



UNIVERSIDADE DOS AÇORES

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS E QUALITATIVAS NO PERFIL
DOS ÁCIDOS GORDOS DA GORDURA DO LEITE DE VACA
RELACIONADAS COM MUDANÇAS NA DIETA**



Relatório Realizado por:
Vera Lúcia Gomes Duarte
Mestrado em Engenharia Zootécnica

Angra do Heroísmo

2010



UNIVERSIDADE DOS AÇORES
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**ALTERAÇÕES QUANTITATIVAS E QUALITATIVAS NO PERFIL
DOS ÁCIDOS GORDOS DA GORDURA DO LEITE DE VACA
RELACIONADAS COM MUDANÇAS NA DIETA**

Relatório Realizado por:
Vera Lúcia Gomes Duarte
Mestrado em Engenharia Zootécnica

Orientador:
Professor Doutor Oldemiro de Aguiar do Rego

Angra do Heroísmo
2010

Agradecimentos

Queria agradecer a todos os que me ajudaram na realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor Oldemiro de Aguiar do Rego por ter aceitado ser meu orientador e por ter proposto o tema deste trabalho.

Ao Dr. Rui Bessa e à Dra. Paula Portugal pela forma como me receberam e orientaram na realização deste trabalho, e a todos os técnicos, funcionários e colegas da Estação Zootécnica Nacional.

Ao senhor Paulo Caetano e funcionários da Granja Universitária, por todo o apoio na execução do trabalho experimental.

À assistente técnica, Maria Goretti Bettencourt, pelo apoio nas análises efectuadas no Laboratório de Nutrição do DCA-UA.

Aos técnicos do SERCLA, pela disponibilidade na realização das análises às amostras de leite.

Ao Laboratório Regional de Veterinária, na pessoa da Dra. Lídia Flor, e a todos os colegas pelo apoio.

À minha família por todo o apoio nos momentos de maior dificuldade.

Resumo

Com o objectivo de avaliar as mudanças no perfil dos ácidos gordos (AG) da gordura do leite, foram seleccionadas 8 vacas na fase média da lactação, da raça Holstein. Efectuou-se uma transição do pastoreio, suplementado com 5 kg de concentrado (Período I), para uma dieta composta por 60% de silagem de milho e por 40% de concentrado, com base na matéria seca (MS), designada de ração completa de mistura (RCM) (Período II), retomando à dieta inicial no Período III. A colheita de amostras e as medições foram realizadas no último dia do Período III (dia 10) e nos dias 2, 4, 7, 15 e 21 dos Períodos II e III.

A produção de leite e a ingestão de matéria seca (IMS) foram significativamente ($P < 0,001$) mais elevadas no Período II, relativamente aos Períodos I e III. O teor butiroso (TB) decresceu significativamente ($P < 0,001$) no Período II, enquanto o teor proteico (TP), a produção total de gordura (PG), a produção total de proteína (PP) e o peso vivo (PV), não apresentaram diferenças significativas entre períodos. No Período II (RCM) verificou-se um aumento extremamente rápido do conteúdo em ácidos gordos saturados (AGS), nomeadamente dos AG hipercolesterémicos (C12:0, C14:0 e C16:0) e do ácido linoleico, e um decréscimo dos ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA), principalmente do ácido linolénico, do ácido *trans*-vacénico (TVA) e dos conjugados do ácido linoleico (CLA), principalmente o ácido ruménico (AR). No Período III, quando os animais voltaram para a pastagem, verificou-se a situação inversa. A concentração do AR aumentou de 0.85 g/100 g de AG totais no Período II (RCM), para 1.58 g/100 g de AG totais no Período III (pastoreio). O TVA demonstrou a mesma tendência, aumentando de 1.84 para 3.09 g/100 g de AG totais do Período II para o Período III.

Abstract

This study was conducted to evaluate the effects on milk composition of transition from fresh grass diet to a total mixed ration (TMR), and from TMR diet to fresh grass. The changes in milk fatty acid profile for eight Holstein dairy cows in mid-lactation were followed via analysis of milk samples collected on day 10 of Period I, and on days 2, 4, 7, 15 and 21 of Periods II and III. Animals were fed fresh grass supplemented with 5 kg of concentrate in Periods I and III, and with a TMR composed of 60% of maize silage and 40% of concentrate, in Period II.

TMR feeding resulted in a significant ($P<0,001$) increase in milk production, as well as dry matter intake, compared with grass diet. Milk fat content decreased ($P<0,001$) with TMR diet, while, milk fat production, protein production, protein content and live weight, had no changes after transition. After the first transition, the unsaturated fatty acids increased, in particular C12:0, C14:0 and C16:0, as well as linoleic acid. Monounsaturated and polyunsaturated fatty acids decreased, with particular emphasis to *trans*-vaccenic acid (TVA) and conjugated linoleic acids (CLA), particularly, the rumenic acid. After the second transition, the opposite situation occurred. The concentration of rumenic acid almost doubled in Period III (1.58 g/100 g total fatty acids) compared with Period II (0.85 g/100 g total fatty acids). The TVA concentration also increased from 1.84 g/100 g total fatty acids in Period II, to 3.09 g/100 g total fatty acids, in Period III.

Lista de Abreviaturas

ADF – Fibra Insolúvel em Detergente Ácido
ADL – Fibra Insolúvel em H₂SO₄
AG – Ácidos Gordos
AGCL – Ácidos Gordos de Cadeia Longa
AGCM – Ácidos Gordos de Cadeia Média
AGI – Ácidos Gordos Insaturados
AGS – Ácidos Gordos Saturados
AGV – Ácidos Gordos Voláteis
AR – Ácido ruménico
CB – Cinza Bruta
CLA – Conjugados do Ácido Linoleico
CV – Coeficiente de variação
DCV – Doenças Cardiovasculares
DHA – Ácido Docosahexanóico
DPA – Ácido Docosapentanóico
EE – Extracto Etéreo
EM – Energia Metabolizável
EPA – Ácido Eicosapentanóico
EPM – Erro Padrão da Média
EZN – Estação Zootécnica Nacional
FID – Fire Ionization Detector
GC- Gas Chromatography
GM – Glândula Mamária
HDL – Lipoproteínas de Elevada Densidade
HPLC – High-performance Liquid Chromatography
IMS – Ingestão de Matéria Seca
mM - Milimol
mRNA – RNA mensageiro
MS – Matéria Seca
MUFA – Ácidos Gordos Monoinsaturados
N – Azoto
NDF – Fibra Insolúvel em Detergente Neutro

NEFA – Ácidos Gordos Não Esterificados Plasmáticos
OP – Óleo de Peixe
PB – Proteína Bruta
PG – Produção de Gordura
PL – Produção de Leite
PP – Produção de Proteína
PUFA – Ácidos Gordos Polinsaturados
PV – Peso Vivo
RCM – Ração Completa de Mistura
RNA - Ácido ribonucleico
SERCLAT – Serviço de Classificação de Leite da Ilha Terceira
TB – Teor Butiroso
TMR – Total mixed ration
TP – Teor Proteico
TVA – Ácido *trans*-vacénico
VLDL – Lipoproteínas de Muito Baixa Densidade

Índice Geral

Resumo	4
Abstract	5
Lista de Abreviaturas	6
Índice Geral	8
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
1. Introdução	11
2. A gordura do leite	12
2.1. Biossíntese da gordura do leite	15
2.2. Ácidos gordos de cadeia ímpar e ramificada	16
2.3. Conjugados do Ácido Linoleico (CLA)	20
2.3.1. Biohidrogenação ruminal e síntese endógena de CLA	21
2.3.2. Isomerização <i>cis/trans</i>	24
2.3.3. Actividade da Δ^9 desaturase na glândula mamária. Correlação entre CLA e TVA	28
2. 3.4. Propriedades benéficas do CLA para a saúde humana	30
2. 3.5. Conteúdo de CLA em alimentos destinados ao consumo humano	33
3. Influência de factores alimentares sobre o perfil dos AG da gordura do leite e do teor de CLA	38
3.1. Efeito da forragem basal no perfil dos AG da gordura do leite	40
3.1.1. Influência da pastagem no teor em CLA da gordura do leite ...	45
3.1.2. Efeito da adição de lípidos no perfil dos AG e no teor de CLA da gordura do leite	48
3.1.3. Óleos vegetais e sementes de oleaginosas	49
3.1.4. Efeitos dos óleos vegetais na concentração de CLA e de TVA	52
3.1.5. Óleos de peixe e de origem marinha	55
3.1.6. Efeito dos óleos de origem marinha na concentração de CLA e de TVA	57
3.2. Factores que influenciam os níveis de CLA da gordura do leite para além da dieta	61
CAPÍTULO II – TRABALHO EXPERIMENTAL	63
1. Material e Métodos	64
1.1. Animais	64
1.2. Alimentos	64
1.3. Delineamento experimental	65

1.4. Maneio e medições	65
1.5. Metodologia analítica	67
1.5.1. Análise química dos alimentos e do leite	67
1.5.2. Digestibilidade <i>in vitro</i> da pastagem e da RCM	68
1.5.3. Determinação quantitativa e qualitativa dos ácidos gordos em amostras de alimento e leite	68
1.5.3.1. Extração de lípidos em alimentos e em gordura de leite	68
1.5.3.2. Transesterificação (Metilação Básica)	70
1.5.4. Cromatografia Gasosa	71
1.5.5. Quantificação – cálculo e apresentação dos resultados da metilação básica	72
1.6. Análise Estatística	72
2. Resultados e Discussão	73
2.1. Composição química dos alimentos e dos seus AG	73
2.2. Ingestão e performance animal	74
2.3. Composição em AG da gordura do leite	77
3. Conclusões	97
CAPÍTULO III – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	98
ANEXO I	129

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. INTRODUÇÃO

O arquipélago dos Açores é uma região leiteira importante no contexto nacional, uma vez que é responsável actualmente por por 33 % da produção total de leite em Portugal. O clima atlântico temperado permite que o sistema de produção seja baseado na pastagem (Rego et al., 2008a). Um sistema de produção baseado na pastagem é vantajoso, porque aumenta a rentabilidade e reduz os custos (Clark e Kanneganti, 1998). Contudo, com o melhoramento genético dos animais, a dependência de alimentos compostos aumentou, pois a pastagem não assegura, por si só, todas as necessidades nutricionais das vacas leiteiras de alta produção (Kolver e Muller, 1998). A produção de pastagem no arquipélago não é uniforme durante todo o ano. Durante os períodos com défice de pastagem, principalmente no Inverno nas zonas altas e no Verão nas zonas baixas, os animais são suplementados também com forragens conservadas, sobretudo silagem de erva, produzida com a erva excedente da Primavera, mas também com silagem de milho. No continente português, as vacas leiteiras estão confinadas durante o ano inteiro e são alimentadas com dietas baseadas em silagens de milho e suplementadas com elevadas quantidades de concentrados (Rego et al., 2008a).

O cancro, a aterosclerose, a diabetes, as doenças cardiovasculares (DCV) e a obesidade são alguns dos problemas que actualmente preocupam a sociedade ocidental. Em 1997, as DCV foram responsáveis por 46% das mortes nos países desenvolvidos (WHO, 1998), constituindo a primeira causa de morte nestes países. A ingestão de gorduras está associada às lesões e à prevalência das DCV, e o tipo de lípidos ingeridos desempenha um papel importante no aumento da concentração plasmática de colesterol, constituindo uma das causas do desenvolvimento de lesões arterioscleróticas (Bessa, 1999), mas também o consumo de AG *trans* tem sido associado a um aumento do risco de ocorrência de DCV (ASCN/AIN Task Force on *Trans* Fatty Acids, 1996). Já em 1968, a primeira das oito recomendações feitas pelo “Committee on Nutrition of the American Heart Association” era para a redução da ingestão de gordura animal (Kritchevsky, 1998). Entre as restantes recomendações, incluíam-se a redução de gorduras saturadas e de colesterol, e o aumento da ingestão de AG insaturados (Bessa, 1999). Actualmente, as recomendações alimentares, apelam para uma ingestão moderada de gordura, e muitas vezes são particularmente restritivas no que respeita aos ácidos gordos saturados (AGS) e/ou à gordura de origem animal. No entanto, é

indiscutível que as gorduras da dieta contêm AG essenciais e vitaminas solúveis em gordura essenciais, que tornam a gordura numa componente essencial de uma dieta equilibrada. Tornou-se evidente nas últimas décadas, que estas recomendações ainda são contemporâneas. Um tópico de recomendações de especial interesse para a ciência de laticínios e para a indústria de laticínios, é o impacto na saúde dos AG *trans* de ocorrência natural, que são encontrados principalmente nas gorduras dos ruminantes. Apesar de uma vasta gama de isómeros de AG *trans* ocorrerem nessas gorduras, apenas alguns têm sido estudados exaustivamente, principalmente os Conjugados do Ácido Linoleico (CLA) (Van Wijlen e Colombani, 2010).

Os produtos edíveis dos ruminantes, nomeadamente a carne, o leite e os seus derivados, representam uma fracção significativa da dieta humana em muitos países e culturas (O'Donnell, 1989). Estes produtos são caracterizados pela sua gordura saturada, o que tem vindo a reduzir o interesse dos consumidores. No entanto, o leite, os produtos lácteos e as gorduras edíveis dos ruminantes são a maior fonte da dieta humana de C18:2 *cis*-9,*trans*-11, o principal isómero de CLA (Griinari e Bauman, 1999; Salminen, 1998), que está associado a vários efeitos benéficos para a saúde humana (Pariza, 1999). Os isómeros de CLA, pelas suas propriedades benéficas, principalmente por serem anticancerígenos (Ip et al., 1994a), poderão melhorar a imagem das gorduras dos ruminantes, perante a opinião pública (Bessa, 1999).

O leite produzido no arquipélago dos Açores é naturalmente enriquecido em CLA (Rego et al., 2008a). O leite e produtos lácteos produzidos nos Açores possuem um nível relativamente elevado em CLA, em especial no que respeita ao isómero *cis*-9,*trans*-11, afirmando-se, portanto, como boas fontes de CLA para a dieta humana (Pestana et al., 2009).

2. A GORDURA DO LEITE

Os lípidos do leite são constituídos principalmente por triacilglicerídeos e são sintetizados no retículo endoplasmático liso a partir de AG e glicerol, como gotas de variados tamanhos. Segundo Keenan e Patton (1995) e Mather e Keenan (1998), estas gotas são cobertas por uma membrana de lípidos polares e proteínas, e no leite de vaca, 99% ou mais do total de lípidos são encontrados nestas gotas (95% dos quais são triacilglicerídeos, com pequenas fracções de glicerídeos, esteróis, fosfolípidos, glicolípidos e glícidos).

Os AG são fundamentais à vida, pois são utilizados como fonte energética, servindo de mensageiros químicos intracelulares (Bessa, 1999). Servem de precursores na síntese de eicosanóides e estão envolvidos na regulação metabólica, na modelação imunitária e na regulação homeoviscosa das membranas celulares (Wahle e James, 1983; Spector e Yorek, 1985).

Quadro 1 – Ácidos gordos mais comuns de origem animal e vegetal (adaptado de Christie, 1994).

Nome Sistemático	Nome Comum	Designação Estenográfica
AG Saturados		
etanóico	acético	2:0
butanóico	butírico	4:0
hexanóico	caprónico	6:0
octanóico	caprílico	8:0
decanóico	cáprico	10:0
dodecanóico	láurico	12:0
tetradecanóico	mirístico	14:0
hexadecanóico	palmítico	16:0
octadecanóico	esteárico	18:0
eicosanóico	araquídico	20:0
docosanóico	beénico	22:0
AG Monoenóicos		
<i>cis</i> -9-hexadecenóico	palmitoleico	16:1(<i>n</i> -7)
<i>cis</i> -6-octadecenóico	petrosilínico	18:1(<i>n</i> -12)
<i>cis</i> -9-octadecenóico	oleico	18:1(<i>n</i> -9)
<i>cis</i> -11-octadecenóico	<i>cis</i> -vacénico	18:1(<i>n</i> -7)
<i>cis</i> -13-docosenóico	erúcico	22:1(<i>n</i> -9)
<i>cis</i> -15-tetracosenóico	nervónico	24:1(<i>n</i> -9)
AG Polinsaturados *		
9,12-octadecadienóico	linoleico	18:2(<i>n</i> -6)
6,9,12-octadecatrienóico	γ -linolénico	18:3(<i>n</i> -6)
9,12,15-octadecatrienóico	α -linolénico	18:3(<i>n</i> -3)
5,8,11,14-eicosatetraenóico	araquidónico	20:4(<i>n</i> -6)
5,8,11,14,17-eicosapentaenóico	EPA	20:5(<i>n</i> -3)
4,7,10,13,16,19-docosaheptaenóico	DHA	22:6(<i>n</i> -3)

* Todas as duplas ligações são da configuração *cis*.

A gordura do leite dos ruminantes possui AG com 4 a 22 átomos de carbono (Goff, 1999), e estima-se que existam mais de 400 AG (Bauman e Griinari, 2001). A gordura do leite contém em média 66% de AG saturados, 30% monoinsaturados e 4% polinsaturados (USDA, 2003). Esta relação é muito complexa e varia com a alteração de muitos factores, principalmente alimentares e fisiológicos (Bauman e Griinari, 2001). A composição em AG influencia as propriedades organolépticas, nutricionais e físicas do leite (Grummer, 1991; Chilliard et al., 2001) e as características de fabrico dos seus derivados (Jensen et al., 1991).

Segundo Bessa (1999), a classificação clássica de AG pelo seu grau de saturação, como é descrito no Quadro 1, à luz dos conceitos actuais, mostra-se desajustada e penalizadora para as gorduras produzidas pelos ruminantes. Foi necessário introduzir um critério mais funcional em termos nutricionais, dando origem à separação em 3 classes, segundo o efeito dos AG no metabolismo do colesterol: hipercolesterémicos, hipocolesterémicos e de efeito neutro (Quadro 2) (Bessa, 1999).

Um novo parâmetro de valorização nutricional dos alimentos foi introduzido na década de noventa, pela proporção entre AG da família n-3 e n-6 (Holman, 1998). Normalmente, a relação n-6/n-3 das gorduras corporais de ruminantes, principalmente os produzidos em sistemas extensivos (Nurnberg et al., 1998; Enser et al., 1998), é inferior à relação recomendada para a dieta (1: 4). Com excepção do pescado e dos legumes verdes, os restantes alimentos que servem de base à alimentação humana (cereais, oleaginosas, carnes de suínos e aves), são muito desequilibrados naquele rácio, o que valoriza a carne e o leite de ovino e de bovino, produzidas em regimes extensivos, pois possuem uma relação n-6/n-3 baixa, e portanto favorável a um maior equilíbrio da dieta (Bessa, 1999).

Baseado nas recomendações dietéticas actuais, nutricionalmente, a gordura ideal seria composta por 8% de AGS, aproximadamente 82% de AG monoinsaturados e 10% de AG polinsaturados, incluindo ácidos ómega-3 e n-6 (O'Donnell, 1989).

Quadro 2 – Classificações nutricionais dos ácidos gordos (adaptado de Bessa, 1999).

