Lipid Research**, 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. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.12, p.622–630, 2001.

CRAIG, M.C.; NEPOKROEFF, C.M.; LAKSHMANAN, M.R.; PORTER, J.W. Effect of dietary change on the rates of synthesis and degradation of rat liver fatty acid synthetase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.152, p.619–630, 1972.

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. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.3786-3801, 2007.

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. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.1685–1693, 2005.

E (Kika) of the Garza Institute for Goat Research - Langston University. **Metabolizable energy (ME) requirement for lactating goats**. Langston University, Langston, OK. Technical Version Calculator. Disponível em:
<http://www.luresext.edu/goats/research/me4.html>. Acessado em: 17/10/2011.

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 Journal of Animal Science**, v.34, Supp. 1, p.42-45, 2004.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2009. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx>. Acessado em: 23/08/2011.

GAMA, M.A.S.; OLIVEIRA, D.E.; FERNANDES, D.; SOUZA, J.; BRUSCHI, J.H. An unprotected conjugated linoleic acid (CLA) supplement reduces milk fat synthesis and forage intake in lactating goats. In: **XI International Symposium on Ruminant Physiology**, 2009, Clermont-Ferrand. Proceedings of The International Symposium on Ruminant Physiology. Wageningen : Wageningen academic Publishers, v.1, 2009.

GIESY, J.G.; MC GUIRE, M.A.; SHAFII, B.; HANSON, T.W. Effect of Dose of Calcium Salts of Conjugated Linoleic Acid (CLA) on Percentage and Fatty Acid Content of Milk Fat in Midlactation Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v.85, p.2023–2029, 2002.

GRIINARI, J.M.; BAUMAN, D.E. Milk fat depression: Concepts, mechanisms and management. In: SERJSEN, K.; HVELPLUND, T.; NIELSON, M.O. **Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism and Impact of Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress**. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands. p.389–417, 2006.

GRIINARI, J.M.; DWYER, D.A.; MCGUIRE, M.A.; BAUMAN, D.E.; ALMQUIST, D.L.; NURMELA, K.V.V. *Trans*-Octadecenoic Acids and Milk Fat Depression in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.1251–1261, 1998.

GRIINARI, J.M.; NURMELA, K.; DWYER, D.A.; BARBANO, D.M.; BAUMAN, D.E. Variation of milk fat concentration of conjugated linoleic acid and milk fat percentage is associated with a change in ruminal biohydrogenation. **Journal of Animal Science**, v.77, Supp.1, 1999.

GULATI, S.K.; KITESSA, S.M.; ASHES, J.R.; FLECK, E.; BYERS, E.B.; BYERS, Y.G.; SCOTT, T.W. Protection of conjugated linoleic acids from ruminal hydrogenation and their incorporation into milk fat. **Animal Feed Science and Technology**, v.86, p.139-148, 2000.

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

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. **The Journal of Nutrition**, 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. **The Journal of Nutrition**, v.139, p.849–854, 2009.

HARVATINE, K.J.; BOISCLAIR, Y.R.; BAUMAN, D.E. Recent advances in the regulation of milk fat synthesis. **Animal**, v.3, p.40–54, 2008.

HUANG, Y.; SCHOOONMAKER, J.P.; OREN, S.L.; TRENKLE, A.; BEITZ, D.C. Calcium salts of CLA improve availability of dietary CLA. **Livestock Science**, v.122, p.1–7, 2009.

JACOBS, A.A.A.; VAN BALL, J.; SMITS, M.A.; TAWEET, H.Z.H.; HENDRIKS, W.H.; VAN VUREN, A.M.; DIJKSTRA, J. Effects of feeding rapeseed oil, or linseed oil on stearoyl-CoA desaturase expression in the mammary gland of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, p874-887, 2011.

JENKINS, T.C.; BRIDGES, W.C. Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle. **Europe Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p.778–789, 2007.

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. **Journal of Animal Science**, v.86, p.397-412, 2008.

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

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. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.2588–2597, 2003.

KRAMER, J.K.G.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; ZHOU, J. Conjugated linoleic acids and octadecenoic acids: Analysis by GC. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.103, p.600–609, 2001.

KUEHL, R.O. **Design of experiments: Statistical principles of research design and analysis**. 2ed. Brooks, Cole: Duxbury Press. 2000. 666p.

LAWSON, R.E.; MOSS, A.R.; GIVENS, D.I. The role of dairy products in supplying conjugated linoleic acid to man's diet: a review. **Nutrition Research Reviews**, v.14, p.153-172, 2001.

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. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.3291–3299, 2008.

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. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1525–1532, 2006.

MAIA, M.; CHAUDARY, 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 Microbiology**, v.10, n.52, 2010.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Caprinos e Ovinos**. 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>. Acessado em: 23/08/2011.

MEDEIROS, S.R.; OLIVEIRA, D.E.; AROEIRA, 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. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.1126–1137, 2010.

MELE, M.; SERRA, A.; RAFANELLI, M.R.; CONTE, G.; SECCHIARI, P. Effect of forage/concentrate ratio and soybean oil supplementation on milk yield and quality from dairy goats. **Italian Journal of Animal Science**, v.4, Suppl.2, p.392-394, 2005.

MIR, Z.; GOONEWARDENE, L.A.; OKINE, E.; JAEGAR, S.; SCHEER, H.D. Effect of feeding canola oil on constituents, conjugated linoleic acid (CLA) and long chain fatty acids in goats milk. **Small Ruminant Research**, v.33, p.137-143, 1999.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Current Concepts of Bovine Mastitis**, 4ed. Arlington, VA. 1996. 64p.

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

NRC, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. 7ed. Washington: Subcommittee on Dairy Cattle Nutrition, Committee on Animal Nutrition, National Research Council, 2001. 408p.

NSAHLAI, I.V.; GOETSCH, A.L.; LUO, J.; JOHNSON, Z.B.; MOORE, J.E.; SAHLU, T.; FERRELL, C.L.; GALYEAN, M.L.; OWENS, F.N. Energy requirements for lactation of goats. **Small Ruminant Research**, v.53, p.253–273, 2004.

ODENS, L.J.; BURGOS, R.; INNOCENTI, M.; VAN BAALE, M.J.; BAUMGARD, L.H. Effects of Varying Doses of Supplemental Conjugated Linoleic Acid on Production and Energetic Variables During the Transition Period. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.293–305, 2007.

OLLIER, S.; LEROUX, C.; 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. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.5544–5560, 2009.

PALMQUIST, D.L.; JENKINS, T.C. Challenges with fats and fatty acid methods. **Journal of Animal Science**, v.81, p.3250-3254, 2003.

PARODI, P.W. Conjugated linoleic acid in food. In: SÉBÉDIO, J.; CHRISTINE, W.W.; ADOLF, R. **Advances in Conjugated Linoleic Acid research**. 2ed. Champaign, IL: AOCS PRESS, 2003. p.101-121.

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 Δ9-Desaturase Index in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.2559–2566, 2006.

PERFIELD II, J.W.; LOCK, A.L.; GRIINARI, J.M.; SÆBØ, A.; DELMONTE, P.; DWYER, D.A.; BAUMAN, D.E. *Trans*-9, *cis*-11 Conjugated linoleic acid (CLA) reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.2211–2218, 2007.

POIRIER, H.; SHAPIRO, J.S.; KIM, R.J.; LAZAR, M.A. Nutritional Supplementation With *trans*-10, *cis*-12-Conjugated Linoleic Acid Induces Inflammation of White Adipose Tissue. **Diabetes**, v.55, p.1634-1641, 2006.

RIBEIRO, C.V.D.M.; OLIVEIRA, D.E.; JUCHEM, S.O.; SILVA, T.M.; NALÉRIO, E.S. Fatty acid profile of meat and milk from small ruminants: a review. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, p.121-137, 2011 (supl. especial).

ROUEL, J.; BRUNETEAU, E.; GUILLOUET, P.; FERLAY, A.; GABORIT, P.; LELOUTRE, L.; CHILLIARD, Y. Goat dairy performances according to dietary forage:concentrate ratio and/or high doses of sunflower or linseed oil, or extruded mixture of seeds. In: **Book of Abstracts, 56th Annual Meeting of European Association for Animal Production, 5–8 June 2005**. Wageningen Academic Publishers, Wageningen p. 280, 2005.

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

SAUVANT, D. Alimentation énergétique des caprins. In **Nutrition et Système d'alimentation de la Chèvre, Symposium international**, Tours (France), 12–15 may 1981, p. 55–79, France: INRA-ITOVIC, 1981.

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

SAMPELAYO, S.M.R.; CHILLIARD, Y.; SCHMIDELY, P.; BOZAA, J. Influence of type of diet on the fat constituents of goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v.68, p.42–63, 2007.

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 Journal of Animal Science**, v.34, Suppl.1, p.195–197, 2004.

SCHMIDELY, P.; MORAND-FEHR, P.; SAUVANT, D. Influence of extruded soybeans with or without bicarbonate on milk performance and fatty acid composition of goat milk. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.757–765, 2005.

SCHMIDELY, P.; SAUVANT, D. Fat content yield and composition of milk in small ruminants : effects of concentrate level and addition of fat. **INRA Production Animales**, v.14, p.337-354, 2001.

SHINGFIELD, K.J.; BEEVER, D.E.; REYNOLDS, C.K.; GULATI, S.K.; HUMPHRIES, D.J.; LUPOLI, B.; HERVAS, G.; GRIINARI, M.J. Effect of rumen protected conjugated linoleic acid on energy metabolism of dairy cows during early to mid-lactation. **Journal of Animal Science**, v.82, Suppl. 1, p.307, 2004.

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.; CHILLIARD, Y.; TOIVONEN, V.; KAIKENIUS, P.; GIVENS, D.I. *Trans* fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.606, p.3–65, 2008.

SHINGFIELD, K.J.; GRIINARI, J.M. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.109, p.799–816, 2007.

- SHINGFIELD, K.J.; ROUEL, J.R.; 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 goats. **British Journal of Nutrition**, v.101, p.1006–1019, 2009.
- SINCLAIR, L.A.; LOCK, A.L.; EARLY, R.; BAUMAN, D.E. Effects of *Trans*-10, *Cis*-12 Conjugated Linoleic Acid on Ovine Milk Fat Synthesis and Cheese Properties. **Journal of Dairy Science**, 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. **The Journal of Nutrition**, v.140, p.1949–1955, 2010.
- SUKHIJA, P.S.; PALMQUIST, D.L. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces. **Journal of Agricultural, Food and Chemistry**, v.36, p.1202–1206, 1988.
- TEDESCHI, L. O.; CANNAS, A.; FOX, D. G.. A A nutrition mathematical model to account for dietary suplly and requirements of energy and other nutrients for domesticated small ruminants: The development and evaluation of the small ruminant nutrition system. **Small Ruminant Research**, v.3699, p.01-10, 2010.
- TERPSTRA, A.H.M. Differences between Humans and Mice in Efficacy of the Body Fat Lowering Effect of Conjugated Linoleic Acid: Role of Metabolic Rate. **The Journal of Nutrition**, v.131, p.2067–2068, 2001.
- 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. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3583-3597, 1991.
- VLAEMINCK, B.; FIEVEZ, V.; CABRITA, A.R. J.; FONSECA, A.J.M.; DEWHURST, R.J. Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, p.389–417, 2006.
- VOLPE, J.J.; VAGELOS, P.R. Saturated fatty acid biosynthesis and its regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v.42, p.21–60, 1973.
- WONGTANGTINTHARN, S.; OKU, H.; IWASAKI, H.; TODA, T. Effect of branched-chain fatty acids on fatty acid biosynthesis of human breast cancer cells. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.50, p.137–143, 2004.
- WEISS, W.P. Method estimates available energy value for ruminants. **Feedstuffs**, v.9, p.13-14, 1993.
- WOLFF, R.L.; BAYARD, C.C.; FABIEN, R.J. Evaluation of Sequential Methods for the Determination of Butterfat Fatty Acid Composition with Emphasis on *trans*-18:1 Acids. Application to the Study of Seasonal Variations in French Butters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.72, p.1471-1483, 1995.

YANG, Y.; SHANGPEI, L.; CHEN, X.; H.; HUANG, M.; ZHENG, J. Induction of apoptotic cell death and in vivo growth inhibition of human cancer cells by a saturated branched-chain fatty acid, 13-methyltetradecanoic acid. **Cancer Research**, v.60, p.505–509, 2000.