Classificação Estrutural		Classificação Funcional	
Saturados	C4:0 a C10:0	Hipercolesterémicos	C12:0; C14:0; C16:0
	C12:0; C14:0; C16:0		C14:1; e C16:1
	C18:0	Neutros	C4:0 a C10:0
	C20:0 a C22:0		C18:0
			C18:1 <i>trans</i>
Monoinsaturados	C14:1	Hipocolesterémicos	C18:1 <i>cis</i> -9
	C16:1		C18:2 <i>cis</i> -9,12
	C18:1		C18:3 <i>cis</i> -9,12,15
	C20:1		PUFA n-3 e n-6
Polinsaturados	C18:2	Outros (residual)	AG ramificados
	C18:3		C15:0; C17:0
	PUFA n-3 e n-6		C18:1 <i>cis</i>
			C18:2 isómeros
			AG não identificados

PUFA – ácidos gordos polinsaturados

Actualmente, os consumidores já não escolhem o leite, e os alimentos em geral, apenas a pensar no preço e no sabor, mas sim a pensar numa alimentação saudável. A adaptação do perfil dos AG da gordura dos produtos edíveis dos ruminantes, a nível dos ácidos gordos insaturados (AGI), às exigências dos consumidores, é um facto a ter em conta nos nossos dias, pelos produtores agrícolas e pelas indústrias de transformação.

2.1 Biossíntese da gordura do leite

Cerca de 40% da gordura do leite é sintetizada *de novo* na glândula mamária (GM), tendo como precursores o aceto-acetato e o β -hidroxibutirato (Barber et al., 1997). O β -hidroxibutirato é formado a partir do butirato, na parede do rúmen, e juntamente com o acetato são os precursores dos AG de cadeia curta (AGCC) e de cadeia média (AGCM) presentes no leite.

Existem duas enzimas fundamentais para a síntese *de novo* na GM, a acetil-CoA carboxilase e a sintetase de ácidos gordos. A primeira, catalisa a formação do malonil-CoA a partir do acetato, e a segunda catalisa ciclos de condensação do malonil-CoA com acetil-CoA ou com butiril-CoA, provenientes do metabolismo do acetato e do β -hidroxibutirato, respectivamente (Barber et al., 1997). Como resultado final desta cadeia de reacções, forma-se C14:0 e sobretudo C16:0. A formação de AG com mais de 16 carbonos não é possível na GM dos ruminantes, porque ao contrário do que acontece noutros tecidos, esta não consegue converter C16:0 em C18:0 por alongamento da cadeia (Chilliard et al., 2000). A maioria dos AG provenientes da síntese *de novo* na GM são AGCC e AGCM saturados, porque a enzima Δ^9 desaturase tem menor actividade sobre estes AG, embora haja alguma desaturação de C14:0 e C16:0 em C14:1 e C16:1, respectivamente.

Os restantes 60% da gordura do leite, os AG de cadeia longa (AGCL), são sintetizados a partir de AG da corrente sanguínea provenientes da dieta (Barber et al., 1997), que estão sob a forma de triglicerídeos associados a lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), ou a partir dos AG não esterificados plasmáticos (NEFA). A lipoproteína lipase é uma enzima extremamente activa nos ruminantes em lactação, cuja presença é necessária na GM, para possibilitar a utilização dos triglicerídeos associados às VLDL (Barber et al., 1997). A actividade desta enzima é elevada na GM dos ruminantes em lactação (Chilliard et al., 1986), excepto quando a sua concentração

plasmática é demasiado elevada (acima de 0,4 mM) (Baldwin et al., 1980), tornando-se limitante.

A utilização dos NEFA está dependente da mobilização das reservas lipídicas e é proporcional à sua concentração no plasma sanguíneo (Chilliard et al., 1984). A disponibilidade dos NEFA é maior quando a vaca está em balanço energético negativo, ou seja, no início da lactação ou em situações de défice alimentar. As vacas em pastoreio recorrem às reservas corporais, quando a ingestão de energia é um factor limitante para a produção de leite (Kolver e Muller, 1998). Consoante a dieta do animal e a localização das reservas corporais, os AG acumulados no tecido adiposo, sob a forma de triglicéridos de reserva, são principalmente C16:0, C18:0, C18:1 *cis*-9 e, em menor quantidade, C14:0, C16:1 *cis*-9, C17:0, C18:1 *trans*-11, entre outros (Bas et al., 1987).

Os AGCL, com mais de 18 átomos de carbono, são potentes inibidores da síntese de AG na GM, através de um efeito inibitório directo sobre a actividade da enzima acetil-CoA carboxilase (Barber et al., 1997). Então, quando estes AG estão disponíveis, há um decréscimo na percentagem de AGCC e AGCM (C8:0 a C14:0 ou 16:0) na gordura do leite (Chilliard et al., 1986). Este facto deve-se ao efeito de diluição provocado pelo aumento de secreção de AGCL e à diminuição da síntese *de novo* na GM (Chilliard et al., 2000). De acordo com estes autores, quanto maior o grau de saturação e o número de átomos de carbono dos AG, maior a inibição, e segundo os mesmos, os isómeros *trans* do ácido oleico e os isómeros de CLA são possíveis inibidores da síntese de gordura do leite. Para além destes efeitos inibidores, Doreau et al. (1999) apontaram outros factores para a diminuição da síntese de AG na GM: pouca disponibilidade de substratos, como por exemplo acetato e β -hidroxibutirato, redução da ingestão voluntária provocada pela suplementação com lípidos, e a ingestão de lípidos insaturados, que provoca um decréscimo no rácio acetato:propionato.

2.2. Ácidos gordos de cadeia ímpar e de cadeia ramificada

Os ácidos gordos de cadeia ímpar e ramificada (AGCIR) encontram-se em quantidade significativa no tecido adiposo e no leite de espécies ruminantes (Diedrich e Hanschel, 1990; Polidori et al., 1993).

Estudos *in vitro* demonstraram actividade dos AG *iso* e *anteiso* contra células mamárias cancerígenas humanas, comprovando que estes AG possuem propriedades

anticancerígenas e a sua cito-toxicidade é comparável à do ácido ruménico (Wongtangintharn et al., 2004).

A principal origem dos AGCIR está nas bactérias do retículo-rúmen (Keeney et al., 1962). A síntese *de novo* destes AG por bactérias ruminais é mediada por dois tipos de sistemas enzimáticos: sintetase de AG de cadeia linear e sintetase de AG de cadeia ramificada (Kaneda, 1991). Os AG de cadeia linear ímpar de origem microbiana (15:0 e 17:0) são formados através do alongamento do propionato ou do valerato. Estes AG, assim como os seus isómeros *anteiso* podem ser sintetizados *de novo* na GM através da incorporação, respectivamente, de propionil-CoA em vez de acetil-CoA e de metilmalonil-CoA em vez de malonil-CoA (Smith, 1994). Os precursores dos AG de cadeia ramificada são aminoácidos de cadeia ramificada e os seus ácidos carboxílicos de cadeia curta ramificada correspondentes. Formam-se três séries de AG ramificados: *iso* ácidos de cadeia par (*iso* C14:0 e *iso* C16:0), *iso* ácidos de cadeia ímpar (*iso*-15:0 e *iso*-17:0) e *anteiso* ácidos de cadeia ímpar (*anteiso*-15:0, *anteiso*-17:0) (Kaneda, 1991).

O trabalho de revisão de Cardoso (2007) concluiu que os AG de cadeia ímpar ramificada são os mais representativos dos AGCIR da gordura do leite, seguidos dos AG *anteiso*. Os AG ramificados em C15:0 são mais representativos do que os outros AG ramificados em C13:0, C14:0, C16:0 e C17:0, verificando-se uma maior variação nas concentrações destes AG (CV>20%, os AG *iso* C13:0 e C17:0 atingem coeficientes de variação superiores a 50%), comparativamente aos AG de cadeia linear ímpar e os *anteiso* C15:0 (CV<20%).

As diferenças verificadas no perfil de AGCIR produzidos pelas diferentes estirpes de bactérias, possibilitam determinar a composição da população microbiana do retículo-rúmen (Cardoso, 2007). Por sua vez, o tipo de população microbiana é influenciado pelo tipo de dieta. A % de fibra-NDF da dieta correlaciona-se positivamente com os AG ramificados de cadeia par ou ímpar presentes na gordura do leite, com exceção do *iso* C17:0. Pelo contrário, a % de amido na dieta correlaciona-se negativamente com os mesmos AG, com exceção do *iso* C17:0 (Vlaeminck et al., 2006). A % de proteína bruta (PB) da dieta correlaciona-se negativamente com todos os AGCIR, com exceção dos *iso* C14:0, *iso* C16:0 e C15:0. A correlação negativa da %PB com o *anteiso* C17:0 é muito forte.

O aumento do rácio forragem:concentrado (F:C) está associado a um incremento na concentração dos AGCIR na gordura do leite. As variações encontradas na concentração de AG *iso* e *anteiso* na gordura do leite reflectem as diferenças nas

populações bacterianas do rúmen, induzidas por variações no rácio F:C da dieta. Genericamente, quando este rácio diminui, aumenta a importância relativa da flora amilolítica e diminui a flora celulolítica (Oshio et al., 1987). Um aumento da flora celulolítica está associado a um aumento nos AG *iso*, enquanto um incremento na flora amilolítica está associado ao aumento dos AG *anteiso* e ou de cadeia linear ímpar (Vlaeminck et al., 2006).

As diferenças na concentração dos AGCIR na gordura do leite reflectem as diferenças nos substratos para fermentação e as diferenças no ecossistema ruminal. A substituição de silagem de erva por silagem de milho na dieta aumenta a ingestão de amido e diminui a ingestão de fibra NDF, alterando substancialmente o pH do rúmen, a população microbiana presente e as proporções de ácidos gordos voláteis produzidos (Cardoso, 2007). Nielsen et al. (2004) e Shingfield et al. (2005) verificaram que a substituição de silagem de erva por silagem de milho na dieta provocou uma diminuição da concentração dos AG *iso* C14:0 e *iso* C15:0 na gordura do leite. Estes efeitos são semelhantes aos verificados quando ocorre uma diminuição do rácio F:C, o que sugere que a inclusão de silagem de milho na dieta provoca um aumento da proporção de bactérias amilolíticas no rúmen e ou ocorre uma reacção da microbiota a estímulos stressantes (abaixamento do pH).

A síntese de proteína microbiana é mais eficiente energeticamente com dietas baseadas em silagem de milho, do que com dietas baseadas em silagem de erva, aumentando a concentração do AG *iso* C17:0. Este AG é um bom indicador da síntese de proteína microbiana (Vlaeminck et al., 2006). Cabrita et al. (2003) estabeleceram uma relação negativa entre o nível de PB na dieta e as concentrações de AG *iso* e *anteiso* C17:0 no leite. Os resultados obtidos por Nielsen et al. (2004) e Shingfield et al. (2005) estão de acordo com estes autores, pois a substituição da silagem de erva por silagem de milho (mais pobre em PB) na dieta provocou um aumento na concentração de AG *iso* C17:0 e *anteiso* C17:0 e uma diminuição na concentração de AG *iso* C14:0, *iso* C15:0, C15:0 e C17:0 na gordura do leite. Vlaeminck et al. (2006) verificaram resultados opostos, explicados pela presença de diferentes proporções de propionato no licor de rúmen entre ensaios, e pela dupla origem destes AG (microflora ruminal e síntese *de novo* na glândula mamária).

A suplementação de vacas leiteiras com AG de cadeia longa polinsaturados afecta a bactérias do rúmen, embora as bactérias celulolíticas sejam mais penalizadas no seu crescimento do que as bactérias amilolíticas (Maczulac et al., 1981). A gordura do

leite de vacas em pastoreio suplementadas com óleos vegetais ricos em ácido linoleico (Rego et al., 2005b) e ácido linolénico (Collomb et al., 2004b; Loor et al., 2005a; Rego et al., 2009) apresentou proporções mais baixas de AGCIR, enquanto a suplementação com óleo de peixe (OP) (Shingfield et al., 2003) ou com algas marinhas (Singh et al., 2004) aumentou a concentração destes AG. De acordo com a revisão de Vlaeminck et al. (2006) a suplementação de vacas em pastoreio com óleos vegetais ricos em ácido linoleico e ácido linolénico fez decrescer, significativamente, a concentração total de AGCIR, fez decrescer ligeiramente a concentração dos AG ramificados *iso* de cadeia par e *iso* de cadeia ímpar (mais o ácido linoleico), sem afectar os AG ramificados *anteiso* e os AG lineares de cadeia ímpar. A concentração dos AG ramificados *iso* de cadeia ímpar aumentou em função do grau de insaturação dos AG da dieta. Pelo contrário, a suplementação com OP e de algas aumentou a concentração total de AGCIR, diminuiu em 60%, em média, a concentração dos AG *iso* de cadeia par, sem afectar significativamente a concentração dos AG ramificados *anteiso* e de cadeia linear ímpar.

É um dado adquirido que o aumento de AG na dieta inibe a síntese *de novo* pelos microrganismos do rúmen (Emmanuel, 1978), o que explica as correlações negativas entre os AGCIR e os AG totais da dieta, com excepção do *iso* C17:0 (Vlaeminck et al., 2006). Os seus resultados demonstram que um aumento da concentração de *iso* C17:0 é acompanhado por um decréscimo na concentração de C18:0 e um incremento da maioria dos isómeros *trans* C18:0. De acordo com Harfoot e Hazlewood (1997), as bactérias do rúmen envolvidas na biohidrogenação dividem-se em dois Grupos: A e B. As bactérias do grupo A actuam sobre os AG polinsaturados da dieta até à formação de *trans* mono isómeros (sobretudo, C18:1 *trans*-11), enquanto as bactérias do grupo B hidrogenam estes AG até à obtenção do produto final, C18:0. Estas correlações sugerem que as condições ruminais que favorecem a síntese de *iso* C17:0, são desfavoráveis às bactérias do grupo B, como é sugerido pelo decréscimo na concentração de *iso* C14:0 no leite e no rúmen. O *iso* C17:0 está correlacionado positivamente com o C18:0 e negativamente com o C18:1 (Kalscheur et al., 1997).

A suplementação com OP inibe o desenvolvimento das bactérias do grupo B, favorecendo a acumulação do C18:1 *trans*-11 no rúmen (Wonsil et al., 1994) e no leite (Rego et al., 2004). A concentração de C18:0 decresce na gordura do leite quando o amido aumenta na dieta, por exemplo quando a silagem de milho substitui a silagem de

erva (Nielsen et al., 2004; Shingfield et al., 2005). Logo, o incremento de amido na dieta inibe as bactérias do grupo B.

2.3. Conjugados do Ácido Linoleico (CLA)

O termo Conjugados do Ácido Linoleico (CLA) é usado para descrever um conjunto de isómeros, posicionais e geométricos, do ácido octadecadienóico, com ligações duplas conjugadas. Estes isómeros têm origem na biohidrogenação incompleta do ácido linoleico no rúmen (Ha et al., 1987; Kelly et al., 1998b; Solomon et al., 2000). Os isómeros de CLA possuem duplas ligações conjugadas, que aparecem principalmente nas posições 9 e 11, 10 e 12 ou 11 e 13, e são encontrados em todas as possíveis combinações *cis* e *trans* (Ha et al., 1987; Martin e Valeille, 2002).

Foi descrito um grupo de 24 isómeros diferentes de CLA, que ocorrem naturalmente, especialmente na gordura de ruminantes (Cruz-Hernandez, et al., 2004). Os isómeros mais comuns, em produtos que contêm CLA, são o C18:2 *cis*-9,*trans*-11 e o C18:2 *trans*-10,*cis*-12 (Berven et al., 2000). O C18:2 *cis*-9,*trans*-11 é o isómero do CLA mais abundantemente encontrado na gordura do leite (Parodi, 1977; Griinari e Bauman, 1999; Rego et al., 2005a, 2009). O segundo isómero de CLA mais representativo na gordura do leite é o *trans*-7,*cis*-9 (Secchiari et al., 2003; Alfaia et al., 2007; Bauman et al., 2007). O isómero *trans*-10,*cis*-12 é um dos três maiores isómeros de CLA presentes no conteúdo ruminal (Fellner et al., 1997).

A actividade biológica do CLA não é restrita ao isómero C18:2 *cis*-9,*trans*-11 (Bessa et al., 2000), mas este é considerado o mais activo biologicamente, por ser predominantemente incorporado na membrana de fosfolípidos (Ha et al., 1990).

Em contraste com a nomenclatura puramente química, onde alguns isómeros de CLA são claramente definidos como AG *trans*, algumas opiniões em relação à rotulagem dos produtos alimentares são conflitantes. Embora, de acordo com a Comissão Codex Alimentarius (organismo da FAO/WHO, que tem como objectivo desenvolver normas alimentares, orientações e textos relacionados) os AG *trans* com duplas ligações conjugadas, como o CLA, estão excluídos da definição de AG *trans* (Comissão do Codex Alimentarius, 2006), algumas organizações (como a Agência Francesa de Segurança Alimentar) propuseram não haver distinção entre os AG *trans*, incluindo assim todos os isómeros *trans* do CLA (Ledoux et al., 2007; Léger et al., 2007).

2.3.1. Biohidrogenação ruminal e síntese endógena de CLA

A Figura 1.1 mostra a sequência da biohidrogenação do ácido linoleico, até à formação do ácido esteárico, que envolve pelo menos dois passos e duas populações distintas de bactérias ruminais (Harfoot e Hazlewood, 1988). Os isómeros *trans*-octadecenóicos foram identificados como intermediários da biohidrogenação ruminal (Shorland et al., 1957). Kepler et al. (1966) identificaram o isómero C18:2 *cis*-9,*trans*-11, também conhecido como ácido ruménico (AR), como sendo o primeiro intermediário da biohidrogenação do ácido linoleico pela bactéria ruminal *Butyrivibrio fibrisolvens*. As isomerases iniciais que catalisam a transformação do ácido linoleico em AR, só actuam em ácidos não esterificados (radical COOH livre) (Kepler et al., 1970). Isto implica que haja lipólise de galactolípidos, fosfolípidos e triacilglicerídeos da dieta antes da isomerização (Bessa et al., 2000). A biohidrogenação começa com a isomerização do ácido linoleico a C18:2 *cis*-9,*trans*-11 e é seguida pela hidrogenação da dupla ligação *cis* deste dieno conjugado a um ácido *trans* monoenóico (Kepler et al., 1966).

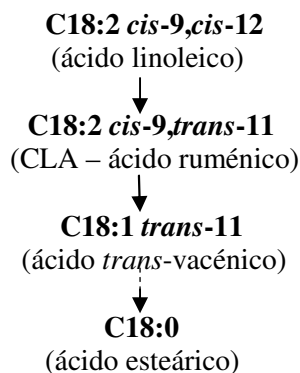


Figura 1.1 – Vias de biohidrogenação do ácido linoleico no retículo-rúmen. (adaptado de Harfoot e Hazlewood, 1988).