APÊNDICE A – PRODUÇÃO DE LEITE

Período	Tratamento	Animal	Dias em tratamento														
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	1	6584	1,10	1,24	1,24	1,44	1,22	1,16	1,06	1,02	1,00	0,92	1,00	1,08	1,08	0,94	1,04
1	1	5487	2,56	2,58	2,58	2,60	2,40	2,48	2,46	2,34	2,24	2,42	2,34	2,42	2,40	2,22	2,30
1	1	7703	1,20	1,52	1,62	1,44	1,32	1,36	1,42	1,36	1,22	1,34	1,26	1,36	1,28	1,16	1,14
1	1	5474	1,74	1,78	1,76	1,86	1,68	1,76	1,74	1,64	1,52	1,52	1,48	1,44	1,32	1,22	1,34
1	1	7679	2,08	1,98	2,06	2,02	1,90	1,92	2,00	1,94	1,92	1,90	1,98	1,92	1,94	1,76	1,66
1	1	8745	1,74	1,74	1,66	1,70	1,52	1,56	1,62	1,64	1,54	1,60	1,56	1,60	1,52	1,36	1,50
1	1	6582	2,48	2,64	2,28	2,42	2,28	2,42	2,38	2,40	2,32	2,36	2,30	2,32	2,18	2,02	2,22
1	1	7671	1,88	1,94	1,70	1,98	1,82	1,90	1,90	1,84	1,84	1,90	1,88	1,92	1,92	1,68	1,80
1	1	4396	3,16	3,08	2,96	3,24	3,26	3,44	3,36	3,26	2,86	2,92	2,92	2,96	2,94	2,74	2,76
1	2	7696	2,36	2,40	2,12	2,38	2,24	2,28	2,36	2,40	2,32	2,44	2,40	2,42	2,30	2,04	2,24
1	2	6535	2,14	1,94	2,36	1,98	2,02	2,10	2,04	2,10	2,06	2,10	2,00	2,06	1,96	1,82	1,70
1	2	5467	2,66	2,54	2,60	2,54	2,40	2,56	2,66	2,48	2,44	2,34	2,30	2,24	2,22	2,08	2,08
1	2	6548	2,46	2,24	2,42	2,34	2,28	2,22	2,20	2,38	2,18	2,28	2,52	2,38	2,10	2,24	2,36
1	2	7706	1,94	1,92	1,88	1,90	1,86	1,90	1,94	1,98	1,94	2,04	2,06	2,06	2,02	1,98	2,00
1	2	6578	2,56	2,52	2,36	2,28	2,16	2,32	2,30	2,24	2,26	2,24	2,28	2,14	2,06	2,04	2,10
1	2	5477	1,40	1,34	1,28	1,34	1,20	1,26	1,20	1,34	1,34	1,40	1,38	1,38	1,22	1,14	1,06
1	2	6601	1,98	1,86	1,90	1,90	1,90	1,92	1,96	2,00	1,94	1,82	1,98	2,02	1,80	1,82	1,76
1	2	8732	1,36	1,50	1,42	1,46	1,34	1,52	1,34	1,52	1,40	1,48	1,38	1,46	1,46	1,42	1,30
2	2	6584	1,08	1,02	0,94	0,92	0,98	1,02	0,94	1,04	0,92	0,96	0,80	0,80	0,84	0,82	0,84
2	2	5487	2,52	2,42	2,40	2,44	2,40	2,36	2,28	2,34	2,20	2,26	2,22	2,26	2,28	2,18	2,24
2	2	7703	1,18	1,22	1,18	1,16	1,20	1,20	1,22	1,30	1,16	1,18	1,08	1,14	1,14	1,10	1,08
2	2	5474	1,26	1,32	1,22	1,30	1,38	1,38	1,34	1,26	0,98	1,26	1,20	1,22	1,32	1,10	1,22
2	2	7679	1,84	1,68	1,66	1,76	1,82	1,86	1,92	1,98	1,94	1,98	1,92	1,84	1,88	1,66	1,32
2	2	8745	1,48	1,44	1,46	1,52	1,58	1,56	1,58	1,50	1,40	1,60	1,44	1,48	1,52	1,54	1,50
2	2	6582	2,10	2,30	2,06	2,08	2,12	2,20	2,14	2,20	2,08	2,06	1,88	1,88	1,90	1,70	1,74

2	2	7671	1,74	1,70	1,70	1,72	1,72	1,72	1,60	1,84	1,72	1,76	1,78	1,68	1,68	1,58	1,55
2	2	4396	2,60	2,48	2,44	2,50	2,66	2,60	2,48	2,46	2,38	2,42	2,20	2,12	2,26	2,24	2,20
2	1	7696	2,26	2,24	2,14	2,20	2,32	2,18	2,26	2,30	2,18	2,22	2,18	2,14	2,18	1,94	2,02
2	1	6535	2,02	1,72	1,96	1,78	1,94	1,82	1,88	2,06	1,72	1,78	1,62	1,78	1,86	1,60	1,52
2	1	5467	2,42	2,38	2,22	2,12	2,18	2,06	1,90	1,98	1,80	1,84	1,72	1,80	2,06	1,92	1,96
2	1	6548	2,00	2,22	2,44	2,50	2,40	2,32	2,28	1,90	2,12	2,14	2,22	2,00	2,22	2,00	1,86
2	1	7706	2,22	1,92	1,92	1,96	2,06	1,82	2,04	1,96	1,90	1,78	1,62	1,64	1,72	1,60	1,56
2	1	6578	1,84	1,84	1,78	1,72	1,88	1,72	1,74	1,80	1,62	1,42	1,24	1,32	1,48	1,40	1,38
2	1	5477	1,12	1,14	1,24	1,10	1,08	1,02	0,90	0,88	0,80	0,82	0,68	0,80	0,74	0,84	0,70
2	1	6601	1,50	1,70	1,46	1,66	1,70	1,68	1,62	1,58	1,56	1,60	1,60	1,56	1,60	1,44	
2	1	8732	1,38	1,50	1,40	1,44	1,46	1,40	1,42	1,42	1,30	1,30	1,28	1,38	1,30	1,36	1,30

Tratamento 1 = 30 g/d de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa.

Tratamento 2 = 30 g/d de ésteres metílicos de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) não protegidos da bio-hidrogenação.