Paralelamente, a dupla ligação conjugada *cis* dos ácidos α - e γ -linoleico é hidrogenada depois da isomerização inicial da dupla ligação *cis*-12 (Figura 2.1) (Griinari e Bauman, 1999). O TVA é um intermediário comum à biohidrogenação dos ácidos α - e γ -linolénico e ácido linoleico. A redução do TVA parece ser a etapa limitante à sequência completa da biohidrogenação dos ácidos gordos insaturados C18, uma vez que a biohidrogenação a ácido esteárico acontece em menor quantidade, o que provoca uma acumulação considerável de TVA no rúmen (Keeney, 1970).

Pressupondo que a síntese de CLA ocorria exclusivamente no rúmen, Kramer et al. (1998), propuseram o nome de ácido ruménico (AR) para o isómero conjugado C18:2 *cis-9,trans-11*. Embora o nome “ácido ruménico” sugira que o rúmen é o local de maior produção de C18:2 *cis-9,trans-11*, na realidade apenas uma pequena proporção é produzida no rúmen, a partir da hidrogenação microbiana do ácido linoleico presente na dieta (Bauman et al., 2007; Kay et al., 2004; Palmquist et al., 2005).

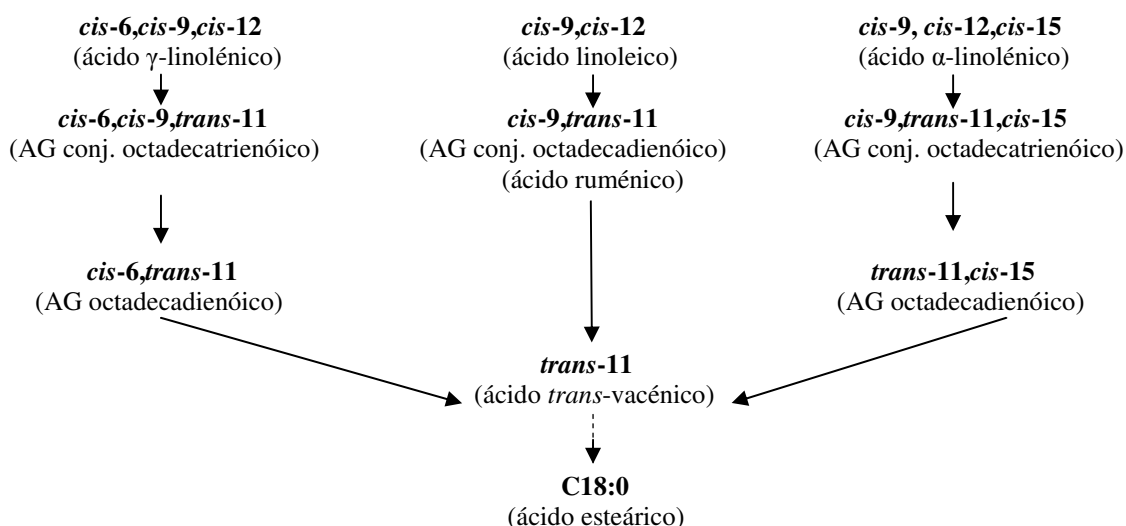


Figura 2.1 – Vias de biohidrogenação predominantes dos AG insaturados C18 (adaptado de Harfoot e Hazlewood, 1988).

Os níveis de AR na carne e no leite de ruminantes, comparados com os de não ruminantes, sugerem que existe uma relação muito próxima entre a função ruminal e estes níveis nos tecidos e na gordura do leite (Chin et al., 1992). Griinari e Bauman (1999) são de opinião que o AR não se acumula no rúmen em quantidades significativas e que a fracção absorvida no intestino delgado, não é suficiente para justificar as quantidades elevadas encontradas na gordura do leite e na carne dos ruminantes. Na verdade, uma pequena fracção de C18:2 *cis-9,trans-11* poderá ser produzida a nível das fermentações no intestino grosso, e uma fracção muito significativa tem origem no tecido adiposo, fígado, músculo e glândula mamária dos ruminantes (Griinari e Bauman, 1999; Raes et al., 2004; Bauman et al., 2007; Gruffat et al., 2008). No entanto, o AR é produzido em maior quantidade na glândula mamária, a partir da desaturação endógena de AG *trans*, principalmente de TVA proveniente da dieta, por acção da enzima Δ^9 desaturase (Schmid et al., 2006), a uma taxa de conversão de

aproximadamente 80% (Mosley et al., 2006b). Depois o AR é incorporado na gordura do leite e na gordura dos tecidos corporais (Griinari e Bauman, 1999). Diversos autores referem que o isómero C18:2 *cis*-9,*trans*-11 representa mais de 80% do total de CLA da gordura presente em diferentes alimentos (McLeod et al., 2004; Troegeler-Meynadier e Enjalbert, 2005). Collomb et al. (2006) referem que o AR, presente no leite e nos produtos lácteos compreende, geralmente, 75 a 90% do total de CLA. Chin et al. (1992) concluíram que mais de 90% do total de CLA presente na gordura do leite e mais de 75% do total de CLA na gordura da carne de bovino, estão sob a forma de AR. A Figura 3.1 representa o hipotético mecanismo de síntese tissular de AR a partir do precursor TVA.

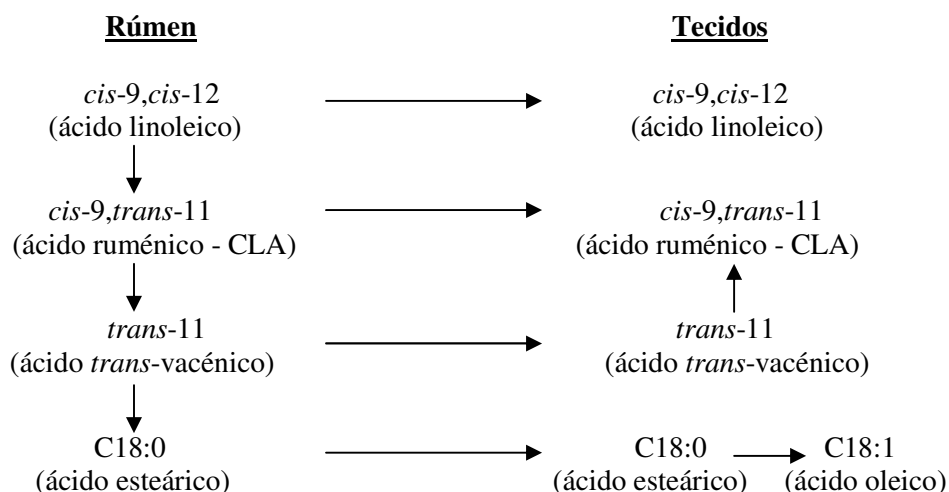


Figura 3.1 – Mecanismos de síntese ruminal e tissular de CLA (adaptado de Griinari e Bauman, 1999).

No intuito de fundamentar esta hipótese foram efectuados vários estudos. A infusão no abomaso de C18:1 *trans*-11 e C18:1 *trans*-12, em vacas leiteiras, originou um aumento da concentração de AR no leite, tal como de C18:2 *cis*-9,*trans*-12, que previamente não existiam (Corl et al., 1998). Griinari e Bauman (1999) também constataram um enriquecimento significativo do leite em AR, após uma infusão pós-ruminal de TVA em vacas leiteiras.

Foi verificada uma relação linear entre o AR e o TVA na gordura do leite e da carne (Chilliard e Ferlay, 2004; Nuernberg et al., 2005). De acordo com Tricon et al. (2006) foi observado um rácio TVA:AR de 3:1 no leite, manteiga e queijo de vacas alimentadas com uma dieta modificada para aumentar o teor de CLA no leite.

O CLA também pode ser sintetizado, igualmente a partir de TVA, em humanos (Salminen et al., 1998; Griinari e Bauman, 1999; Adlof et al., 2000; Turpeinen et al., 2002; Mosley et al., 2006a; Kuhnt et al., 2006), e em animais monogástricos, como por exemplo os suínos (Gläser et al., 2002). Ainda que exista evidência da formação de CLA e dos seus precursores pela microflora do cólon humano, a absorção de CLA a partir desta fonte é provavelmente insignificante (Devillard et al., 2007).

2.3.2. Isomerização *cis/trans*

Os AG *trans* são geralmente considerados perigosos para a saúde dos consumidores e, segundo as orientações da Organização Mundial de Saúde, a sua ingestão deve ser inferior a 1% da ingestão calórica (WHO, 2003). No entanto, 20% do TVA pode ser convertido em CLA *cis-9,trans-11* nos humanos (Turpeinen et al., 2002). Além disso, estudos recentes sugerem que manteigas ricas em TVA (e CLA *cis-9,trans-11*) têm efeitos neutros nos lípidos do plasma e na indução da aterosclerose em coelhos, enquanto manteigas enriquecidas em C18:1 *trans-10* mostraram efeitos negativos para a saúde (Roy et al., 2007).

As vias metabólicas representadas na Figura 2.1 não demonstram a diversidade de ácidos *trans*-octadecenóicos encontrados no rúmen e nos lípidos tissulares (Griinari e Bauman, 1999). Foram encontrados diversos isómeros octadecenóicos (Quadro 3) e octadecadienóicos no retículo-rúmen e na gordura produzida pelos ruminantes, o que reflecte a extrema diversidade biológica do ecossistema retículo-ruminal (Bessa, 1999; Bessa et al., 2000). Análises efectuadas demonstraram a presença de isómeros de ácidos *trans*-octadecenóicos em que as duplas ligações são localizadas em todas as posições desde $\Delta 4$ a $\Delta 16$ (Parodi, 1976; Molkentin e Precht, 1995; Griinari et al., 1998a). Foi sugerido que a formação destes isómeros posicionais *trans* dos ácidos octadecenóicos resultasse da migração de duplas ligações (Shorland et al., 1957; Dawson e Kemp, 1970; Seltzer, 1972). Uma explicação alternativa para a grande quantidade destes isómeros no rúmen seria o facto das bactérias ruminais possuírem várias isomerases *cis, trans* específicas (Ha et al., 1989; Yurawecz et al., 1998).

Apenas algumas espécies bacterianas ruminais foram isoladas e segundo Harfoot e Hazlewood (1988), demonstraram capacidade para isomerizar duplas ligações *cis* de AG insaturados para formar sistemas de duplas ligações *cis/trans* conjugadas e, posteriormente, hidrogenar estes ácidos conjugados. A *Butyrivibrio fibrisolvens*, e a maioria das bactérias que participam na biohidrogenação, não são capazes de hidrogenar

ácidos monoenoícos. No retículo-rúmen, apenas três estirpes bacterianas foram capazes de hidrogenar o C18:1 *trans*-11 e o C18:1 *cis*-9, produzindo ácido esteárico (Harfoot e Hazlewood, 1988).

Quadro 3 – Proporção de isómeros *cis* e *trans* octadecenóicos na gordura de leite de vaca (manteiga)* (adaptado de Wolff et al., 1995).

Isómeros <i>trans</i>	% total de isómeros <i>trans</i>	Isómeros <i>cis</i>	% total de isómeros <i>cis</i>
<i>trans</i> -8	1,5	<i>cis</i> -8	0,5
<i>trans</i> -9	13,6	<i>cis</i> -9	94,0
<i>trans</i> -10	6,4	<i>cis</i> -10	0,2
<i>trans</i> -11	64,4	<i>cis</i> -11	4,2
<i>trans</i> -12	2,4	<i>cis</i> -12	0,1
<i>trans</i> -13	2,3	<i>cis</i> -13	0,5
<i>trans</i> -14	3,6	<i>cis</i> -14	0,1
<i>trans</i> -15	2,3		
<i>trans</i> -16	3,0		

* Há variações sazonais.

Estudos com culturas puras de bactérias ruminais também evidenciaram isomerases com uma actividade específica. Estas bactérias isomerizaram duplas ligações *cis* com ou sem a migração de duplas ligações associada (Griinari e Bauman, 1999). White et al. (1970) isolaram uma bactéria ruminal de ovelha, que cresceu numa cultura com ácido linoleico, obtendo como produto final ácidos octadecenóicos. O isómero predominante foi o *cis*-15 (83%) e os restantes foram *trans*-15 (12%), *trans*-14 (4%) e *trans*-13 (1%). A mera existência destes isómeros sugere que o rúmen é populado por bactérias que possuem várias isomerases específicas diferentes (Griinari e Bauman, 1999).

O perfil, relativamente constante, de ácidos *trans*-octadecenóicos encontrados na gordura da carne e do leite dos ruminantes (Wolff, 1995), sugere a existência de uma população de bactérias ruminais relativamente estável, associada a actividades enzimáticas que envolvem a biohidrogenação de AG (Griinari e Bauman, 1999). A mudança do perfil dos AG e do perfil de isómeros CLA na gordura do leite está associada a alterações ambientais no rúmen, provocadas por baixos níveis de fibra na dieta e é caracterizado por um nível elevado de isómero *trans*-10,*cis*-12 (Griinari et al., 1998a), associado a quebras na gordura do leite. Quando ocorrem mudanças na dieta, o isómero *trans*-octadecenóico predominante na gordura do leite passa a ser o *trans*-10 octadecenóico. Foi sugerido por Bauman et al. (1998) que os efeitos depressivos do CLA na síntese da gordura do leite e na gordura corporal podem ser devidos a isómeros que possuem a dupla ligação *trans*-10. Griinari e Bauman (1999) sugerem que a

formação do isómero *trans*-10, presumivelmente, envolve uma isomerase específica *cis*-9,*trans*-10, com a formação de uma dupla ligação conjugada *trans*-10,*cis*-12, como primeira reacção (Figura 4.1).

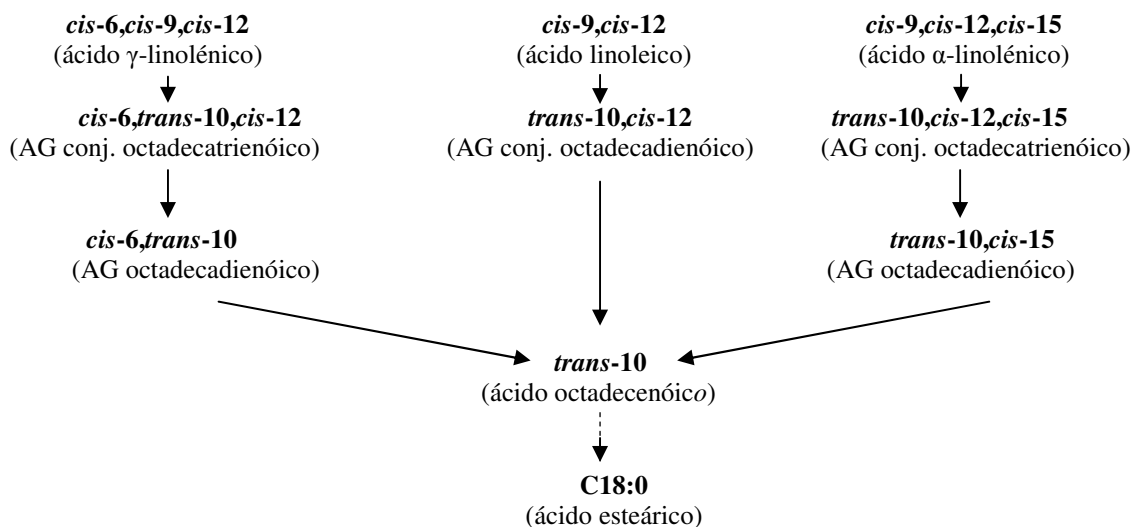


Figura 4.1 – Vias de biohidrogenação ruminal propostas dos AG insaturados C18, envolvendo a isomerase *cis*-9,*trans*-10 (adaptado de Griinari e Bauman, 1999).

Harvatine et al. (2009) puseram a hipótese de alguns intermediários da biohidrogenação ruminal serem os agentes causadores da depressão da gordura do leite. Alterações na biohidrogenação ruminal, caracterizadas pelo aumento da isomerização pela isomerase *cis*-9,*trans*-10, foram associadas a uma redução drástica na síntese da gordura do leite. Uma infusão pós-ruminal de uma mistura de isómeros de CLA em vacas leiteiras provocou uma redução na síntese de gordura do leite (Loor e Herbein, 1998; Chouinard et al., 1999b). Park et al. (1999a) verificaram também alterações na composição corporal, nomeadamente uma redução notável da gordura em relação à composição proteica, associada ao isómero *trans*-10,*cis*-12. Mais tarde, Baumgard et al. (2000) provaram que este isómero é responsável pela depressão do teor butíroso do leite, e que tem actividade biológica, principalmente na inibição da síntese *de novo* (Griinari et al., 2000). Warren et al. (2003) verificaram dilatação e fígado gordo em ratos devido aos efeitos do isómero *trans*-10,*cis*-12.

Rego et al. (2009) verificaram haver uma correlação negativa entre a gordura do leite e diversos isómeros C18:1 (*trans*-6/9, *cis*-11 e *cis*-13), C18:2 (*cis*-9,*trans*-13/*trans*-8,*cis*-13 e *cis*-9,*trans*-12/*trans*-8,*cis*-12), cujo efeito directo na depressão da gordura do leite é desconhecida. Kadegowda et al. (2008) relataram que os isómeros C18:1 *trans*-

10 e C18:2 *trans*-10,*cis*-12 têm sido consistentemente correlacionados negativamente com a gordura do leite. Rego et al. (2009) confirmou haver uma correlação negativa do C18:1 *trans*-10 com a gordura do leite, enquanto, neste estudo, não houve relação do C18:2 *trans*-10,*cis*-12 com a gordura do leite. Pelo contrário, Lock et al. (2007) verificaram haver um efeito directo do isómero C18:2 *trans*-10,*cis*-12 na depressão da gordura do leite, o que não aconteceu com o isómero C18:1 *trans*-10. Kadegowda et al. (2008) referiram que a concentração de C18:1 *trans*-10 obtida por Lock et al. (2007) foi muito abaixo do limiar esperado, para permitir a detecção dos seus efeitos na depressão da gordura do leite. Rego et al. (2009), verificaram que, apesar da percentagem de gordura do leite ter sido menor, pela acção de óleos vegetais, o efeito depressivo (-12%) esteve longe daquele registado para a depressão extrema do teor de gordura do leite (aproximadamente -50%). Além disso, as concentrações de C18:1 *trans*-10 e C18:2 *trans*-10,*cis*-12 foram baixas, indicando que nenhuma mudança expressiva ocorreu ao C18:1 *trans*-10 nas vias de biohidrogenação do rúmen. Estes autores sugeriram ainda, que os intermediários da biohidrogenação associados à ingestão de ácido linolénico, podem não ser os que mais contribuem para a inibição da síntese de gordura do leite, porque o óleo de linhaça, extremamente rico em ácido linolénico, deu origem a uma maior quantidade e diversidade de intermediários da biohidrogenação, sem diminuir a concentração da gordura do leite, como fizeram os óleos de girassol e de colza.

Rego et al. (2005b,c), detectaram correlações negativas significativas entre o teor de gordura do leite e a concentração no leite de TVA, CLA, EPA e DHA. Ahnadi et al. (2002) sugeriram que os OP reduzem a percentagem de gordura do leite, inibindo a expressão dos genes das enzimas lipogénicas da GM.