APÊNDICE B – PERCENTUAL DE GORDURA DO LEITE

Período	Tratamento	Animal	Dias em tratamento							
			0	2	4	6	8	10	12	14
1	1	6584	2,71	3,47	3,40	3,34	3,49	3,97	3,75	3,86
1	1	5487	2,68	2,99	2,92	2,92	3,11	3,13	3,00	3,00
1	1	7703	3,11	3,71	3,56	3,58	3,77	4,12	3,86	4,41
1	1	5474	3,34	3,78	3,46	3,53	4,08	4,44	4,40	4,44
1	1	7679	3,62	4,35	4,35	4,46	4,64	4,81	4,75	4,62
1	1	8745	3,76	4,31	4,36	4,62	4,82	5,54	4,69	5,07
1	1	6582	3,78	3,93	4,55	4,29	4,24	4,24	4,18	4,71
1	1	7671	4,44	4,63	4,67	4,93	5,19	5,13	5,04	5,34
1	1	4396	2,91	3,31	3,01	3,00	3,27	3,61	3,62	3,43
1	2	7696	3,79	3,62	3,15	2,87	2,96	2,80	2,82	3,05
1	2	6535	4,06	4,75	4,37	3,71	3,89	4,06	3,86	3,93
1	2	5467	4,14	4,30	4,07	3,62	3,97	3,89	3,85	4,04
1	2	6548	4,07	4,29	4,18	3,92	3,93	3,58	3,65	3,77
1	2	7706	3,79	3,81	3,41	3,13	3,17	2,99	2,98	3,07
1	2	6578	3,14	3,39	3,22	2,84	2,96	2,87	2,76	2,66
1	2	5477	3,88	4,14	3,44	3,08	3,07	2,87	2,68	2,95
1	2	6601	3,51	3,71	3,31	2,97	3,29	3,11	3,00	3,14
1	2	8732	3,70	4,06	3,58	3,00	3,15	2,98	2,84	2,87
2	2	6584	3,42	3,35	2,87	2,72	2,66	2,46	2,38	2,35
2	2	5487	2,96	2,52	1,98	1,93	1,96	1,97	1,84	1,85
2	2	7703	3,95	3,27	2,73	2,68	2,49	2,43	2,42	2,47
2	2	5474	3,35	3,88	3,14	2,82	2,26	2,66	3,15	2,83
2	2	7679	4,35	3,87	3,41	3,08	2,95	2,57	2,77	2,84
2	2	8745	4,51	3,90	3,46	3,48	3,37	3,18	3,30	3,16
2	2	6582	4,43	3,78	3,39	3,30	3,14	3,23	3,14	2,81

2	2	7671	5,23	4,61	3,82	3,71	3,39	3,36	3,34	3,12
2	2	4396	3,36	3,23	2,65	2,63	2,61	2,48	2,47	2,36
2	1	7696	3,91	4,05	4,16	4,27	4,29	4,43	4,37	4,81
2	1	6535	4,01	4,41	4,25	4,42	4,32	4,6	4,34	4,4
2	1	5467	4,61	4,71	4,86	4,86	5,13	5,39	5,26	5,26
2	1	6548	4,12	3,83	3,76	4,04	4,38	4,02	4,05	4,16
2	1	7706	4,31	3,98	4,24	4,31	4,45	4,58	4,21	4,48
2	1	6578	3,35	3,59	3,30	2,81	2,82	3,51	3,72	3,58
2	1	5477	3,63	3,86	3,88	4,05	3,80	4,28	4,09	4,1
2	1	6601	3,58	3,55	3,64	3,97	3,75	3,97	3,70	3,86
2	1	8732	4,24	4,14	4,12	4,53	4,60	4,79	4,70	5,14

Tratamento 1 = 30 g/d de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa.

Tratamento 2 = 30 g/d de ésteres metílicos de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) não protegidos da bio-hidrogenação.

APÊNDICE C – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE

P	T	A	Ácido Graxo							
			C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C11:0	C12:0	C13:0	C14:0
1	1	6584	2.5354	2.4832	2.7120	8.2402	0.2990	3.3541	0.1649	8.5885
1	1	5487	2.8219	2.3049	2.2520	7.2773	0.2689	3.0457	0.0685	10.1435
1	1	7703	2.5900	2.4799	2.5152	8.1867	0.1885	3.0146	0.0569	8.9383
1	1	5474	2.8061	2.7953	3.0344	10.0261	0.3139	3.6613	0.0718	9.2409
1	1	7679	2.3927	2.3462	2.6318	9.6181	0.3492	4.2582	0.0710	9.5349
1	1	8745	2.6870	2.6256	2.9664	10.1197	0.2910	3.9951	0.1720	8.0653
1	1	6582	2.6104	2.5626	2.8397	9.4772	0.2996	3.7982	0.0821	8.4999
1	1	7671	2.5496	2.4370	2.7215	9.3651	0.2958	3.7043	0.1157	8.6317
1	1	4396	2.6546	2.3667	2.3005	8.0340	0.3344	3.1690	0.0906	10.2281
1	2	7696	2.3722	1.8024	1.7810	6.1928	0.1298	2.8345	0.1524	8.9986
1	2	6535	2.6350	2.0392	2.1379	7.3238	0.1564	3.5283	0.0880	8.6941
1	2	5467	3.0297	2.3976	2.5499	8.2818	0.1453	3.7000	0.0394	10.4432
1	2	6548	3.1174	2.5419	2.5253	8.2873	0.1743	3.3144	0.1160	10.1173
1	2	7706	2.9380	2.0198	1.9479	6.2667	0.1123	2.7948	0.1078	8.5982
1	2	6578	3.1456	2.2231	2.0952	7.1602	0.1552	2.8767	0.0714	10.3051
1	2	5477	2.8404	1.8578	1.7440	5.8590	0.0948	2.5843	0.0743	7.9221
1	2	6601	2.9307	2.4478	2.6584	9.6308	0.1535	4.5373	0.1418	11.1461
1	2	8732	2.0741	1.6559	1.6924	6.3244	0.1080	3.0674	0.0759	9.2891
2	2	6584	2.9454	1.7446	1.4722	4.6051	0.0822	2.1856	0.1050	7.7179
2	2	5487	2.7757	1.7179	1.5392	5.2443	0.1300	2.7884	0.1170	9.9373
2	2	7703	2.9164	1.7084	1.4158	4.5879	0.0483	1.9621	0.0843	7.6677
2	2	5474	3.2559	2.2629	2.0738	6.9931	0.1622	2.8640	0.1157	9.4397
2	2	7679	2.4417	1.6490	1.5952	5.3860	0.1117	2.8753	0.1086	8.5235
2	2	8745	3.3017	2.3380	2.2516	7.1406	0.1239	2.8174	0.1247	7.9890
2	2	6582	2.8091	1.8706	1.7759	5.8095	0.1069	2.6536	0.0965	8.0770
2	2	7671	2.9843	1.9507	1.7881	5.8690	0.1238	2.5503	0.1453	8.2777
2	2	4396	2.5769	1.8547	1.7172	6.1530	0.1933	2.6538	0.0827	10.4438
2	1	7696	2.5815	2.5969	2.8725	9.2857	0.3183	3.9526	0.0754	8.8602
2	1	6535	1.9894	1.9919	2.2388	8.3563	0.2389	4.0425	0.0000	8.0526
2	1	5467	2.6298	2.7920	3.2682	11.2961	0.2856	4.5795	0.0678	9.6874
2	1	6548	2.3438	2.2380	2.3408	8.2520	0.2341	3.3624	0.0857	9.2374
2	1	7706	2.7659	2.6681	2.8616	9.5747	0.2541	3.8491	0.0967	9.7119
2	1	6578	3.1702	2.5818	2.4540	7.8403	0.2996	3.1229	0.0780	9.7009
2	1	5477	3.0687	2.6064	2.6279	8.4288	0.2237	3.3538	0.0722	7.5978
2	1	6601	2.7011	2.8098	3.1975	11.6062	0.2707	5.2813	0.0714	9.7191
2	1	8732	2.1713	2.1074	2.3279	8.5769	0.1736	3.9266	0.0687	8.9123