O padrão geral do perfil de intermediários da biohidrogenação da gordura do leite de vacas em pastoreio suplementadas com óleos vegetais reflecte as vias de metabolização ruminal dos ácidos oleico, linoleico e linolénico, e tem semelhanças com os intermediários da biohidrogenação encontrados no perfil da gordura do leite de vacas leiteiras em confinamento (Chilliard et al., 2007; Shingfield et al., 2008; Rego et al., 2009). Rego et al. (2009), verificaram que a concentração de quase todos os isómeros C18:1 aumentou, com a suplementação de óleo de colza, com excepção do C18:1 *trans*-11, o que pode ser explicado pela extensiva isomerização do ácido oleico. Estes dados são consistentes com os resultados obtidos *in vitro* com ácido oleico marcado (Mosley et al., 2002). Os resultados de Rego et al. (2009) suportam os dados que indicam que o TVA não é o produto principal da isomerização microbiana do ácido oleico.

A acção da Δ^9 desaturase nos isómeros C18:1 *trans* foi proposta por Corl et al. (2002) e por Looor et al. (2005b). O ácido oleico proveniente da dieta, em oposição aos ácidos linoleico e linolénico, aumentou consistentemente a concentração dos isómeros C18:1 *trans*-6, *trans*-7, *trans*-8 e o isómero CLA *trans*-7,*cis*-9 na gordura do leite (Secchiari et al., 2003; Collomb et al., 2004a). Rego et al. (2009), obtiveram 8,4% do total de isómeros CLA sob a forma de *trans*-7,*cis*-9 através da suplementação com óleo de colza, comparativamente aos 3% obtidos pelo controlo e pelos óleos de linhaça e de girassol. Corl et al. (2002) demonstraram que o isómero *trans*-7,*cis*-9, presente na gordura do leite, é originário, quase exclusivamente, da síntese *via* endógena por acção da Δ^9 desaturase no rúmen sobre derivados C18:1*trans*-7. Com excepção do isómero de CLA *trans*-7,*cis*-9, que é convertido a partir do C18:1 *trans*-7, todos os outros isómeros de CLA surgem, supostamente, da microflora ruminal por biohidrogenação (Collomb et al., 2004).

2.3.3. Actividade da Δ^9 desaturase na glândula mamária. Correlação entre CLA e TVA

O sistema desaturase é um sistema multienzimático que inclui a NADH-citocromo b₅ redutase, a acetil-CoA sintase, e a Δ^9 desaturase terminal (Ntambi, 1995). A Δ^9 desaturase é a enzima chave do sistema desaturase. Esta enzima introduz uma dupla ligação *cis* entre os carbonos 9 e 10 de diferentes substratos, entre os quais, o ácido octadecenóico *trans*-11 (TVA) (Pariza, 1999). Esta enzima afecta a composição em AG dos fosfolípidos e dos triglicéridos. Os seus efeitos na composição dos fosfolípidos são importantes para a manutenção da fluidez da membrana. Alterações da membrana têm sido associadas a uma série de estados de doença (Ntambi, 1995; Tocher et al., 1998). Da mesma forma, o padrão de AG da gordura do leite parece ser de especial importância na manutenção das características de fluidez da membrana que permitem a normal síntese e secreção da gordura do leite (Parodi, 1982).

Existem diferenças entre espécies e entre tecidos no que respeita à distribuição da Δ^9 desaturase. Nos roedores, os níveis e actividade de mRNA são mais elevados no fígado (Ntambi, 1995; Tocher et al., 1998). Nas ovelhas em crescimento e nos bovinos a quantidade de Δ^9 desaturase é substancialmente mais elevada no tecido adiposo, devido à abundância em mRNA e à grande actividade desta enzima (Cameron et al., 1994; Page et al., 1997). Isto sugere que o tecido adiposo é o sítio onde ocorre maior conversão de ácido octadecenóico *trans*-11 em CLA, nos ruminantes em crescimento. Durante a

lactação, é primariamente na glândula mamária que ocorre a síntese endógena de CLA. Nos ruminantes em lactação o tecido mamário tem uma actividade elevada de Δ^9 desaturase (Kinsella, 1972). As correlações positivas encontradas entre os AG C18:0 e C18:1 *cis*-9 e entre o TVA e o CLA, sugerem que existe uma acção extensiva da Δ^9 desaturase na GM (Rego et al., 2005b). Estudos de infusão pós-ruminal de TVA provaram que 75% do AR presente no leite tem origem endógena (GM), por acção da Δ^9 desaturase sobre o TVA (Baumgard et al., 2000).

Foram determinadas alterações na abundância do mRNA da Δ^9 desaturase em tecidos específicos de ovelhas em diferentes estados fisiológicos (Ward et al., 1998) e, com a aproximação do início da lactação, foram observados decréscimos na quantidade de mRNA no tecido adiposo, e um aumento no tecido mamário. O decréscimo dos rácios C16:1/C16:0 e C18:1/C18:0 na gordura do leite coincidiram com uma diminuição da actividade da enzima Δ^9 desaturase. Estes rácios são os indicadores da actividade desta enzima (Baumgard et al., 2000).

Ntambi (1995) e Tocher (1998) estudaram a regulação da Δ^9 desaturase em ratos e estabeleceram que a abundância de mRNA e a actividade enzimática desta enzima são respostas a alterações na dieta, ao balanço hormonal, ao estado fisiológico, e a outros factores inibidores e activadores. Estes estudos não abrangeram os ruminantes, mas as diferenças nos níveis de Δ^9 desaturase nos tecidos podem ajudar a explicar a variação individual no conteúdo em CLA da gordura do leite observada quando as vacas são alimentadas com a mesma dieta (Kelly et al., 1998a,b). Variações no conteúdo de CLA na gordura do leite de diferentes raças leiteiras podem ser associadas a diferenças na actividade da Δ^9 desaturase (Lawless et al., 1999). Contudo, as diferenças entre raças parecem menores, comparadas com as influências da dieta (Pariza, 1999).

A capacidade de desaturação da enzima Δ^9 desaturase é extremamente elevada na GM e graças a ela, cerca de 40% do ácido esteárico (C18:0) é desaturado, para formar mais de 50% do ácido oleico (C18:1) da gordura do leite (Bickerstaffe et al., 1974; Enjalbert et al., 1998). Como já foi referido anteriormente, é por acção desta enzima que ocorre a síntese de grande parte do isómero de AR presente na gordura do leite, a partir da desaturação do TVA, que é formado no rúmen e absorvido pelo intestino (Griinari e Bauman, 1999). Segundo Baumgard et al. (2000), cerca de 90% do total de TVA é transformado em ácido ruménico.

2.3.4. Propriedades benéficas do CLA para a saúde humana

O CLA está associado a certos efeitos benéficos para a saúde, como a redução da aterosclerose, a prevenção da diabetes e da obesidade (Pariza, 1999; Shingfield et al., 2008), possuindo também propriedades anticarcinogénicas (Ip et al., 1994a; Pariza et al., 2001). Para além disso, o CLA tem influência na diferenciação celular, no metabolismo lipídico (Bessa et al., 2000; Pariza et al., 2001), na composição corporal, na sensibilidade à insulina e diabetes, na imunomodulação, na formação e manutenção óssea e do sistema imunitário, no stress oxidativo e na inflamação (Whigham et al., 2000; Belury, 2002; Terpstra, 2004; Wahle et al., 2004; Bhattacharya et al., 2006).

Alguns problemas de segurança associados ao CLA (Belury, 2002; Bhattacharya et al., 2006; Wahle et al. 2004), especialmente o seu efeito sobre a composição corporal, têm sido alvos de atenção ultimamente (Close et al., 2007; Gaullier et al., 2005; Whigham et al., 2007). No entanto, devido ao grande número de isómeros do CLA possíveis, é difícil atribuir uma influência notada sobre o metabolismo humano apenas a um determinado isómero. A situação torna-se mais complicada devido ao facto de que os diferentes e múltiplos efeitos do CLA na saúde humana parecem estar relacionados com uma variedade de isómeros existente (Tricon e Yaqoob, 2006). Inicialmente, o interesse da comunidade científica no CLA deveu-se à descoberta acidental de actividade anticarcinogénica em extractos de carne (Pariza e Hargraves, 1985). Mais tarde Ha et al. (1987) isolaram os isómeros de CLA na carne e consideraram-nos responsáveis pela acção anticarcinogénica. Desde então, a acção inibitória do CLA foi demonstrada em modelos carcinogénicos quimicamente induzidos, incluindo em carcinomas a nível da epiderme (Ha et al., 1987; Belury et al., 1996), carcinomas mamários (Ip et al., 1991, 1994b; Thompson et al., 1997) e gastrointestinais (Ha et al., 1990; Liew et al., 1995). Para além disso, foi descoberto que o CLA afecta a composição da gordura corporal do corpo, diminuindo-a e aumentando a carne magra na massa corporal (Berven et al., 2000). O conhecimento dos efeitos benéficos dos CLA é somente baseado em resultados de estudos em modelos animais e diversas culturas de células *in vitro*. Os dados em humanos ainda são limitados (Berven et al., 2000; Wahle et al., 2004).

Pensa-se que parte do mecanismo envolve o CLA como antioxidante, protegendo a membrana de outros AG da oxidação. Os danos da oxidação nas membranas das células podem ser importantes na fase de promoção dos tumores a

carcinomas (Ip et al., 1994b). A dieta é um factor que contribui para o retrocesso ou o progresso de alguns tipos de cancro. Algumas substâncias químicas naturais da nossa dieta podem ter actividade anticarcinogénica e a sua maioria tem origem nas plantas. O CLA é encontrado, quase exclusivamente, em produtos edíveis dos ruminantes, e é o mais potente anticarcinogénico natural conhecido (Kelly e Bauman, 1996). O tipo de dieta está na origem de um terço das mortes causadas por cancro (Doll, 1992) e uma das estratégias de prevenção actualmente, tem sido o consumo de alimentos com propriedades anticarcinogénicas (Parodi, 1999). Os efeitos anticarcinogénicos do CLA ocorrem com baixas concentrações na dieta (Kelly et al., 1998b), até 0,05% (Kelly e Bauman, 1996). Um exemplo do efeito na incidência de tumores é demonstrado num estudo de Ip et al. (1994b), em que a redução de tumores mamários induzidos estava dependente da dose crescente na dieta dos níveis de CLA (0,1 a 1%). Segundo estes autores, a média de CLA ingerida pelos humanos, está próxima do nível que demonstra efeitos anticarcinogénicos, em modelos animais a nível experimental. Foi estimado, a partir de estudos com animais, que a ingestão de 1 g/dia de CLA seria eficiente na prevenção do cancro numa pessoa de 70 kg, tendo em conta o papel da enzima Δ^9 desaturase na síntese endógena de CLA em humanos a partir da ingestão de TVA (Salminen et al., 1998; Turpeinen et al., 2002).

Um estudo efectuado pelo Finnish National Public Health analisou a ligação entre a ingestão de produtos lácteos e o risco de contrair cancro da mama. Os resultados cobriram um período de 25 anos e indicaram que à medida que a ingestão de produtos lácteos aumentou, o risco de contrair cancro da mama diminuiu (Knekt et al., 1996). Estes autores concluíram que existe um “efeito protector”, associado ao consumo de leite que “sobrestima a associação entre diferentes factores e o risco de cancro da mama”.

Alguns AGI, particularmente o TVA (Banni et al., 2001; Turpeinen et al., 2002), os AGPI ómega-3, como o ácido linolénico, e os isómeros de CLA, especialmente o AR (Martin e Valeille, 2002), mostraram ter efeitos positivos na saúde de animais a nível experimental, na prevenção do aparecimento de tumores na pele e na glândula mamária. O fornecimento de manteiga, manufacturada a partir de leite enriquecido em CLA, reduziu em mais de 50% a incidência de tumores mamários em ratos (Ip et al., 1999), sugerindo que o AR é o componente anticarcinogénico activo (Ryhänen et al., 2005), tendo funcionado como agente anticarcinogénico em células mamárias cancerosas em humanos (O’Shea et al., 2000). O AR é, quantitativamente, o isómero do CLA mais

importante na gordura do leite (Elgersma et al., 2004), mas o TVA também tem sido referido por possuir propriedades anticarcinogénicas, provavelmente devido à conversão *in vivo* em AR, que atinge os 30 a 50% nos humanos (Turpeinen et al., 2002; Corl et al., 2003).

Os AGI são favoráveis contra doenças coronárias (Williams, 2000). Coelho foram alimentados com uma dieta hipercolesterémica com e sem CLA, e durante 12 semanas o colesterol total, as LDL e os triglicéridos foram marcadamente mais baixos no sangue de coelhos alimentados com CLA. A experiência teve a duração de 22 semanas e a aorta dos coelhos alimentados com CLA exibiu menos aterosclerose do que a aorta dos animais controlo (Pariza, 1999). Nicolosi et al. (1997) também constataram que o CLA reduziu as lipoproteínas do plasma e aterosclerose precoce na aorta em hamsters.

Verificou-se uma protecção parcial contra os efeitos catabólicos de uma exposição a endotoxinas em pintos alimentados com CLA (Cook et al., 1993; Miller et al., 1994). Segundo estes autores, animais alimentados com CLA evidenciaram aumentos na função imunitária. O CLA é o único factor conhecido da dieta que aumenta a função do sistema imunitário e ao mesmo tempo protege contra os efeitos catabólicos da estimulação imunitária (Pariza, 1999). O CLA também serviu como factor de crescimento em ratos jovens (Chin et al., 1994).

O CLA proveniente da dieta mostrou afectar a composição corporal em animais de diferentes espécies, pois favoreceu a deposição de músculo em detrimento da gordura, aumentando a quantidade de gordura livre em ratos (Park et al., 1997; Houseknecht et al., 1998; West et al., 1998; Sisk et al., 1998), porcos (Pariza, 1997; Dugan et al., 1997; Cook et al., 1998; Dunshea et al., 1998; Thiel et al., 1998) e humanos (Turpeinen et al., 2002). O CLA parece exercer um efeito directo a nível dos adipócitos, que são os principais armazenadores de gordura, e nas células esqueléticas, que são as principais utilizadoras de gordura (Park et al., 1997). Existe um mecanismo fisiológico de redução da gordura corporal em ratos, induzido pelo CLA, que envolve a inibição do armazenamento de gordura nos adipócitos. Este mecanismo está associado a níveis elevados de β -oxidações no músculo esquelético, assim como a um aumento da sua massa, que pode ser mediado, pelo menos em parte, *via* catabolismo imuno-induzido (Park et al., 1997, 1999b). Estes efeitos parecem estar intimamente correlacionados com os efeitos do CLA no metabolismo lipídico (Lee et al., 1994, 1998), indicando que os hepatócitos podem ser afectados pelo CLA.

Existem grandes expectativas para o futuro em relação à utilização de CLA em humanos. O CLA pode ser uma substância preventiva da obesidade pela redução da massa corporal lipídica, e pode constituir uma valiosa ajuda para a população obesa, constantemente em crescimento (Berven et al., 2000).

2.3.5. Conteúdo de CLA em alimentos destinados ao consumo humano

Os alimentos provenientes de ruminantes, a carne de bovino e os produtos lácteos, são a principal fonte na dieta de CLA (Ip et al., 1994a; Griinari e Bauman, 1999; Berven et al., 2000; Rego et al., 2005a).

As fontes dietéticas de CLA mais comuns são o leite e os produtos lácteos de ruminantes, e a sua carne e tecido adiposo (Ip et al., 1994a; Parodi, 1994; Van Wijlen e Colombani, 2010). Khanal e Olson (2004) classificaram o leite como a maior fonte alimentar de CLA. Pariza (1999) considerou o leite e os seus derivados como as maiores fontes do isómero C18:2 *cis-9,trans-11* da dieta humana. Nas carnes, o CLA está presente em maior quantidade nos produtos de ruminantes e tem menor presença em espécies que possuem fermentação microbiana mínima, como acontece nos monogástricos (Kelly e Bauman, 1996). A concentração de CLA em alguns alimentos está representada no Quadro 4, em que a maioria dos produtos lácteos tem 3 a 9 mg de CLA/ g de gordura.

A gordura do leite, produzida a partir das pastagens dos Açores, é rica em AGI, incluindo os ácidos *trans*-octadecenóicos e CLA (Rego et al., 2004). A formação de produtos ricos em CLA implica um enriquecimento paralelo em isómeros *trans* C18:1 (Bessa et al., 2000).

Pestana et al. (2009) analisaram os níveis de CLA no leite, manteiga e queijo de duas marcas comerciais produzidas nos Açores. Não foram verificadas diferenças significativas entre as marcas analisadas para cada tipo de produto, relativamente ao teor de gordura total e ao teor de CLA total. Os valores de CLA total obtidos neste estudo foram mais elevados do que os obtidos em amostras de leite, manteiga e queijo colhidas em explorações localizadas no continente português, que foram de 0.11, 1.09 e 2.64 mg.g⁻¹ de produto, respectivamente (Martins et al., 2007).

Como era esperado, Pestana et al. (2009) concluíram que a manteiga é o produto mais rico em gordura total e CLA total, com 81.37-81.45% e 6.58-7.72 mg.g⁻¹ de produto, respectivamente, em contraste com o leite que apresentou 1.23-1.35% e 0.01-

0.02 mg.mL⁻¹ de produto, respectivamente. Quanto ao teor de CLA específico (C18:2 *cis*-9,*trans*-11), os queijos apresentaram os valores mais elevados (12,40-14,00 mg.g⁻¹ de gordura), que foram significativamente maiores do que a concentração de CLA na manteiga (8,09-9,48 mg.g⁻¹ de gordura). O teor de CLA específico no leite obtido por Pestana et al. (2009) foi de 10,60-11,41 mg.g⁻¹ de gordura, valores ligeiramente inferiores aos publicados por Leite et al. (2007) para o leite UHT açoriano (13,3 mg.g⁻¹ de AG totais para o isómero *cis*-9,*trans*-11). Esta pequena diferença pode ser devida às variações regionais, bem como às diferenças nos métodos de quantificação de CLA utilizados nos dois estudos (Ag⁺-HPLC vs GC). Na Alemanha também foram descritos valores relativamente altos de CLA (12 mg.g⁻¹ de gordura) no leite (Precht e Molkentin, 1997). Contudo, os valores de CLA específico descritos por Pestana et al. (2009) são superiores aos reportados nos leites do continente português (Martins et al., 2007) e nos leites italianos (Banni et al., 1996).

Quadro 4 – Concentração de CLA em alguns alimentos (Chin et al., 1992; Lin et al., 1995).

ALIMENTOS	CLA TOTAL (mg/g gordura)
Produtos Lácteos	
Leite homogeneizado	5,5 ± 0,30
Leite condensado	7,0 ± 0,29
Manteiga	6,1 ± 0,21
Gelado	3,6 ± 0,10
Queijo Colby	6,1 ± 0,14
Queijo Mozzarella	4,9 ± 0,20
Iogurte	4,8 ± 0,26
Carnes	
Vaca	4,3 ± 0,13
Carneiro	5,6 ± 0,29
Porco	0,6 ± 0,06
Galinha	0,9 ± 0,02
Peru	2,5 ± 0,04
Salmão	0,3 ± 0,05

Os queijos açorianos analisados por Pestana et al. (2009) continham teores de CLA específico mais elevados, do que os queijos do continente português (Martins et al., 2007) e os queijos espanhóis (Luna et al., 2005). Os valores de CLA específico nos queijos alemães variaram de 4.0 a 17.0 mg.g⁻¹ de gordura (Fritsche e Steinhart, 1998b) e nos queijos franceses variaram entre 5.3 e 15.8 mg.g⁻¹ de gordura (Lavillonnière et al., 1998).