P = período; T = tratamento; A = animal.

Tratamento 1 = 30 g/d de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa.

Tratamento 2 = 30 g/d de ésteres metílicos de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) não protegidos da hidrogenação.

Cont...

P	T	A	Ácido Graxo							
			C15:0 iso	C15:0 anteiso	C14:1 cis-9	C15:0	C16:0	C16:1 cis-9	C17:0	C17:1 cis-9
1	1	6584	0.1542	0.2355	0.1391	0.7410	25.1976	0.6888	0.6345	0.1934
1	1	5487	0.2347	0.3058	0.1395	0.7353	28.9335	0.5869	0.4487	0.1917
1	1	7703	0.1477	0.3255	0.0857	0.6351	28.1988	0.5335	0.4087	0.1733
1	1	5474	0.1884	0.2766	0.0935	0.8626	28.8576	0.5423	0.4160	0.1567
1	1	7679	0.2046	0.3696	0.1044	0.9027	28.2297	0.6219	0.4549	0.1856
1	1	8745	0.1830	0.2656	0.0855	0.8026	27.6743	0.6124	0.4652	0.1892
1	1	6582	0.1784	0.2982	0.1051	0.7728	27.0005	0.6307	0.4478	0.1730
1	1	7671	0.1448	0.3417	0.0849	0.8268	27.2016	0.5411	0.4945	0.1820
1	1	4396	0.1649	0.2672	0.1673	0.8732	33.5030	0.7055	0.4603	0.1807
1	2	7696	0.1425	0.2854	0.0625	0.8316	24.2305	0.4521	0.4929	0.1603
1	2	6535	0.2111	0.3662	0.0594	0.7134	22.8183	0.5219	0.4777	0.1655
1	2	5467	0.1642	0.3638	0.0655	0.6276	23.7568	0.4582	0.4049	0.1420
1	2	6548	0.2277	0.2589	0.0766	0.7125	26.9738	0.7397	0.6478	0.3974
1	2	7706	0.1874	0.3526	0.0405	0.7963	21.2415	0.4025	0.5024	0.1376
1	2	6578	0.1670	0.2802	0.0836	0.7305	29.5727	0.4778	0.4402	0.1274
1	2	5477	0.2335	0.3099	0.0364	0.7315	22.1140	0.4080	0.4832	0.1185
1	2	6601	0.3041	0.3498	0.0625	0.6932	25.0492	0.3355	0.4001	0.0977
1	2	8732	0.2667	0.3260	0.0324	0.9048	24.7537	0.3257	0.5683	0.1029
2	2	6584	0.2450	0.3032	0.0459	0.7573	21.4366	0.3947	0.5665	0.0803
2	2	5487	0.1765	0.3303	0.0797	0.9125	26.8631	0.4564	0.5013	0.1644
2	2	7703	0.2166	0.3104	0.0244	0.7867	23.1259	0.3928	0.5857	0.1359
2	2	5474	0.2133	0.2595	0.0570	0.7819	26.6440	0.4343	0.4669	0.1231
2	2	7679	0.2295	0.3734	0.0472	0.8474	21.8983	0.4828	0.5153	0.1764
2	2	8745	0.2527	0.3361	0.0546	0.9238	23.9990	0.4714	0.6080	0.1561
2	2	6582	0.2052	0.3797	0.0549	0.8458	23.3427	0.5207	0.4679	0.1658
2	2	7671	0.1682	0.3405	0.0632	0.8863	24.4114	0.4916	0.5179	0.1534
2	2	4396	0.1598	0.3168	0.1674	0.9248	31.9926	0.7188	0.4071	0.1739
2	1	7696	0.1452	0.2769	0.1398	0.6809	26.3650	0.6947	0.4017	0.1978
2	1	6535	0.1591	0.2861	0.1232	0.6641	23.4900	0.4606	0.4315	0.1824
2	1	5467	0.1462	0.2658	0.1191	0.5766	28.8877	0.6054	0.3695	0.1677
2	1	6548	0.2340	0.2533	0.0932	0.8810	29.3518	0.6555	0.4688	0.2973
2	1	7706	0.1664	0.3108	0.0850	0.7296	26.1724	0.5376	0.4330	0.1815
2	1	6578	0.1326	0.3178	0.1598	0.6057	29.3681	0.6059	0.3919	0.1885
2	1	5477	0.2054	0.2965	0.0610	0.6473	24.4061	0.4987	0.4132	0.1526
2	1	6601	0.1831	0.2707	0.0936	0.6039	27.6827	0.4715	0.3637	0.1410
2	1	8732	0.1888	0.3587	0.0867	0.6823	27.6435	0.3890	0.4175	0.1384

P = período; **T** = tratamento; **A** = animal.

Tratamento 1 = 30 g/d de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa.

Tratamento 2 = 30 g/d de ésteres metílicos de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) não protegidos da hidrogenação.

Cont...

Ácido Graxo										
P	T	A	C18:0	C18:1 trans-4	C18:1 trans-5	C18:1 t-6 + t-7 +t-8	C18:1 trans-9	C18:1 trans-10	C18:1 trans-11	C18:1 trans-12
1	1	6584	10.2030	0.0304	0.0298	0.3145	0.3579	0.8652	1.3392	0.5749
1	1	5487	7.7964	0.0117	0.0084	0.2432	0.4551	0.7817	1.6801	0.5408
1	1	7703	11.3334	0.0344	0.0343	0.3120	0.4212	0.4986	3.2541	0.6590
1	1	5474	9.1311	0.0249	0.0250	0.1884	0.3504	0.4204	1.8593	0.4988
1	1	7679	10.4960	0.0311	0.0398	0.2178	0.3482	0.5145	2.0326	0.5357
1	1	8745	10.1172	0.0310	0.0290	0.2849	0.4159	0.5949	3.3029	0.6598
1	1	6582	9.5542	0.0377	0.0371	0.2967	0.4424	0.6234	2.9476	0.6191
1	1	7671	12.6107	0.0353	0.0382	0.2538	0.3612	0.6356	2.2310	0.6072
1	1	4396	7.8132	0.0172	0.0218	0.1584	0.2591	0.4426	1.1392	0.3539
1	2	7696	14.5714	0.0426	0.0628	0.4555	0.5399	1.7559	3.3651	0.7864
1	2	6535	17.5903	0.0534	0.0529	0.3549	0.4367	1.5174	2.3093	0.6555
1	2	5467	15.9177	0.0328	0.0580	0.3149	0.3273	1.1743	2.1125	0.5242
1	2	6548	11.3168	0.0241	0.2207	0.2071	1.3093	1.2541	0.3949	0.2531
1	2	7706	19.0849	0.0523	0.0700	0.4849	0.5545	1.4797	3.1214	0.8065
1	2	6578	12.6593	0.0286	0.0635	0.3007	0.3659	1.1366	1.9723	0.5371
1	2	5477	18.8453	0.0531	0.0937	0.4669	0.5943	1.5309	3.6122	0.8718
1	2	6601	13.0553	0.0155	0.0483	0.2959	0.4273	1.3848	2.5820	0.6342
1	2	8732	17.2915	0.0491	0.0749	0.5276	0.4932	1.8852	3.5120	0.8152
2	2	6584	18.6240	0.0634	0.0728	0.4302	0.4389	2.4199	3.8078	0.8478
2	2	5487	12.5197	0.0125	0.0184	0.3134	0.3638	0.9922	2.0222	0.4889
2	2	7703	20.3433	0.0531	0.0701	0.5239	0.4833	2.0214	3.9326	0.8778
2	2	5474	13.9438	0.0398	0.0500	0.3882	0.4584	1.5415	2.5042	0.6826
2	2	7679	18.1614	0.0491	0.0582	0.3901	0.4925	1.8017	2.6580	0.7462
2	2	8745	16.5946	0.0463	0.0606	0.4595	0.4703	1.6439	3.3654	0.8115
2	2	6582	16.2272	0.0431	0.0511	0.3901	0.5050	1.6371	2.7855	0.7172
2	2	7671	18.0768	0.0335	0.0490	0.3861	0.4554	1.5881	2.8249	0.6812
2	2	4396	10.1060	0.0247	0.0419	0.2246	0.3063	0.7560	1.4040	0.3604
2	1	7696	8.5369	0.0347	0.0300	0.3115	0.4590	1.0452	3.6587	0.6699
2	1	6535	12.0104	0.0781	0.1121	0.3280	0.5434	0.6476	3.3707	0.5286
2	1	5467	8.9639	0.0118	0.0167	0.1999	0.3012	0.5469	1.6867	0.4277
2	1	6548	10.4093	0.0273	0.0260	0.2052	0.2960	0.4827	1.3000	0.4212
2	1	7706	11.1068	0.0381	0.0284	0.2400	0.3550	0.5008	1.3866	0.5158
2	1	6578	8.8003	0.0143	0.0181	0.1932	0.3221	0.5279	1.0981	0.4209
2	1	5477	13.5020	0.0306	0.0364	0.2484	0.4214	0.6085	1.7579	0.6570
2	1	6601	9.2088	0.0277	0.0241	0.1973	0.3421	0.5494	1.5428	0.4637
2	1	8732	12.8144	0.0408	0.0370	0.2804	0.3930	0.5424	2.7849	0.5997

P = período; **T** = tratamento; **A** = animal.

Tratamento 1 = 30 g/d de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa.

Tratamento 2 = 30 g/d de ésteres metílicos de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) não protegidos da hidrogenação.

Cont...