Os valores de CLA específico encontrados na manteiga dos Açores por Pestana et al. (2009) (8.09-9.48 mg.g⁻¹ de gordura) são mais baixos do que os registados nas

manteigas da Alemanha, da Itália e da Holanda (Precht e Molquentin, 2000), mas superiores aos das manteigas do continente português (Martins et al., 2007).

Quadro 5 – Comparação da composição em alguns AG da gordura de alguns produtos lácteos produzidos nos Açores e no continente português (g/100g AG) (Pimentel et al., 2008).

Ácidos Gordos	Açores	Continente	Prob.	Varição (%)
Leite				
Palmítico	31,0	32,2	0,034	-4
TVA	1,63	0,98	0,001	+40
Ruménico	0,76	0,49	0,001	+36
Ramificados	1,66	1,40	0,007	+16
Ómega 3	0,53	0,24	0,001	+55
n-6/n-3	3,0	10,6	0,001	3 x menos
Manteiga				
Palmítico	30,8	31,8	0,456	-3
TVA	1,80	1,231	0,060	+33
Ruménico	0,80	0,56	0,040	+30
Ramificados	1,70	1,45	0,020	+15
Ómega 3	0,56	0,34	0,019	+39
n-6/n-3	3,0	7,9	0,001	2,5 x menos
Queijo				
Palmítico	28,2	31,2	0,006	-11
TVA	2,20	1,4	0,001	+36
Ruménico	0,87	0,6	0,002	+31
Ramificados	1,80	1,5	0,002	+17
Ómega 3	0,70	0,41	0,001	+42
n-6/n-3	2,4	6,0	0,001	2,5 x menos

Pimentel et al. (2008) efectuou uma comparação da composição da gordura do leite, manteiga e queijo de diferentes marcas produzidas nos Açores e no continente português. Neste estudo foram comparadas cinco marcas de leite UHT e de manteiga, assim como nove marcas de queijos, de cada região em estudo. Os resultados desta comparação estão sistematizados no Quadro 5. Pela análise deste quadro torna-se bem evidente que a composição dos AG da gordura do leite, queijo e manteiga produzidos nos Açores é mais benéfica para a saúde do que os produtos análogos produzidos no continente português. O ácido palmítico (hipercolesterémico) está presente em menor quantidade em todos os produtos açorianos analisados, comparativamente aos produtos continentais. O TVA, precursor do AR, o próprio AR, os AG ramificados e os AG ómega-3, AG associados a efeitos benéficos para a saúde, estão presentes em maior quantidade nos produtos açorianos, verificando-se uma diferença substancial. O rácio n-6/n-3 no leite açoriano é 3 vezes inferior ao do leite continental, e o mesmo rácio no

queijo e na manteiga açorianas é 2,5 vezes inferior ao dos produtos continentais. O sistema de produção dos Açores, com características extensivas, associado à ingestão de pastagem, permite que o rácio n-6/n-3 seja baixo, e portanto favorável a um maior equilíbrio da dieta (Bessa, 1999).

Para além do AR, quantidades consideráveis (2% do total de AG) de outros isómeros CLA podem ser encontradas na carne e nos produtos lácteos (Fritsche et al., 1999; Khanal e Olson, 2004; Ponnampalam, et al., 2006). O perfil isomérico do CLA dos produtos lácteos açorianos, determinado por Pestana et al. (2009), demonstrou uma clara predominância do isómero bioactivo *cis-9,trans-11* (72.26-82.59%), seguido pelos isómeros *trans-7,cis-9* (5.34-14.95%) e *trans-11,trans-13* (2.22-3.91%). O outro isómero bioactivo, o *trans-10,cis-12* não foi detectado em nenhuma amostra analisada neste estudo.

Estudos epidemiológicos indicam que o leite e seus derivados são alimentos hipocolesterémicos, apesar de serem relativamente ricos em AG de cadeia média saturados e em isómeros *trans*, onde predomina o isómero *trans-11* (Rego et al., 2005b).

Ao discutir o potencial impacto na saúde da ingestão de CLA na dieta humana, deve também ser considerada a ingestão do C18:1 *trans-11* (TVA), que vem do nome em latim "*vacca*". O TVA é o principal isómero C18:1 *trans* na gordura do leite de vacas alimentadas com uma dieta natural e, como já foi referido, pode ser convertido em AR nos seres humanos (Mosley et al., 2006; Turpeinen et al., 2002). O TVA é produzido em grandes quantidades no rúmen pela biohidrogenação dos ácidos linoleico e linolénico provenientes da dieta (Griinari e Bauman, 1999).

Os ácidos *trans*-octadecenóicos (C18:1-*trans*) representam cerca de 97 a 98% do total de ácidos *trans* presentes quer nas gorduras hidrogenadas industrialmente, quer nas gorduras de ruminantes (Bessa, 1999). Dos diversos isómeros *trans*-octadecenóicos existentes nas gorduras corporais dos ruminantes, o *trans-11* destaca-se quantitativamente (Hilditch, 1956). O Quadro 6 mostra a composição em ácidos *trans* de alimentos com origem em ruminantes.

Quadro 6 – Valores médios de composição em ácidos gordos *trans*-octadecenóicos de diversos alimentos de origem em ruminantes (adaptado de Bessa, 1999).

Gordura do leite	% Total de AG	Carnes ^c	% Total de AG
Vaca ^a	3,8	Borrego	4,9
Ovelha ^b	4,5	Novilho	2,4
Cabra ^b	2,7	Vitela	3,9

^a Wolff (1994); ^b Wolff (1995); ^c Letha et al. (1998).

A concentração de isómeros C18:1-*trans* no rúmen é afectada por diversos factores, como a concentração de ácidos gordos insaturados (Bateman e Jenkins, 1998); o pH do rúmen (Kalscheur et al., 1997); e a presença de ionóforos (Fellner et al., 1997; Sauer et al., 1998). A micropopulação retículo-ruminal pode ser extremamente sensível a estes factores, mas sobretudo pelo aumento da concentração de AG insaturados no rúmen (Bessa et al., 2000). Se, como proposto por Guckert et al. (1986) e por Sikkema et al. (1995), os AG *trans* podem ter um efeito protector para as bactérias que são sujeitas a diferentes fontes de stress, a acumulação de ácidos *trans* octadecenóicos no ecossistema do retículo-rúmen pode ser útil em resposta ao stress de origem ambiental, como pH baixo, presença de ionóforos e altas concentrações de AG (Bessa et al., 2000). A diminuição do pH ruminal foi o principal factor responsável pela acumulação de AG C18:1 *trans*, quando foram fornecidas dietas ricas em concentrado e pobres em pastagem (Kalscheur et al., 1997). Diferenças na digestão ruminal de suplementos fornecidos a vacas em pastoreio podem afectar o metabolismo dos AG no rúmen e a composição de AG do leite. O processamento do grão de milho aumenta a disponibilidade de glícidos no rúmen, o que pode afectar o metabolismo ruminal devido a alterações no pH, enquanto suplementos de fibra não provenientes de forragem *versus* suplementos baseados em amido podem manter o pH ruminal elevado (Delahoy et al., 2003).

O leite, a manteiga e o queijo dos Açores analisados por Pestana et al. (2009) mostraram possuir altas percentagens dos isómeros *trans*-11,*cis*-13, *trans*-11,*trans*-13 e *trans*-12,*trans*-14, que são indicadores da ingestão de pastagem (Dannenberger et al. (2005). Luna et al. (2005) registaram percentagens dos isómeros de CLA *trans*-12,*trans*-14 e *trans*-11,*trans*-13 nos queijos e leites espanhóis similares aos leites e queijos açorianos. Os valores destes isómeros, registados por Pestana et al. (2009), foram superiores aos registados no continente português (Leite et al., 2007). Rickert et al. (1999) relataram uma menor presença de isómeros totais de CLA *trans/trans* em queijos, comparativamente aos valores descritos por Pestana et al. (2009). Além disso, o total de isómeros de CLA *trans/trans* e *cis/trans* (*cis/trans* e *trans/cis*) em queijos, registados por Pestana et al. (2009), foi semelhante aos reportados por Luna et al. (2005). Finalmente, não foram detectados isómeros de CLA *cis/cis* nos leites e produtos lácteos açorianas analisados por Pestana et al. (2009).

Os diferentes tipos de produtos lácteos dos Açores, analisados por Pestana et al. (2009), não mostraram diferenças significativas na percentagem relativa de isómeros

trans-12,trans-14, *trans-11,trans-13* e *trans-11,cis-13*, o que é indicativo que estes isómeros de CLA mantêm-se constantes desde o leite até à transformação em manteiga e queijo. Comparativamente à manteiga e ao queijo, o leite é o produto com maior percentagem de isómeros totais de CLA *trans/trans*, particularmente *trans-10,trans-12,trans-9,trans-11*, *trans-7,trans-9* e *trans-6,trans-8*. Dentro dos produtos lácteos, o isómero de CLA *cis-9,trans-11* está presente em maior percentagem na manteiga e o isómero *trans-7,cis-9* está presente em maiores proporções no queijo (Pestana et al., 2009).

Numa revisão de Elgersma et al. (2006), verificou-se que as proporções do isómero de CLA *cis-9,trans-11* da gordura de leite de vaca de países da União Europeia, Canadá e EUA variaram de 3,4 a 14,1 mg.g⁻¹ AG. Apenas o leite da Irlanda, com 14 mg.g⁻¹ AG, e das terras altas da Suíça (15 a 21 mg.g⁻¹ AG) apresentaram valores mais elevados do que o leite dos Açores, analisado por Rego et al. (2008a). Na Nova Zelândia, que tem um sistema de produção semelhante ao dos Açores, MacGibbon et al. (2001) relataram valores da mesma grandeza (11 a 14 mg.g⁻¹ AG), dependendo da estação do ano).

O uso de CLA como suplemento nutricional na Europa e EUA está a aumentar. Esta situação dá ênfase à necessidade da realização de triagens clinicamente controladas para assegurar a segurança da utilização do CLA em humanos (Berven et al., 2000). Na Europa, o consumo real de CLA a partir de fontes alimentares é estimado em cerca de 300 mg/d (European Food Safety Authority, 2004), com o consumo de 370 mg/d na França (Weill et al., 2002), 452 mg/d na Alemanha (Fremann, 2000) e 310 mg/d na Finlândia (Salminen et al., 1998). Nos EUA, dois estudos indicam valores diferentes para o consumo estimado de CLA, 139 mg/d (Herbel et al., 1998) e 221 mg/d (Agrawal et al., 1998). Parodi (1994), citado pela European Food Safety Authority (2004) indica 1000 mg/d para o consumo estimado de CLA na Austrália.

3. INFLUÊNCIA DE FACTORES ALIMENTARES SOBRE O PERFIL DOS ÁCIDOS GORDOS DA GORDURA DO LEITE E DO TEOR DE CLA

A relação AG saturados/insaturados é condicionada, principalmente pela alimentação, mas também pode ser influenciada por diversos factores, como a estação do ano, a fase da lactação e o genótipo animal (Baer, 1996).

No que respeita à sazonalidade, as diferenças encontradas no perfil dos AG da gordura do leite, estão mais fortemente relacionadas com factores de ordem alimentar do que propriamente com factores sazonais (Rego et al., 2008a). Desde há muito que se sabe que a gordura do leite produzido na Primavera e no Verão, por vacas em pastoreio, é mais rica em AGI (Riel, 1963; Boatman et al., 1965), comparativamente ao leite produzido no Inverno, em que as são vacas confinadas e alimentadas à base de forragens conservadas e de concentrados. O leite produzido nos meses de Verão possui menos ácido palmítico e mais AGCL, nomeadamente ácido esteárico, ácido oleico (Boatman et al., 1965), ácidos *trans*-octadecenóicos, isómeros de CLA, e ácido linolénico (Dewhurst et al., 2006). Lock e Garnsworthy (2003) verificaram que vacas leiteiras estabuladas no Inverno, alimentadas com uma ração completa de mistura (RCM), produziram leite mais saturado, comparativamente aos meses de Verão, altura em que foram alimentadas com pastagem.

Rego et al. (2008a), compararam o perfil dos AG da gordura do leite de vaca produzido em diferentes explorações dos Açores, no Inverno (dieta: pastagem, silagem de milho e concentrado) e na Primavera (dieta: pastagem e concentrado). As amostras de leite colhidas na Primavera apresentaram menor concentração de gordura, do que as amostras colhidas no Inverno. A gordura do leite produzido na Primavera apresentou maiores proporções de TVA, ácido linolénico, diversos isómeros de CLA, incluindo o *cis*-9,*trans*-11 e uma menor proporção de ácido oleico. O isómero de CLA *cis*-9,*trans*-11 aumentou 50% do Inverno para a Primavera, o que é um aumento substancial considerando que as vacas de todas as explorações pastaram nas duas estações do ano. No entanto, o ácido linolénico apresentou um aumento de apenas 6% do Inverno para a Primavera. Este ligeiro aumento foi devido, provavelmente, à sua extensiva biohidrogenação no rúmen, pois a maioria dos intermediários desta biohidrogenação aumentou no leite produzido na Primavera: C18:1 *trans*-11 (+48%), C18:2 *trans*-11,*cis*-5 (+66%), CLA *trans*-11,*trans*-13 (+77%) e CLA *trans*-11,*cis*-13 (+47%). O C18:2 *trans*-11,*cis*-5 é o maior intermediário octadecadienóico derivado directamente da biohidrogenação do ácido linolénico no rúmen (Chilliard et al., 2007). A sua concentração na gordura do leite de vacas em pastoreio no Verão variou entre 5 e 8 mg.g⁻¹ AG, contudo, no Inverno, com dietas em confinamento, nunca excedeu 1 mg.g⁻¹ AG (Elgersma et al., 2006). Os valores de C18:2 *trans*-11,*cis*-5 obtidos por Rego et al. (2008a) são valores intermédios dos verificados nos estudos revistos por Elgersma et al. (2006). Os isómeros de CLA *trans*-11,*trans*-13 e *trans*-11,*cis*-13 também são

intermediários da biohidrogenação do ácido linolénico (Collomb et al., 2004a; Chilliard et al., 2007;) e a sua proporção também aumentou no leite produzido na Primavera (Rego et al., 2008a). Kraft et al. (2003) lançaram a hipótese de que o ácido α -linolénico, o AG mais importante da pastagem, poderá ser o precursor indirecto do isómero de CLA *trans*-11,*cis*-13.

Vários autores (Precht e Molquentin, 2000; MacGibbon et al., 2001; Lock e Gransworthy, 2003; Ellis et al., 2006;) encontraram diferenças sazonais substanciais no teor do isómero de CLA *cis*-9,*trans*-11 presente na gordura do leite. Os seus valores foram consistentemente maiores no período Primavera-Verão, que coincidiu com a estação de pastoreio, em oposição ao Inverno, em que a alimentação das vacas foi baseada em forragens conservadas com concentrados.

No estudo de Rego et al. (2008a) as proporções do isómero de CLA *cis*-9,*trans*-11 variaram de 5,8 a 14,4 mg.g⁻¹ AG no Inverno e de 11,6 a 16,8 mg.g⁻¹ AG na Primavera. A grande amplitude de proporções de CLA *cis*-9,*trans*-11 observada no Inverno está, provavelmente, relacionada com a grande diversidade de estratégias alimentares usadas nas diferentes explorações estudadas. O leite produzido nos Açores na Primavera possuiu, tendencialmente, uma maior proporção de AGPI do que o leite produzido no Inverno (53,7 *versus* 47,5 mg.g⁻¹ AG). Apresentou um rácio n-6/n-3 baixo, associado à elevada ingestão de ácido linolénico, devido à maior disponibilidade de pastagem. Estes factos, associados ao elevado nível do isómero de CLA *cis*-9,*trans*-11, sugerem que o perfil dos AG do leite produzido na Primavera é melhor para a saúde do consumidor. No entanto, o leite de Primavera teve a maior proporção de AG *trans*, em que o TVA (C18:1 *trans*-11) e o CLA *cis*-9,*trans*-11 contribuíram com 57% do total de AG *trans* (Rego et al., 2008a).

3.1. Efeito da forragem basal no perfil dos AG da gordura do leite

A alteração da composição dos AG da gordura do leite em vacas leiteiras, através da manipulação da dieta, tem sido alvo de atenção, por causa das suas implicações na saúde humana (Parodi, 1999). Os suplementos energéticos são fornecidos para aumentar a ingestão de energia e, conseqüentemente, a produção de leite de vacas em pastoreio. Diferentes estratégias de alimentação mostraram afectar a composição da gordura do leite de vacas leiteiras alimentadas na pastagem e em confinamento (Bargo et al., 2003).

A erva fresca contém 1 a 3% de AG na MS e é uma grande fonte de AG polinsaturados (PUFA). Noventa por cento dos AG presentes na erva são polinsaturados em C18 (Murphy et al., 1995), dos quais 55 a 65% são ácido linolénico (C18:3 n-3) (Chilliard et al., 2001). Isto faz do ácido linolénico o AG mais abundante na composição de lípidos da pastagem (Palmquist, 1988). A quantidade deste ácido absorvida pelos animais é mais elevada em ervas jovens do que em feno e concentrados (Chilliard et al., 2000). A pastagem é mais rica em AGPI do que a silagem (Harfoot e Hazlewood, 1997). Qualquer processo de conservação de forragens provoca uma diminuição da concentração de AGPI, nomeadamente em ácido linolénico, devido a perdas mecânicas e por oxidação (Bessa, 2001). Elgersma et al. (2003a) verificaram uma diminuição no conteúdo de AGPI, principalmente de ácido α -linolénico no material ensilado com pré-fenação, comparativamente à erva fresca. O conteúdo em lípidos totais das silagens é, geralmente, mais baixo do que o das ervas que lhes deram origem (Dewhurst e King, 1998).

Elgersma et al. (2004) constataram que o ácido linoleico foi o mais abundante dos AGCL na composição do concentrado (0,38 g/kg MS) e da silagem de milho (0,45 g/kg MS), enquanto o ácido oleico foi o segundo ácido mais abundante no concentrado com 0,20 g/kg MS, apresentando apenas 0,13 g/kg MS na silagem de milho. O ácido linolénico constituiu cerca de 0,03 g/kg MS e 0,15 g/kg MS no concentrado e na silagem de milho, respectivamente, enquanto o ácido esteárico representou 0,03 g/kg MS do total de AG no concentrado, e 0,14 g/kg MS na silagem de milho.