P	T	A	Ácido Graxo							
			C18:1 t-13+t-14	C18:1 c-9+ t-15	C18:1 cis-11	C18:1 cis-12	C18:1 cis-13	C18:1 trans-16	C18:2 c-9 t-12	C18:2 c-9 c-12
1	1	6584	0.2504	23.6892	0.7731	0.5406	0.1165	0.3939	0.0349	2.4549
1	1	5487	0.5248	21.0667	1.1752	0.8224	0.0943	0.3327	0.0600	2.6750
1	1	7703	0.7374	17.3503	0.9857	0.7576	0.0859	0.3463	0.0387	2.4571
1	1	5474	0.5056	17.5958	1.1990	0.5661	0.0643	0.3171	0.0299	2.1023
1	1	7679	0.5923	16.6330	1.1831	0.6318	0.0846	0.3541	0.0437	2.3217
1	1	8745	0.6478	15.7954	1.2123	0.6802	0.0915	0.3100	0.0336	2.4555
1	1	6582	0.5984	17.7185	1.1231	0.6364	0.0886	0.3682	0.0639	2.7405
1	1	7671	0.6824	16.5691	1.0827	0.6552	0.0769	0.3661	0.0229	2.4405
1	1	4396	0.3587	18.2872	1.2140	0.4814	0.0762	0.2678	0.0360	1.9462
1	2	7696	0.8936	17.5621	1.3373	1.4996	0.0985	0.3706	0.0216	3.2175
1	2	6535	0.7376	17.7396	1.2082	1.0771	0.1016	0.3796	0.0000	2.0741
1	2	5467	0.6574	16.1310	1.0749	0.7897	0.0783	0.3255	0.0000	1.9870
1	2	6548	18.6787	0.9012	0.5910	0.1016	0.2326	0.0723	2.6853	0.1597
1	2	7706	0.9999	17.1540	1.1905	1.2865	0.0977	0.4151	0.0000	2.4480
1	2	6578	0.6422	15.7585	1.0177	0.8720	0.0633	0.4485	0.0282	2.2858
1	2	5477	1.1204	17.2890	1.1574	1.4316	0.1103	0.4537	0.0000	2.4541
1	2	6601	0.8799	12.9370	0.8925	1.0410	0.0745	0.4050	0.0000	2.2611
1	2	8732	1.0225	15.1280	1.0771	1.2265	0.1019	0.3950	0.0175	2.4695
2	2	6584	0.6633	20.0661	0.9007	1.3124	0.1162	0.3905	0.0649	2.2452
2	2	5487	0.6457	21.8020	1.2253	0.8783	0.0896	0.3207	0.0397	2.5795
2	2	7703	1.0506	16.0238	1.2487	1.5951	0.1016	0.4304	0.0000	2.4671
2	2	5474	0.8065	16.7077	1.0930	1.2014	0.0951	0.3349	0.0000	1.9066
2	2	7679	0.7743	20.1769	1.3751	0.9743	0.0960	0.4122	0.0421	2.4908
2	2	8745	1.0272	14.8338	1.2081	1.2052	0.0968	0.3845	0.0000	2.4139
2	2	6582	0.7433	19.1090	1.3650	0.9475	0.0943	0.3958	0.0210	3.1607
2	2	7671	0.9150	17.0774	1.0865	0.8452	0.0528	0.3306	0.0183	2.5171
2	2	4396	0.3705	19.7904	1.2519	0.6109	0.0625	0.2557	0.0211	2.1140
2	1	7696	0.6562	17.1913	1.1155	0.8699	0.1230	0.2754	0.0639	2.7542
2	1	6535	0.6920	20.5415	1.1413	0.7169	0.1127	1.0591	0.0000	2.4204
2	1	5467	0.5306	16.1461	1.0033	0.5616	0.0686	0.2821	0.0310	1.9759
2	1	6548	0.4556	19.9055	1.2191	0.5665	0.0986	0.3007	0.0261	2.4912
2	1	7706	0.6384	18.6878	1.1223	0.6720	0.1334	0.3889	0.0378	2.4404
2	1	6578	0.4817	20.9392	1.0867	0.5541	0.0797	0.3370	0.0401	2.4961
2	1	5477	0.9194	20.1737	1.0837	0.8842	0.1048	0.4714	0.0491	2.5776
2	1	6601	0.4761	15.7900	0.9812	0.5599	0.0763	0.3008	0.0444	2.4353
2	1	8732	0.6295	17.4097	0.9458	0.6812	0.0862	0.3498	0.0561	2.3398

P = período; **T** = tratamento; **A** = animal.

Tratamento 1 = 30 g/d de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa.

Tratamento 2 = 30 g/d de ésteres metílicos de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) não protegidos da hidrogenação.

Cont...

Ácido Graxo										
P	T	A	C20:0	C20:1 cis-11	C18:3 c-9 c-12 c-15	CLA c-9 t-11	CLA t-10 c-12	C20:2 c-11 c-14	C22:0	C20:3 n-6
1	1	6584	0.1955	0.0280	0.1682	0.9306	0.0047	0.0251	0.0271	0.0187
1	1	5487	0.1767	0.0166	0.2138	1.1782	0.0240	0.0122	0.0353	0.0128
1	1	7703	0.2061	0.0377	0.1681	1.2564	0.0215	0.0099	0.0506	0.0176
1	1	5474	0.1713	0.0338	0.1501	0.9175	0.0161	0.0122	0.0380	0.0167
1	1	7679	0.1919	0.0368	0.1747	0.8186	0.0166	0.0000	0.0401	0.0175
1	1	8745	0.1934	0.0406	0.1952	1.2256	0.0204	0.0093	0.0555	0.0173
1	1	6582	0.1811	0.0422	0.2028	1.3400	0.0266	0.0143	0.0397	0.0185
1	1	7671	0.1950	0.0375	0.1820	0.7484	0.0142	0.0104	0.0420	0.0189
1	1	4396	0.1691	0.0342	0.1474	0.8084	0.0118	0.0092	0.0583	0.0209
1	2	7696	0.1837	0.0551	0.2375	1.0145	0.5196	0.0066	0.0454	0.0177
1	2	6535	0.1964	0.0395	0.1612	0.6990	0.2564	0.0054	0.0379	0.0166
1	2	5467	0.1767	0.0416	0.1615	0.6562	0.3223	0.0000	0.0781	0.0143
1	2	6548	0.0277	0.1823	0.5954	0.0400	0.1162	0.0276	0.0120	0.0258
1	2	7706	0.2104	0.0463	0.1842	0.8376	0.4359	0.0062	0.0497	0.0162
1	2	6578	0.1872	0.0420	0.1691	0.6613	0.2131	0.0091	0.0284	0.0194
1	2	5477	0.2459	0.0502	0.1877	0.9169	0.3525	0.0000	0.0593	0.0000
1	2	6601	0.1661	0.0352	0.1917	0.7390	0.3636	0.0000	0.0344	0.0142
1	2	8732	0.2070	0.0449	0.1898	0.9018	0.4380	0.0000	0.0474	0.0187
2	2	6584	0.2757	0.1292	0.2641	1.1896	0.4989	0.0670	0.0482	0.0410
2	2	5487	0.2246	0.0499	0.2036	0.8672	0.2347	0.0000	0.0459	0.0164
2	2	7703	0.2614	0.0566	0.2012	0.9789	0.6959	0.0075	0.0638	0.0179
2	2	5474	0.1892	0.0447	0.1562	0.8653	0.3309	0.0063	0.0409	0.0236
2	2	7679	0.2529	0.0647	0.1822	0.7962	0.3244	0.0070	0.0522	0.0212
2	2	8745	0.2085	0.0527	0.2027	0.9346	0.5775	0.0257	0.0552	0.0219
2	2	6582	0.2218	0.0510	0.2514	1.1080	0.5330	0.0080	0.0460	0.0227
2	2	7671	0.2171	0.0430	0.2075	0.8947	0.4124	0.0000	0.0540	0.0216
2	2	4396	0.1916	0.0395	0.1751	0.7529	0.1886	0.0000	0.0352	0.0218
2	1	7696	0.1714	0.0478	0.1949	1.9094	0.0350	0.0000	0.0320	0.0182
2	1	6535	0.1588	0.0000	0.1822	1.4567	0.1042	0.0000	0.0000	0.0000
2	1	5467	0.1307	0.0365	0.1553	0.7584	0.0107	0.0000	0.0432	0.0236
2	1	6548	0.1787	0.0473	0.1732	0.6299	0.0217	0.0144	0.0304	0.0342
2	1	7706	0.1553	0.0402	0.1898	0.5703	0.0120	0.0110	0.0260	0.0175
2	1	6578	0.1523	0.0427	0.1646	0.7048	0.0192	0.0090	0.0327	0.0348
2	1	5477	0.2254	0.0407	0.2059	0.7164	0.0167	0.0000	0.0567	0.0246
2	1	6601	0.1591	0.0394	0.1730	0.6937	0.0161	0.0000	0.0317	0.0300
2	1	8732	0.1997	0.0405	0.1972	0.9571	0.0182	0.0128	0.0466	0.0208