O aumento proporcional da pastagem, na dieta de vacas leiteiras, provocou acréscimos significativos nas proporções dos AGCL mono e polinsaturados, e decréscimos nos AG saturados de cadeia média, conferindo um maior grau de insaturação à gordura do leite (Boatman et al., 1965; Rogers, 1979; Kelly et al., 1998a; Rego e Almeida, 2002). A ingestão de erva verde provocou um aumento do teor de AGCC na gordura do leite e uma diminuição dos AG hipercolesterémicos (C12:0, C14:0 e C16:0) (Lock e Gransworth, 2003). Para além disso, fez aumentar 2,5 vezes o conteúdo de ácido linolénico na gordura do leite (Kelly et al., 1998a; Rego et al., 2004). Quando a pastagem representou 33, 67 e 100% da dieta de vacas leiteiras, a concentração de ácido linolénico na gordura do leite foi de 0,8, 1,5 e 2% dos AG totais, respectivamente (Dhiman et al., 1999a).

A gordura do leite proveniente de uma alimentação baseada na pastagem possuiu o triplo ou o quádruplo de CLA em comparação com o leite de vacas

alimentadas com RCM (Jahreis et al., 1999), e 8 a 9 vezes mais carotenos, pigmentos aos quais são atribuídas propriedades benéficas para a saúde humana (Parodi, 1999). Loor et al. (2003) sugerem que o acesso diário à pastagem, durante oito horas, pode fazer aumentar, substancialmente, as concentrações de ácido linolénico, TVA e do isómero de CLA C18:2 *cis*-9,*trans*-11, na gordura do leite de vacas alimentadas com RCM. Estes autores defendem que o pastoreio suplementar, particularmente durante o dia, pode aumentar a concentração destes AG na gordura do leite de vacas em confinamento.

Comparativamente a uma dieta baseada numa RCM, dietas baseadas na pastagem diminuíram em cerca de 32% o conteúdo em AG hipercolesterémicos da gordura do leite de vaca e aumentaram os AGMI e AGPI em 33 e 43%, respectivamente, mostrando ser um leite mais pobre em AGCC e mais rico em CLA, TVA e ómega-3 (Rego et al., 2004). Aumentos na concentração de C18:0, C18:1 *trans*-11 e C18:1 *cis*-9 na gordura do leite, e diminuições de C16:0, são observados, tipicamente, em vacas em pastoreio, comparativamente a vacas alimentadas com RCM (Christie, 1979; Timmen e Patton, 1988; Chilliard et al., 2001).

Foi verificado um decréscimo na concentração dos AGCC e AGCM na gordura do leite, de vacas que transitaram de uma dieta de RCM para a pastagem (Kelly et al., 1998a). Estes ácidos (C6:0 a C14:0) totalizaram 17,6% do total de AG da gordura do leite das vacas alimentados com RCM, enquanto no leite das vacas em pastoreio representaram apenas 12,8% da gordura. Os níveis de AGCL aumentaram 30% com a ingestão de pastagem, nomeadamente os ácidos linolénico, oleico e CLA, comparativamente às vacas do grupo controlo, enquanto o ácido linoleico diminuiu ligeiramente. Em animais alimentados exclusivamente com pastagem, a percentagem de AGCL (\geq C18) no plasma foi de 44,5%, e em animais alimentados com pastagem e silagens de erva e de milho, foi de 36% (Rego e Almeida, 2002). Para além de uma maior mobilização de reservas lipídicas, a maior ingestão de ácidos linoleico e linolénico, pelos animais alimentados exclusivamente na pastagem, também poderá ter contribuído para esta tendência, uma vez que estes ácidos estão presentes em maior quantidade na pastagem do que em forragens conservadas (Almeida, 1986).

Outros estudos (Eppard et al., 1985; Timmen e Patton, 1988) mostraram que a gordura do leite de vacas alimentadas com menos energia do que a necessária, exhibe aumentos significativos em C18:1 e reduções substanciais nos AGCC e AGCM, comparativamente à gordura do leite de vacas alimentadas com os níveis energéticos

adequados. Aproximadamente 40% do ácido esteárico presente na glândula mamária é convertido em ácido oleico, por acção da Δ^9 desaturase (Chilliard et al., 2000).

A suplementação reduz a ingestão de matéria seca (IMS) proveniente da pastagem, dependendo do grau de substituição da pastagem pelo suplemento (Bargo et al., 2002). O tipo de suplemento fornecido às vacas leiteiras em pastoreio afecta a composição em AG do leite (Bargo et al., 2006). Dietas baseadas na pastagem aumentaram as concentrações de AGCL insaturados e de CLA na gordura do leite, quando comparadas com dietas baseadas em RCM. Estes efeitos foram mais marcantes quando a pastagem foi suplementada com concentrado onde o milho foi substituído por sais de cálcio (Schroeder et al., 2003).

As formas de alterar a composição em AG da gordura do leite, através da manipulação da dieta, são eficazes, fáceis de aplicar e têm efeito rápido (Chilliard et al., 2000), como se pode verificar pelo estudo efectuado por Elgersma et al. (2004). O Quadro 7 mostra o comportamento dos AG ao longo deste estudo, tal como das várias categorias de AG referidas. Após a transição do pastoreio para uma dieta de mistura de silagens, apesar de não terem ocorrido alterações na produção de leite, verificou-se um aumento do valor médio de gordura do leite em duas semanas, que passou de 43,7g/kg no dia 0 para 54,9 g/kg no dia 14. O valor médio de AG produzidos por vaca aumentou de 570g no dia 0 para 720g no dia 14, enquanto os AGMI e os AGPI decresceram, respectivamente, de 311 e 47 g/dia para 277 e 30 g/dia, nos mesmos dias. A concentração de AGI decresceu de 430 para 280 g/kg em 6 dias, enquanto as concentrações dos AG de cadeia curta e de cadeia média aumentaram de 210 para 270 g/kg (Elgersma et al., 2004).

A suplementação com silagem de erva *ad libitum* durante o período nocturno, de vacas leiteiras em pastoreio durante o dia, teve um efeito pequeno, mas significativo, nos AG da gordura do leite. Verificou-se um aumento de alguns AGCC e de AGCM e uma diminuição dos ácidos esteárico, oleico e linoleico. Para além disso, foi registado um aumento dos AG provenientes da síntese *de novo* da GM e dos AG provenientes da biomassa microbiana do rúmen, o que reflectiu uma melhoria da fermentação ruminal. Como consequência verificou-se uma maior disponibilidade de AG voláteis para a síntese *de novo*, o que pode ter diluído os AG C18, uma vez que o somatório de AG C18, maioritariamente derivados da dieta, decresceu (Rego et al., 2008b).

Quadro 7 – Produção de gordura (g gordura/d) no leite e composição em AG (g/kg total AG) da gordura do leite, categorias e rácios de AG, após a transição do pastoreio no dia 0 para uma dieta de mistura de silagens (adaptado de Elgersma et al., 2004).

	Dia				Significância
	0	2	6	14	
Produção gordura (g/d)	851	999	979	1114	*
AG (g/kg AG)					
C14:0	89	114	115	117	***
C16:0	226	297	345	348	***
C18:0	110	98	84	88	**
C18:1 <i>cis</i> -9	238	202	172	170	***
C18:1 <i>trans</i> -9	2,7	2,3	2,1	2,1	***
C18:1 <i>trans</i> -11	46,4	16,5	7,1	7,2	***
CLA (total)	24,3	10,3	4,8	4,4	***
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	23,0	9,5	4,3	3,7	***
C18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	1,0	0,04	0,02	0,03	***
C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12	10,4	10,2	10,2	10,8	NS
C18:3	10	10	10	11	NS
Categorias de AG (g/kg AG)					
AGI	430	330	280	280	***
AGMI	370	300	250	250	***
AGPI	57	35	27	28	**
AGCC e AGCM	210	250	270	260	**
Total <i>trans</i> C18:1	74	39	27	27	***
Total <i>cis</i> C18:1	250	212	181	179	***
Rácios de AG					
C14:1/C14:0	0,11	0,11	0,12	0,11	NS
C16:1/C16:0	0,13	0,09	0,08	0,08	***
C18:1/C18:0	2,96	2,60	2,50	2,39	***

Diferenças significativas entre médias: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS – não significativo.

O leite produzido por vacas em pastoreio é considerado mais saudável do que o leite produzido por vacas em confinamento, alimentadas com dietas à base de forragens conservadas (Dewhurst et al., 2006; Rego et al., 2008b) devido ao maior conteúdo em AG insaturados, nomeadamente em CLA *cis*-9,*trans*-11, TVA, e ácido linolénico. Contudo, a concentração destes AG não foi afectada em vacas alimentadas na pastagem e suplementadas com silagem de erva. Isto sugere que a substituição parcial da pastagem por silagem de erva (sem emurchecimento) não compromete a qualidade dietética da gordura do leite para o consumo humano (Rego et al., 2008b). Da mesma forma, a suplementação de vacas em pastoreio com concentrado com baixo teor de gordura permitiu, simultaneamente, a manutenção de um perfil de AG desejável e o melhoramento da produção de leite. Então, a suplementação com concentrados pode aumentar a performance animal, sem comprometer o perfil dos AG da gordura do leite, relativamente à gordura do leite produzida exclusivamente a partir da pastagem (Rego et al., 2004).

O desenvolvimento de novas estratégias de alimentação devia incluir um regime de pastoreio no Verão (Elgersma et al., 2003b), a escolha do estágio de crescimento ou da cultivar a utilizar (Elgersma et al., 2003c,d) e uma proporção de silagem de erva na dieta, tal como uma formulação do concentrado no Inverno. Uma alteração na técnica de ensilagem talvez permitisse uma redução nas perdas de ácido linolénico, durante este processo (Elgersma et al., 2003a).

3.1.1. Influência da pastagem no teor em CLA da gordura do leite

O enriquecimento do leite e da carne dos ruminantes em CLA é feito aumentando o fornecimento dos ácidos linoleico e linolénico ao metabolismo do retículo-rúmen (Rego et al., 2005a). O elevado conteúdo em ácido linolénico da erva jovem, e o seu baixo conteúdo em fibra, favorecem o aumento da produção de CLA e dos seus precursores *trans* C18:1 (Lawless et al., 1999). Diversos estudos sobre o conteúdo em CLA no leite de vacas em pastoreio, associaram positivamente o aumento na concentração de CLA com o aumento da ingestão de pastagem (Stanton et al., 1997; Kelly et al., 1998a; Chilliard et al., 2000; Griinari e Bauman, 2000; Rego et al., 2004), especialmente com erva num estágio inicial de crescimento (Chouinard et al., 1998a). Dhiman et al. (1999) e Ward et al. (2003) concluíram que esse aumento nos níveis de CLA na gordura do leite era linear.

Na maioria dos sistemas de produção actuais os animais são alimentados cada vez mais com silagens e concentrados, e com menos pastagem. Tem sido repetidamente demonstrado que um animal adaptado a uma alimentação em pastoreio, não só aumenta o conteúdo em CLA na carne e nos produtos lácteos, mas também o conteúdo em AGMI, AGPI, AG n-3, TVA e do rácio n-6/n-3, e ao mesmo tempo, verifica-se uma diminuição dos AGS (Hollo et al., 2005; Couvreur et al., 2006; Dewhurst et al., 2006; Kraft et al., 2008; Or-Rashid et al., 2008).

Entre os diversos factores que podem influenciar a produção de CLA no rúmen de vacas em pastoreio, o tipo e a origem dos glúcidos presentes na dieta, podem influenciar os índices de fermentação microbiana. Isto vem justificar as diferenças encontradas no teor de CLA, do leite de vacas alimentadas com pastagem e com forragens conservadas (Dhiman et al., 1999a). Após uma mudança de uma dieta de pastagem para uma dieta de silagem verificou-se uma diminuição no teor de CLA presente no leite (Elgersma et al., 2004).

Chilliard et al. (2001) verificaram que vacas alimentadas com pastagem tiveram mais CLA na gordura do leite do que vacas alimentadas com silagem de erva ou de milho. Animais em pastoreio produziram níveis de CLA mais elevados no leite e na carne, do que animais que consumiram forragens conservadas (Stanton et al., 1997; Kelly et al., 1998a; Lawless et al., 1998; Dhiman et al., 1999a). White et al. (2001) mostraram que a concentração de CLA no leite de vacas alimentadas na pastagem e suplementadas com 5,5 kg/vaca/dia de concentrado foi significativamente mais elevado, comparativamente a vacas alimentadas em confinamento.

Em termos de variação individual, a concentração de CLA na gordura do leite de vacas alimentadas exclusivamente em pastoreio foi de 10,9 e 29,9 mg/g de gordura, contra 10,1 e 17,3 mg/g de gordura nas vacas alimentadas com silagens (Rego et al., 2004). Esta maior variação na concentração de CLA no leite foi confirmada por dados de Kelly et al. (1998a), em que os limites de variação individual foram de 6,3 e 18,1 mg/g de gordura, para vacas alimentadas exclusivamente na pastagem e de apenas 2,4 e 7,0 mg/g de gordura, para vacas alimentadas com RCM.

Outros estudos realizados com vacas leiteiras em pastoreio indicaram haver aumentos de 2,5 a 5 vezes nos teores em CLA da gordura do leite, em relação a vacas alimentadas com RCM (Griinari et al., 1998b; Kelly et al., 1998a; Lawless et al., 1998; Dhiman et al., 1999a; Rego et al., 2004). Pela análise do Quadro 8, pode verificar-se que a concentração de CLA na gordura do leite aumenta, à medida que o consumo de pastagem também aumenta, e que os teores de CLA nas vacas alimentadas exclusivamente com pastagem, são duas a três vezes superiores, aos teores de CLA, na gordura do leite de vacas alimentadas com RCM.

Os suplementos energéticos são fornecidos com a finalidade de aumentar a ingestão de energia das dietas baseadas na pastagem, e conseqüentemente aumentar a produção de leite (Bargo et al., 2003). O aumento da suplementação alimentar de vacas em pastoreio de 0 para 660g/kg do total de MS ingerida, provocou um incremento no nível de AG no leite e uma diminuição da concentração de CLA (Dhiman et al., 1999a).

A concentração de AGCL insaturados e de CLA foi superior na gordura do leite de vacas alimentadas à base de pastagem, comparativamente a uma dieta à base de RCM. Estes efeitos foram mais acentuados quando a pastagem foi suplementada com concentrado, no qual parte do grão de milho foi substituída por sais de cálcio de AG (Schroeder et al., 2003). Rego et al. (2004) verificaram que a concentração de CLA aumentou com a ingestão de pastagem, e que a suplementação moderada de vacas em

pastoreio, utilizando um concentrado com pouca gordura na sua constituição, melhorou a performance animal, sem afectar o perfil dos AG da gordura do leite. Isto sugere, que o tipo de suplemento fornecido às vacas em pastoreio pode afectar a composição em AG do leite (Bargo et al., 2006). O conteúdo de CLA na gordura do leite foi mais elevado em vacas não suplementadas *versus* vacas suplementadas com concentrado, devido principalmente, à ingestão de ácido linolénico proveniente da pastagem, cuja biohidrogenação produz C18:1 *trans*-11 no rúmen, precursor da síntese endógena de CLA (Griinari e Bauman, 1999; Bargo et al., 2006).

Quadro 8 – Concentração de CLA (g/ 100g gordura) na gordura do leite vacas alimentadas com pastagem ou com uma RCM.

Dieta basal	Concentrado	CLA	Referência
RCM	-	0,54	
Pastagem	-	1,09	Kelly et al. (1998a)
RCM	-	0,51	
Pastagem	-	1,25	Rego et al. (2004)
Pastagem	5,0 kg	1,26	
RCM	-	0,37	
Pastagem	5,5 kg	0,66	White et al. (2001)
RCM	-	0,41	
Pastagem	6,7 kg	1,12	Schroeder et al. (2003)
Pastagem	-	2,21	
Pastagem	6,0 kg	1,43	Dhiman et al. (1999a)
Pastagem	11,6 kg	0,89	
Pastagem	20% MS	1,90	
Pastagem	35% MS	1,61	Ward et al. (2003)
Pastagem	50% MS	1,57	
Pastagem	-	2,43	Elgersma et al. (2004)
Mistura de silagens	-	0,44	

No que respeita à rapidez com que os níveis de CLA se alteram após uma mudança na dieta, Elgersma et al. (2004) referem que as concentrações de CLA decresceram de 24,3 g/kg no dia 0 para 4,4 g/kg no dia 14. Dos isómeros de CLA identificados, apenas a proporção do C18:2 *cis*-10,*cis*-12 permaneceu constante durante a transição, enquanto os isómeros C18:2 *cis*-9,*trans*-11 e C18:2 *trans*-10,*cis*-12 decresceram cerca de 84 e 70%, respectivamente. A análise do Quadro 7 ajuda a perceber a evolução das concentrações destes AG ao longo dos dias de estudo. As concentrações de CLA e de TVA mostraram-se altamente correlacionadas ($r = 0,986$; P

<0,001) e os seus níveis decresceram grandemente, rapidamente e em simultâneo, enquanto a concentração de ácido elaídico (C18:1 *trans*-9) decresceu em muito menor extensão. Griinari et al. (1998a) verificaram que uma dieta composta maioritariamente por grão e concentrados, com o mínimo de fibra, conduziu a alterações ambientais no rúmen que resultaram numa redução do teor de TVA e, conseqüentemente, da concentração de CLA nos tecidos.

Outros factores, como a ingestão de água associada ao pastoreio, a frequência e tamanho das refeições, e o tempo gasto em ruminação, que são diferentes nas vacas em pastoreio e nas vacas em confinamento, podem ser importantes na alteração da fermentação ruminal e na produção de CLA no rúmen (Kelly et al., 1998a).

3.1.2. Efeito da adição de lípidos no perfil dos AG e no teor de CLA da gordura do leite

Como já foi referido, a composição ideal da gordura em termos dietéticos, postulada por O'Donnell (1989), é impossível de conseguir através da manipulação alimentar (Grummer, 1991). No entanto, a possibilidade de alterar o perfil dos AG da gordura do leite, com o objectivo de aumentar o seu nível de insaturação, conferindo-lhe maiores benefícios para a saúde, surgiu através da suplementação com lípidos protegidos da acção da microbiota do retículo-rúmen (Grummer, 1991; Baer, 1996). Apesar das gorduras edíveis dos ruminantes possuírem um elevado teor em AG hipercolesterémicos, é possível alterar significativamente a sua composição, através da manipulação alimentar, particularmente pela suplementação das dietas com lípidos polinsaturados, recorrendo a óleos vegetais, óleos de peixe e sementes de oleaginosas. Desta forma, é possível reduzir a concentração dos AG hipercolesterémicos e aumentar as concentrações dos AG hipocolesterémicos, ómegas-3 e CLA (Grummer, 1991; Palmquist et al., 1993; Chilliard et al., 2000; Rego et al., 2005a). Para além da modificação do perfil dos AG da gordura do leite, a inclusão de lípidos na dieta de vacas leiteiras, tem como propósito alterar as características nutritivas, dietéticas e físicas do leite (Rego et al., 2005a).

Outras fontes de gordura são utilizadas como suplementos na alimentação animal, como por exemplo o sebo. Este provocou um decréscimo nas quantidades de AGCC e AGCM, possivelmente devido ao efeito depressivo dos AGCL na síntese *de novo* na GM. Houve também um aumento no conteúdo em ácido oleico, devido a desaturação na GM. De um modo geral, verificou-se uma melhoria da qualidade

nutricional da gordura do leite (Chilliard et al., 2001). Segundo estes autores, as respostas à utilização de sebo protegido são semelhantes às respostas obtidas quando há um aumento da mobilização da gordura corporal. A utilização de sebo diminui as percentagens dos AG de C6:0 a C16:0, e aumenta as percentagens de ácido esteárico, mas principalmente de ácido oleico.

3.1.3. Óleos vegetais e sementes de oleaginosas

O objectivo da adição de óleos vegetais e de gordura animal e vegetal, aos concentrados utilizados na dieta de vacas leiteiras, é aumentar o valor energético da dieta, permitindo às vacas de alta produção expressarem o seu potencial produtivo, principalmente no início da lactação (Rego et al., 2005a).

O efeito da adição de gordura na dieta é complexo, uma vez que está relacionado com a sua natureza (composição em AG), apresentação (sementes de oleaginosas, óleos protegidos ou não protegidos) e a quantidade de gordura na dieta. Estes factores e as suas interacções com as forragens e/ou concentrados na dieta basal, com o ambiente ruminal, afectam a biohidrogenação (Chilliard et al., 2000). A utilização de sementes de oleaginosas inteiras é eficaz porque o óleo encontra-se entre as paredes celulares e fica parcialmente protegido da actividade ruminal (Murphy et al., 1990).

Os lípidos têm um efeito adverso na microflora ruminal e na digestibilidade da fibra, principalmente aqueles que contêm AGPI. Em doses elevadas na dieta, os lípidos provocam, geralmente, uma baixa na produção do leite e dos seus constituintes (Henderson, 1973). Os AGPI presentes na dieta ou resultantes da mobilização das reservas corporais exercem um efeito inibidor na síntese *de novo* na GM, sendo responsáveis pela diminuição da síntese de AGCC e, numa menor extensão, de AGCM (Barber et al., 1997; Chilliard et al., 2007) e pelo aumento da concentração de AG C18, resultando numa gordura menos saturada (Chilliard et al., 2007). Outro factor que afecta a síntese *de novo* na GM é a acção de lípidos insaturados na dieta sobre o rácio acetato:propionato no rúmen (Doreau et al., 1999).

O tratamento de lípidos com formaldeído (Scott et al., 1971) protege a gordura da actividade ruminal, elimina os efeitos adversos na digestibilidade da fibra e na produção de leite, e previne a biohidrogenação dos AG no rúmen. Desde os anos 70 que têm sido feitas tentativas para proteger os lípidos da biohidrogenação (Chilliard et al., 2000). A primeira aproximação aconteceu com lípidos encapsulados em proteínas

tratadas com formaldeído (Ashes et al., 1979). Apesar do grau de protecção ser por vezes incerto, esta técnica permitiu que maiores quantidades de AGPI escapem à biohidrogenação ruminal. Segundo Chilliard et al. (2000), várias técnicas têm sido investigadas, e a mais popular consiste na utilização de sais de cálcio, que são capazes de prevenir a interacção entre os AG e os microrganismos do rúmen. A utilização de sais de cálcio proporcionou alguma protecção ao ácido linoleico presente em óleos vegetais da biohidrogenação ruminal, uma vez que a sua concentração duplicou na gordura do leite de vacas em pastoreio (Murphy et al., 1995; Lawless et al., 1998; Schroeder et al., 2003).

As gorduras e os óleos podem ser protegidos por emulsificação ou por encapsulação, de modo a prevenir a sua lipólise e biohidrogenação no rúmen (Scott et al., 1971). O processo de extrusão e a temperatura a que é realizado afectam a composição da gordura em AG, pela alteração da disponibilidade de óleo para a microflora ruminal. A extrusão da soja provocou uma diminuição da proporção de AGCC e AGCL, tal como dos ácidos esteárico e linoleico, e um aumento do ácido oleico (Chouinard et al., 2001). O grau de protecção e a composição dos AG dos óleos introduzidos na dieta são demonstrados pelo aumento na proporção do ácido oleico, mas também nas proporções dos ácidos linoleico e linolénico, na gordura do leite (Chouinard et al., 2001).

A adição de lípidos sob a forma protegida à alimentação de vacas leiteiras aumentou a produção de gordura, em relação a uma alimentação normal. No caso da adição de lípidos não protegidos da biohidrogenação ruminal, foram sobretudo os AGCM que baixaram na gordura do leite, com um aumento significativo do ácido oleico. O ácido linoleico aumentou bastante, no caso da adição de óleo de soja protegido. Segundo Van Kempen e Jansman (1994) os AGMI e AGPI aumentam, quando são fornecidos lípidos protegidos na dieta.

Os óleos vegetais mais utilizados em estudos são os óleos de soja, colza e amendoim, ricos em ácido oleico (Van Kempen e Jansman, 1994) e óleo de linhaça rico em ácido linolénico (Rego et al., 2009). As principais fontes de ácido linoleico na alimentação animal são os grãos de cereais e de oleaginosas ou os óleos obtidos a partir destas (Bessa et al., 1999), como os óleos de soja e de girassol (Rego et al., 2005a). Kelly et al. (1998b) verificaram que o óleo de girassol elevou a concentração de ácido oleico na gordura do leite, o óleo de amendoim aumentou a concentração de ácido

palmítico, e o óleo de linhaça aumentou a concentração dos outros ácidos, chegando a duplicar a concentração de ácido linolénico.

Rego et al. (2005a), suplementaram vacas em pastoreio utilizando concentrados com óleos de girassol e de soja incorporados, e não verificaram efeitos significativos na concentração do ácido linolénico na gordura do leite, enquanto a concentração do ácido oleico e dos seus diferentes isómeros *cis/trans*, incluindo o C18:1 *trans*-10, aumentou significativamente. Estes efeitos deveram-se, provavelmente, à biohidrogenação dos ácidos linoleico e linolénico presentes na dieta e à desaturação do ácido esteárico na GM (Chilliard et al., 2001). Apesar dos óleos de soja e de girassol serem uma boa fonte de ácido linoleico, o seu aumento na gordura do leite foi muito ligeiro, sugerindo que houve uma baixa eficiência na transferência deste ácido do óleo vegetal para a gordura do leite, e uma elevada taxa de biohidrogenação ruminal (Rego et al., 2005a). Ainda neste estudo, não foram verificadas alterações a nível da produção de leite, nem da produção e do teor de proteína, mas verificou-se um decréscimo significativo na produção e teor de gordura, e grandes alterações no perfil dos AG da gordura do leite. A concentração dos AG hipercolesterémicos decresceu, enquanto a concentração dos AGMI e AGPI, incluindo o CLA e o TVA aumentou, comparativamente aos animais alimentados só com pastagem (Rego et al., 2005a, 2009).

A resposta à suplementação com lípidos insaturados pode ser bastante variável, consoante a fonte usada (Rego et al., 2009). De acordo com Schroeder et al. (2004), a suplementação de vacas em pastoreio com AG insaturados, fez aumentar a produção de leite, enquanto a produção de gordura e os teores de gordura e de proteína decresceram. Lawless et al. (1998) suplementaram vacas em pastoreio com sementes de soja e de colza, e observaram um decréscimo na gordura do leite (só para as sementes de colza) e no teor proteico, sem efeitos na produção de leite e de sólidos do leite, comparativamente a uma dieta controlo. Flowers et al. (2008) suplementaram vacas em pastoreio com óleo de linhaça e não obtiveram quaisquer efeitos na produção e no teor de gordura do leite, resultados consonantes com os apresentados por Rego et al. (2005a, 2009). Noutro estudo com vacas em pastoreio suplementadas com uma mistura de óleos de peixe e de girassol, não foram verificados efeitos significativos na produção e na composição do leite (AbuGhazaleh e Holmes, 2007). No geral, a literatura sugere que a suplementação com óleo de linhaça, rico em ácido linolénico, não exerce efeitos negativos no teor de gordura do leite, quando a dieta é baseada em forragens. O efeito

da suplementação com fontes ricas em ácidos oleico e linoleico no teor de gordura é menos consistente, segundo a literatura (Rego et al., 2009).

Um dos objectivos do estudo de Rego et al. (2009) era detectar algum efeito sinérgico entre a pastagem e o óleo de linhaça, no enriquecimento da gordura do leite em AG n-3, uma vez que ambos são boas fontes de ácido linolénico. No entanto, verificou-se, surpreendentemente, que o óleo de linhaça provocou uma diminuição do ácido linolénico na gordura do leite. Por outro lado, Flowers et al. (2008), que suplementaram vacas em pastoreio com níveis crescentes de óleo de linhaça, observaram um aumento do ácido linolénico no leite. Uma possível explicação para a redução do teor de ácido linolénico na gordura do leite de vacas suplementadas com gordura pode ser a diminuição da ingestão de pastagem (Rego et al., 2009). A redução da IMS de pastagem após a suplementação com lípidos também foi observada por Schroeder et al. (2002).

3.1.4. Efeitos dos óleos vegetais na concentração de CLA e de TVA

A concentração de CLA na gordura do leite pode aumentar substancialmente com a adição de AGPI à dieta, especialmente de óleos ricos em ácido linoleico (Kelly et al., 1998b; Chilliard et al., 2007), que são mais eficientes na produção de CLA. Verificou-se um aumento da concentração de TVA (25%) e de CLA (61%), em vacas em pastoreio suplementadas com óleo de soja e de girassol (Rego et al., 2005a). O mesmo aconteceu com a suplementação de vacas leiteiras em pastoreio com óleos de girassol e de linhaça, ricos em ácido linoleico e ácido linolénico, respectivamente (Schroeder et al., 2004; Rego et al., 2005a; AbuGhazaleh e Holmes, 2007; Flowers et al., 2008; Rego et al., 2009). No entanto, a inclusão de AGI, nas dietas de vacas leiteiras, principalmente em pastoreio, não garante um aumento das concentrações em TVA e AR na gordura do leite (Kay et al., 2004). A suplementação com óleo de colza (rico em ácido oleico) não aumentou a concentração de TVA e AR na gordura do leite de vacas em pastoreio (Lawless et al., 1998; Rego et al., 2009) nem de vacas alimentadas com silagem de erva (Ryhänen et al., 2005). Vários estudos (Kelly et al., 1998b; Collomb et al., 2004b) mostraram que as fontes de ácido linoleico, e com menor extensão as fontes de ácido linolénico, são mais eficientes no aumento naqueles componentes na gordura do leite, do que as fontes de ácido oleico.

Dietas baseadas em forragens de alta qualidade e a suplementação das dietas com óleos insaturados aumentaram os conteúdos de CLA e de TVA na gordura do leite (Chouinard et al., 2001). A combinação entre forragem de elevada qualidade e suplementação com óleo (Grinari et al., 1998a) mostrou ter um efeito sinérgico nos conteúdos de CLA e TVA na gordura do leite. Os óleos vegetais fornecem substratos para a biohidrogenação ruminal com a formação de TVA e AR, entre outros isómeros. O ácido linoleico, além de fornecer substratos directos para a formação de AR e TVA, em quantidades elevadas no rúmen, inibe a síntese de ácido esteárico, a partir do TVA, contribuindo para a sua acumulação (Harfoot et al., 1973).

A suplementação com óleo de linhaça, rico em ácido linolénico, aumentou os teores de CLA no leite de vacas em pastoreio, para níveis semelhantes aos conseguidos com óleos ricos em ácido linoleico (Chouinard et al., 1998b; Dhiman et al., 2000). Uma vez que o ácido linolénico, não é um precursor do AR no rúmen, a suplementação com óleo de linhaça resultou em elevadas concentrações de TVA, utilizadas na GM para a síntese de CLA. Num estudo efectuado por Kelly et al. (1998b) todas as dietas suplementadas com óleos de plantas deram origem a concentrações de CLA na gordura do leite superiores aos 3-6 mg/g, observados em estudos com dietas de forragem/concentrado. A suplementação com óleo de linhaça aumentou os níveis de CLA, mas não com a extensão observada quando as vacas ingeriram óleo de girassol.

Dhiman et al. (1999a) observaram que os conteúdos de CLA eram mais elevados em vacas em pastoreio, em comparação com vacas alimentadas com alimentos conservados, mas não foram observadas diferenças entre animais alimentados com milho normal, em comparação com animais alimentados com milho rico em óleo. Neste estudo, em que o milho foi usado como fonte de AG insaturados, a produção de leite e de gordura não foi alterada pelo nível de gordura na dieta, mas as concentrações de CLA no leite foram afectadas drasticamente. As concentrações de CLA no leite aumentaram progressivamente com o aumento da ingestão de óleo de milho resultando numa alteração de mais de 300% (McGuire et al., 1996).

Kelly e Bauman (1996) compararam dietas que diferiam na fonte de gordura (saturada ou insaturada) e na relação forragem/concentrado (20:80 e 50:50), e observaram que a suplementação com AG insaturados aumentou os níveis de CLA para as duas relações forragem/concentrado, mas com concentrações mais elevadas de CLA obtidas quando os animais foram alimentados com 50:50 de forragem/ concentrado.

Em diversos estudos realizados, a adição de óleos vegetais, à dieta de vacas leiteiras, deu origem a um aumento da concentração de CLA e de TVA na gordura do leite, como pode ser observado no Quadro 9.

Quadro 9 – Efeito da suplementação com óleos vegetais e sais de cálcio com AG sobre os níveis de CLA (g/100 g gordura) da gordura do leite de vaca.

Óleo Vegetal	CLA (g/100 g gordura)	TVA (g/100 g gordura)	Referência
Adição de 5,3% de óleo de linhaça	1,67	-	Kelly et al. (1998b)
Adição de 5,3% de óleo de amendoim	1,33	-	
Adição de 5,3% de óleo de girassol	2,44	-	
Dieta controlo (RCM)	0,40	-	Dhiman et al. (2000)
Adição de sementes de soja inteiras	0,36	-	
Adição de sementes de soja extrudidas	0,77	-	
Dieta controlo	0,40	-	
Adição de 3,6% de óleo de soja	2,04	-	
Dieta controlo	0,51	-	
Adição de 1,0% de óleo de linhaça	0,71	-	
Dieta controlo	0,35	-	Chouinard et al. (2001)
Adição de 4,0% de sais de cálcio com óleo de soja	2,25	-	
Adição de 4,0% de sais de cálcio com óleo de linhaça	1,95	-	
Adição de 4,0% de sais de cálcio com óleo de colza	1,32	-	
Dieta controlo (pastagem + 5 kg concentrado)	1,26	2,40	Rego et al. (2005a)
Pastagem + 4,5 kg concentrado + 0,5 kg óleo de girassol	2,12	2,80	
Pastagem + 4,5 kg concentrado + 0,5 kg óleo de soja	1,93	3,18	
Dieta controlo (20 horas pastoreio + 6 kg concentrado)	1,43	3,06	Rego et al. (2008)
20 horas pastoreio + 6 kg concentrado + mistura de milho com suplemento de soja	1,37	3,19	
7 horas pastoreio + 13 horas silagem erva + 6 kg concentrado	1,47	2,86	
7 horas pastoreio + 13 horas silagem erva + 6 kg concentrado + mistura de milho com suplemento de soja	1,49	3,05	
Dieta controlo (20 horas pastoreio + 5 kg concentrado)	1,19	2,70	Rego et al. (2009)
20 horas pastoreio + 4,5 kg concentrado + 0,5 kg óleo de colza	1,14	2,54	
20 horas pastoreio + 4,5 kg concentrado + 0,5 kg óleo de girassol	1,61	3,32	
20 horas pastoreio + 4,5 kg concentrado + 0,5 kg óleo de linhaça	1,54	3,70	

A suplementação com sementes intactas não exerce qualquer efeito sobre os teores de CLA do leite, uma vez que não devem estar disponíveis para as bactérias ruminais. Com a utilização de sementes de oleaginosas processadas verifica-se um aumento dos teores de CLA do leite. Dhiman et al. (2000) obtiveram apenas 0,36g

CLA/100g de gordura na suplementação com sementes de soja inteiras, um valor inferior ao obtido em vacas alimentadas só com uma RCM (0,40g CLA/100g de gordura). No grupo das vacas suplementadas com sementes de soja tostadas obtiveram 0,77g CLA/100g de gordura, um valor bastante mais elevado. Chouinard et al. (2001) efectuaram um estudo semelhante, cujos resultados foram 1,99g CLA/100g de gordura em vacas suplementadas com sementes de soja extrudidas e apenas 0,42g CLA/100g de gordura em vacas suplementadas com sementes de soja inteiras. Valores de 0,60g CLA/100g de gordura em vacas alimentadas com RCM e 1,18g CLA/100g de gordura nas vacas suplementadas com sementes de soja extrudidas foram os resultados obtidos num estudo efectuado por Whitlock et al. (2002).

3.1.5. Óleos de peixe e de origem marinha

Os óleos marinhos (de peixe, mamíferos, plâncton ou algas) são fontes extremamente ricas em AG polinsaturados de cadeia muito longa, os PUFA, (C20:0 a C22:0), dos quais os mais importantes são o eicosapentaenóico C20:5 n-3 (EPA), o docosapentaenóico C22:5 n-3 (DPA) e o docosahexaenóico C22:6 n-3 (DHA) (Doreau et al., 1999; Givens et al., 2000; Rego et al., 2005b). Estes AG têm efeitos benéficos a nível cardiovascular e propriedades anti-inflamatórias. Apesar das suas características saudáveis, o consumo destes AG é insuficiente na maioria das dietas ocidentais (Williams, 2000). Os PUFA estão presentes nas dietas alimentares nos países desenvolvidos em quantidades muito pequenas, devido ao baixo consumo de peixe e de produtos à base de peixe (Sargent, 1997). Estas dietas são desequilibradas em PUFA ómega-6 e ómega-3 e o rácio n-6/n-3 é normalmente maior do que o valor recomendado de 4:1 (Holman, 1998).

Os AG n-3 representam menos de 1% do total de AG na gordura do leite normal e foram associados à diminuição do risco de DCV (Chilliard et al., 2001). Apesar das concentrações de EPA e DHA no leite serem baixas, este pode representar uma fonte importante destes ácidos na dieta de pessoas cuja ingestão de peixe é insuficiente (Bauman et al., 2001).

A suplementação das dietas de vacas leiteiras com OP provocou uma redução significativa no teor de gordura do leite e aumentou o rácio proteína/gordura (Doreau et al., 1999; Rego et al., 2005b). Rego et al. (2005b) verificaram também uma diminuição significativa das produções de leite, de gordura e de proteína, e dos teores de proteína e

de gordura. A diminuição da produção de leite devido à adição de OP na dieta também foi verificada por Wonsil et al. (1994), por Donovan et al. (2000) que incluíram 3% de OP numa dieta de RCM, e por Whitlock et al. (2002) quando compararam OP com soja extrudida. Pelo contrário, Chilliard e Doreau (1997b) e Keady et al. (2000) verificaram um aumento da produção de leite devido à suplementação com OP em vacas alimentadas com silagem de milho e silagem de erva, respectivamente. Uma vez que, nestes últimos estudos, o consumo de MS foi reduzido, parece razoável admitir que existe algum mecanismo compensatório que implica, ou um aumento no valor energético da dieta devido aos OP, ou uma maior eficiência devido à maior digestibilidade das dietas (Rego et al., 2005b).