P = período; **T** = tratamento; **A** = animal.

Tratamento 1 = 30 g/d de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa.

Tratamento 2 = 30 g/d de ésteres metílicos de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) não protegidos da hidrogenação.

Cont...

P	T	A	Ácido Graxo		
			C20:4 n-6	C24:0	Outros
1	1	6584	0.2031	0.0168	0.0524
1	1	5487	0.1493	0.0231	0.1307
1	1	7703	0.2321	0.0296	0.1858
1	1	5474	0.2190	0.0287	0.1746
1	1	7679	0.1616	0.0108	0.1960
1	1	8745	0.2017	0.0307	0.1486
1	1	6582	0.1841	0.0354	0.2435
1	1	7671	0.1710	0.0501	0.2234
1	1	4396	0.1896	0.0239	0.1543
1	2	7696	0.1455	0.0355	0.2369
1	2	6535	0.1558	0.0000	0.2074
1	2	5467	0.1439	0.0265	0.3033
1	2	6548	0.2175	0.0324	0.0921
1	2	7706	0.1770	0.0325	0.3117
1	2	6578	0.1758	0.0239	0.3788
1	2	5477	0.1537	0.0327	0.5047
1	2	6601	0.1664	0.0252	0.3915
1	2	8732	0.1315	0.0214	0.3451
2	2	6584	0.1550	0.0388	0.1410
2	2	5487	0.1284	0.0276	0.1558
2	2	7703	0.1675	0.0340	0.3231
2	2	5474	0.2152	0.0301	0.1966
2	2	7679	0.1335	0.0248	0.1808
2	2	8745	0.1444	0.0272	0.2390
2	2	6582	0.1512	0.0316	0.2004
2	2	7671	0.1441	0.0290	0.3168
2	2	4396	0.1548	0.0249	0.1780
2	1	7696	0.1648	0.0262	0.1599
2	1	6535	0.2056	0.0000	0.8823
2	1	5467	0.1852	0.0287	0.1293
2	1	6548	0.1775	0.0316	0.1009
2	1	7706	0.1990	0.0153	0.0726
2	1	6578	0.2368	0.0274	0.1484
2	1	5477	0.1947	0.0357	0.2973
2	1	6601	0.2250	0.0370	0.1078
2	1	8732	0.1622	0.0296	0.1550

P = período; **T** = tratamento; **A** = animal.

Tratamento 1 = 30 g/d de sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa.

Tratamento 2 = 30 g/d de ésteres metílicos de CLA (29,9% CLA *trans*-10, *cis*-12) não protegidos da bio-hidrogenação.

APÊNDICE D – ENTRADAS DO SAS

a) Medidas repetidas:

```

data variavel1;
input Periodo Tratamento Animal d1 d2 dn;
cards;
proc sort data=variavel1; by tratamento animal periodo;
proc transpose data=variavel1 prefix=mf name=day out=variavel2;
  var d1-dn;
  by tratamento animal periodo;
data variavel3 (drop=day);
set variavel2;
if day='d1' then d=1;
if day='d2' then d=2;
if day='dn' then d=n;
seq=2;
if periodo=1 and tratamento=1 then seq=1;
if periodo=2 and tratamento=2 then seq=1;
proc mixed data=variavel3 covtest;
  class periodo animal tratamento seq d;
  model mfl=tratamento d tratamento*d;
  random periodo animal(seq)/type=ar(1);
  lsmeans tratamento d tratamento*d;
  lsmeans/pdiff;
run;

```

b) Medidas não repetidas:

```

data variavel1;
input Periodo Tratamento Animal d1;
cards;
proc sort data=variavel1; by tratamento animal periodo;
proc transpose data=variavel1 prefix=gl name=day out=variavel2;
  var d1;
  by tratamento animal periodo;

data variavel3 (drop=day);
set variavel2;
if day='d1' then d=1;

seq=2;
if period=1 and trat=1 then seq=1;
if period=2 and trat=2 then seq=1;
proc mixed data=variavel3 covtest;
  class periodo animal tratamento seq;
  model g1=tratamento seq;
  random periodo animal(seq)/type=ar(1);
  lsmeans tratamento seq;
  lsmeans tratamento seq/pdiff;

```

c) Correlações:

```

data regressao;
input x y;
datalines;

```

```
proc reg data=regressao;
model y= x /r cli clm;
test x=1;
run;
proc corr data=regressao;
var x y;
run;
proc nlin data=regressao;
parms a=valor1 b=valor2 c=valor3;
model y=a*exp(b*x)+c;
run;
proc model data=regressao;
x0=valor1*b/c;
if x < x0 then y = a + b*x + c*x*x;
else y = a + b*x0 + c*x0*x0;
fit y start=(a valor1 b valor2 c valor3);
estimate 'Join point' x0,
        'plateau' a + b*x0 + c*x0**2 ;
run;
```