A gordura do leite de vacas alimentadas com uma dieta de RCM suplementada com OP apresentou uma diminuição da maior parte dos AG, particularmente dos AG e dos ácidos palmítico, esteárico e oleico, e um aumento da secreção de TVA, dos PUFA n-3, e de CLA (Doreau et al., 1999; Chouinard et al., 2001). Rego et al. (2005b) registaram uma situação semelhante com vacas em pastoreio, embora não tenham verificado um decréscimo do ácido palmítico. A diminuição significativa da concentração de ácido palmítico na gordura do leite devido à inclusão na dieta de OP também foi verificada por Chilliard et al. (1997) e Keady et al. (2000), ao contrário do que foi verificado por Offer et al. (1999), Donovan et al. (2000). O facto do ácido palmítico ter duas origens: AG exógenos dos suplementos e a síntese *de novo* na GM condiciona a sua secreção. A diminuição no último caso é compensada por um aumento do anterior (Rego et al., 2005b).

As proporções de AGCC tendem a diminuir com a inclusão na dieta de OP (Chilliard et al., 1997; Donovan et al., 2000), sugerindo uma diminuição da síntese *de novo* dos AG na GM (Rego et al., 2005b). A suplementação com OP provocou uma diminuição da concentração dos AGCC e AGCL, e no somatório dos AG, não tendo qualquer efeito na concentração de AGCM e no somatório dos AGI (Rego et al., 2005b).

Foi verificado um aumento da concentração de AG polinsaturados de cadeia longa (C20:5-EPA e C22:6-DHA) de 2,7 vezes devido à suplementação com 160g de OP e de 5 a 7 vezes com 320g de OP. Contudo, a eficiência da transferência para o leite dos EPA e DHA foi muito baixa, com 3 e 4%, para cada nível de suplementação, respectivamente (Rego et al., 2005b). A menor eficiência na transferência dos EPA e DHA pode ser devida, em parte, a uma maior biohidrogenação no rúmen, porque o rácio

DHA/EPA aumentou acentuadamente desde a dieta até ao duodeno, não havendo alteração desde o duodeno até ao leite (Doreau e Chilliard, 1997; Chilliard e Doreau, 1997a). A eficiência da transferência de DPA é maior (30-39%) do que a de EPA e DHA, provavelmente devido à menor taxa de biohidrogenação no rúmen e a uma alta utilização pela glândula mamária (Offer et al., 1999; Chilliard et al., 2000). Esta ineficiência é menos marcante quando o OP está protegido com formaldeído (Storry et al., 1974).

A utilização de OP ou de algas marinhas na dieta de vacas leiteiras diminuiu, consistentemente, a produção e o teor de gordura do leite, em montantes consideráveis (Chilliard e Doreau, 1997b; Franklin et al., 1999; Offer et al., 1999; Donovan et al., 2000; Keady et al., 2000; AbuGhazaleh et al., 2002b; Whitlock et al., 2002). Tem sido demonstrado que a diminuição do teor de gordura do leite é muito inferior se o OP for infundido no duodeno (Chilliard e Doreau, 1997a). Isto mostra que esta redução está relacionada, principalmente, com os produtos da biohidrogenação ruminal dos AGI de 20 e de 22 carbonos, presentes em grandes quantidades nos OP (Rego et al., 2005b). A suplementação com OP, através do rúmen ou do duodeno, alterou o perfil dos AG da gordura do leite de vacas alimentadas com silagem de milho (Loor et al., 2005a), tendo sido verificado um maior decréscimo no teor de gordura, devido à infusão ruminal de OP, principalmente no que diz respeito aos AG de C4:0 a C18:0 e C18:1 *cis*-9.

A utilização de doses elevadas de OP na dieta diminuiu significativamente o teor e a produção de proteína (Chilliard e Doreau, 1997b; Offer et al., 1999; Rego et al., 2005b). Keady et al. (2000) encontraram uma correlação linear negativa entre o teor de proteína do leite e do nível de OP na dieta. Outros autores não encontraram efeitos significativos da adição de OP à dieta, no teor de proteína do leite (Wonsil et al., 1994; Whitlock et al., 2002; AbuGhazaleh et al., 2002b). Rego et al., (2005c) verificaram haver uma diminuição significativa do teor e produção de gordura, sem qualquer efeito no teor e produção de proteína do leite.

3.1.6. Efeito dos óleos de origem marinha na concentração de CLA e de TVA

Os óleos de origem marinha fazem decrescer o conteúdo em gordura do leite e aumentam os conteúdos em AG polinsaturados n-3 (EPA, DHA e C22:5-DPA) e em TVA e CLA (Chilliard et al., 2001; Rego et al., 2005b). Rego et al., (2005b) obtiveram um aumento de 43% na concentração de CLA, na gordura do leite de vacas em

pastoreio suplementadas com 160g OP, e de 62%, com uma suplementação de 320g OP. Chouinard et al. (1998b) também referem que a concentração de CLA na gordura do leite aumentou, quando a dieta de vacas leiteiras foi suplementada com OP. Neste estudo, o conteúdo em CLA do leite aumentou de 0,2 a 0,6% nas dietas controlo, para 1,5 a 2,75% nas dietas suplementadas com OP. Este aumento foi devido, quase exclusivamente, ao isómero C18:2 *cis*-9,*trans*-11 (AR) (Chilliard et al., 1999; Offer et al., 1999; Griinari et al., 2000), que representou mais de 95% do aumento no total de CLA (Loor et al., 2005a).

A percentagem de AR, observada em resposta à infusão ruminal de OP, por Loor et al. (2005a), foi progressivamente maior com o aumento da dose infundida, 200 ou 400 ml de OP/dia (Chouinard et al., 2001), 250ml de OP/dia (Offer et al., 1999), ou níveis crescentes (300, 350, 400 ou 500 ml/dia) de OP na dieta (Donovan et al., 2000; AbuGhazaleh et al., 2002b; Whitlock et al., 2002). Da mesma forma, a quantidade de TVA foi superior do que a verificada em vacas alimentadas com doses crescentes de OP (0-500 ml/dia) (Donovan et al., 2000; AbuGhazaleh et al., 2002b; Whitlock et al., 2002).

A suplementação com OP é um processo extremamente eficiente no enriquecimento natural da gordura do leite em AR e TVA, verificando-se aumentos de 3 a 10 vezes mais, relativamente ao tratamento controlo, para além de enriquecer o leite em CLA e ómeegas, e reduzir o teor butiroso. Este efeito de redução do teor butiroso, não está relacionado com o efeito inibidor da síntese *de novo* da gordura do leite na GM, provocado pelo isómero *trans*-10, *cis*-12 (Baumgard et al., 2000), uma vez que este não é produzido no rúmen no processo biohidrogenação dos AG dos OP, nem aparece no leite em quantidades significativas (Chilliard et al., 2000). Wonsil et al. (1994) e (Offer et al. (1999) sugeriram que os isómeros C18:1-*trans* têm um papel na inibição da lipogénese na glândula mamária. Chilliard et al. (2001) propuseram esse papel para os EPA, porque a ingestão destes AG está correlacionada com a diminuição da síntese de gordura do leite. No entanto, este ponto de vista é contestado pelo facto das algas marinhas diminuírem significativamente o teor e produção de gordura, apesar de serem muito pobres em EPA (Franklin et al., 1999).

O ácido linoleico é isomerizado no rúmen até formar TVA, que se acumula como produto final na digestão, em grandes quantidades. À medida que o conteúdo em ácido linoleico na dieta aumenta, a acumulação de TVA aumenta e a sua conversão em ácido esteárico decresce,. Uma vez que o OP é mais pobre que o óleo de soja em ácido

linoleico, provoca um maior rácio TVA: C18:0 na digestão ruminal (AbuGhazaleh et al., 2002a). O aumento deste rácio deve-se, possivelmente, à biohidrogenação incompleta dos ácidos linoleico e linolénico da dieta basal, devido principalmente a alterações no ecossistema ruminal (Rego et al., 2005b). Estes autores dizem que, é possível que os OP incluídos na dieta inibam o grupo de bactérias que fazem a hidrogenação do TVA para formar C18:0, permitindo a sua acumulação no rúmen.

O OP mesmo sendo pobre em ácido linoleico e ácido linolénico (AG cuja biohidrogenação no rúmen produz TVA, o precursor do CLA na GM), consegue aumentar o teor de CLA na gordura do leite. A razão pela qual, a suplementação com OP aumenta a concentração de CLA na gordura do leite, em relação a quantidades iguais de óleos de origem vegetal, ainda é desconhecida.

Os efeitos de alterações na dieta e a sua influência na concentração de CLA na gordura do leite verificados em diferentes estudos estão resumidos no Quadro 10 e estão divididos em categorias, consoante o mecanismo pelo qual possam ter exercido algum efeito.

Quadro 10 – Resumo dos factores da dieta que afectam as concentrações de CLA na gordura do leite.

Factor da dieta	Efeito na [CLA] da gordura do leite	Referências
Substrato Lipídico		
Gordura insaturada vs. saturada	↑ com a gordura insaturada	1,2,3,8,54
Óleos vegetais		
Tipo de óleo	↑ com óleos ricos AGPI	4,5,6,7,8,9,10,11,12,55,57
Nível de inclusão	↑ dependente da dose	3,5,11,12
Sais de Ca	↑	4,8
Subprodutos de origem animal	Efeito mínimo	4,8
Sementes oleaginosas		
Inteiras	Sem efeito	6,8,11
Processadas	↑	6,8,13,14,15,48
Óleos de plantas		
Milho rico em óleo	Efeito mínimo	4,8,11
Sementes de soja	↑ com o processamento	4
Colza vs. Sementes de soja	Efeito similar	15
Óleo girassol	↑	41,46
Óleo soja	↑	41
Óleo colza	Sem efeito	15,46,55,56
Óleo linhaça	↑	4,6,41,46,58,59,60
Óleo soja+concentrado+20 h pastagem vs. pastag.+ concent.	↓	44
Óleo soja + concentrado + 7 h pastagem + 13 h silagem erva vs. pastag.+ concent.	↑ ligeiramente	44
Modificadores da Biohidrogenação		
Relação forragem: concentrado	Efeito variável	1,16,17,18
Relação forragem: concentrado + gordura insaturada	↑ 50:50 + gordura insaturada	54
Nível de CH não estruturais	Efeito mínimo	19,20,21
Restrição alimentar	Efeito variável	3,17,23
Óleos de peixe	↑	3,4,8,9,17,24,25,37,42,47
Doses crescentes de óleo de peixe	↑	8,9,25,42,48,49,50
Algas marinhas	↑	26
Ionóforos	Efeito variável	8,17,19,21,27
Tamponização ruminal	Efeito mínimo com fibra suficiente	3,19
Concentração de cobre	↑ com ouço cobre	2,5,20
Combinações		
Pastagem vs. forragens conservadas	↑ com a pastagem	11,23,27,28,29,30,31,39
Pastagem vs. RCM	↑ com a pastagem	11,31,39,40,51,52,53
Maturidade da forragem	↓ com a maturação	11,19,20,28,39
Pastagem zonas baixas vs. montanha	↑ com a pastagem de montanha	38,44
Espécies pobres vs. espécies ricas nutricionalmente	↓ com espécies pobres a nível nutricional	43,44
Suplementação com CLA	↑ dependendo da dose	16,18,31,32,33,34,35,36,37

1- Griinari et al., 1998a; 2- Sol Morales et al., 2000a; 3- Jones et al., 2000; 4- Chouinard et al., 1998b; 5- Tesfa et al., 1991; 6- Dhiman et al., 2000; 7- Kelly et al., 1998b; 8- Chouinard et al., 2001; 9- Offer et al., 1999; 10- Chilliard et al., 2000; 11- Dhiman et al., 1999a; 12- McGuire et al., 1996; 13- Stanton et al., 1997; 14- Dhiman et al., 1999b; 15- Lawless et al., 1998; 16- Piperova et al., 2000; 17- Jiang et al., 1996; 18- Loor e Herbein, 1998; 19- Chouinard et al., 1998a; 20- Sol Morales et al., 2000b; 21- Solomon et al., 2000; 22- Fritsche e Steinhart, 1998a; 23- Timmen e Patton, 1988; 24- Chilliard et al., 1999; 25- Donovan et al., 2000; 26- Franklin et al., 1999; 27- Sauer et al., 1998; 28- Zegarska et al., 1996; 29- Precht e Molkentin, 1997; 30- Jahreis et al., 1997; 31- Kelly et al., 1998a; 32- Chouinard et al., 1999a; 33- Chouinard et al., 1999b; 34- Giesy et al., 1999; 35- Gulati et al., 2000; 36- Baumgard et al., 2000; 37- Griinari et al., 2000; 38- Collomb et al., 2001; 39- Elgersma et al., 2004; 40- Rego et al., 2004; 41- Rego et al., 2005a; 42- Rego et al., 2005b; 43- Couvreur et al., 2006; 44- Or-Rashid et al., 2008; 45- Rego et al., 2008b; 46- Rego et al., 2009; 47- Chilliard et al., 2001; 48- Whitlock et al., 2002; 49- AbuGhazaleh et al., 2002b; 50- Loor et al., 2005a; 51- White et al., 2001; 52- Schroeder et al., 2003; 53- Ward et al., 2003; 54- Kelly e Bauman, 1996; 55- Collomb et al., 2004b; 56- Ryhänen et al., 2005; 57- Chilliard et al., 2007; 58- Schroeder et al., 2004; 59- AbuGhazaleh e Holmes, 2007; 60- Flowers et al., 2008.

3.2. Factores que influenciam os níveis de CLA da gordura do leite para além da dieta

A concentração de CLA na gordura nos alimentos destinados ao consumo humano pode variar muito consoante diversos factores como o indivíduo, o rebanho, a estação do ano (Parodi, 1977; Kelly et al., 1998a,b), o número de lactações (Lawless et al., 1998), a raça, a espécie, a idade, as condições ambientais individuais (Jahreis et al., 1999), o regime alimentar, os AG da dieta, factores associados à gestão das explorações agrícolas (Jahreis et al., 1999), altitude das pastagens, composição botânica da pastagem, frescura da erva, suplementação e o processamento do alimento (Van Wijlen e Colombani, 2010). Para além destes factores, esta variação deve-se predominantemente à dieta (Jahreis et al., 1997; Collomb et al., 2006), sendo afectada pela razão forragem/concentrado (Griinari et al., 1998a), nível de ingestão (Timmen e Patton, 1988; Jiang et al., 1996) e com o nível de suplementação com lípidos, especialmente óleos de plantas, que são ricos em ácido linoleico (McGuire et al., 1996; Stanton et al., 1997; Griinari et al., 1998a; Kelly et al., 1998b).

As concentrações típicas de CLA na gordura do leite são de 3 a 6 mg/g de gordura, mas os níveis de CLA no leite podem variar muito entre explorações (Kelly e Bauman, 1996). Banni et al. (1996) descobriram importantes variações sazonais, relacionadas com a dieta, nos conteúdos de CLA no leite. Estas variações são devidas, maioritariamente, a influências sazonais na pastagem (Stanton et al., 1997). Os níveis mais elevados de CLA no leite foram verificados no princípio do Verão, coincidindo com o consumo de pastagem de qualidade pelas vacas (Parodi, 1977). Outros estudos de variação sazonal da concentração de CLA na gordura do leite mostraram níveis mais elevados na Primavera e no Verão, o que coincidiu com o período de pastoreio por excelência, e concentrações mínimas de CLA no Inverno quando os animais foram estabulados (Riel, 1963; Jahreis et al., 1997; Dunshea et al., 2008; Ferlay et al., 2008; Rego et al., 2008a).

Rule et al. (2002) concluíram que os produtos alimentares provenientes de não-ruminantes possuem menores teores de CLA, comparativamente aos produtos alimentares provenientes de ruminantes.

As vacas Holstein em confinamento e na pastagem, produziram mais CLA, do que as vacas Jersey com o mesmo regime alimentar, embora segundo Lawless et al. (1999), o factor raça não afecte muito os níveis de CLA no leite. Estes autores

concluíram, que a raça Montbeliardes tem tendência a produzir mais CLA, na gordura do leite, do que outras raças estudadas. White et al. (2001) e Hollo et al. (2005) concluíram a raça Brown-Swiss produziu leite com um teor em CLA superior ao da raça Holstein Frisien, que por sua vez foi superior ao da raça Jersey. Lawless et al. (1999) verificaram uma maior variação do teor de CLA entre vacas do que entre raças, indicação de que existem outros factores com maior influência sobre o teor de CLA no leite. O conteúdo em CLA do leite não foi correlacionado com o volume de leite produzido, nem com o conteúdo em gordura no leite. No entanto, a concentração de CLA no leite, foi positivamente correlacionada com a concentração de C18:1 *trans*-11.

Verificou-se que com o aumento do número de lactações, as vacas aumentam o teor de CLA no leite, uma vez que as vacas com mais de 4 anos de idade, possuem concentrações mais elevadas, relativamente a primíparas (Stanton et al., 1997), no que respeita à fase da lactação, este factor não foi importante para os teores de CLA no leite.

O teor em CLA na carne e na gordura dos produtos alimentares foi superior na raça Hungarian Grey, comparativamente à Holstein Frisien (Wachira et al., 2002). Tsiplakou et al. (2006) verificaram valores mais elevados em CLA na carne e na gordura de carneiro da raça Soay, comparativamente às raças Friesland e Suffolk. Esta última apresentou os valores mais baixos. Tsiplakou et al. (2008) constataram não haver influência da raça no conteúdo em CLA no leite de ovelha. De Smet et al. (2004) e Lock et al. (2005) consideraram que as variações inter-individuais e a gordura específica da raça, provavelmente, têm maior influência no teor de CLA dos alimentos, do que os efeitos da raça.

O conteúdo em CLA foi menor nos produtos de animais alimentados em pastagens de zonas baixas, comparativamente a zonas de montanha (Collomb et al., 2001; Or-Rashid et al., 2008). A utilização de monoculturas e de espécies pobres a nível nutricional na alimentação dos animais levou a uma redução do teor de CLA e, pelo contrário, a utilização de trevo e de outras espécies ricas nutricionalmente aumentou o teor de CLA dos alimentos (Couvreux et al., 2006; Or-Rashid et al., 2008). Para além disso, a utilização de ervas maduras e de ervas conservadas sob a forma de feno ou silagem deram origem a menores teores em CLA nos alimentos, do que a erva fresca (Dhiman et al., 1999a; Elgersma et al., 2004).

Lock et al. (2005) consideraram ainda que o processamento dos alimentos não teve influência no seu conteúdo em CLA ou teve efeitos insignificantes.

CAPÍTULO II

TRABALHO EXPERIMENTAL

1. MATERIAL E MÉTODOS

1.1. Animais

Do efectivo leiteiro da Granja da Universidade dos Açores foram escolhidas 8 vacas multíparas em lactação da raça Holstein, tendo em conta os dias de lactação (175 ± 25 dias), a produção de leite ($24,9 \pm 4,3$ kg) e o peso vivo dos animais (562 ± 50 kg).

1.2. Alimentos

Durante os Períodos I e III todas as vacas tiveram a pastagem como base da dieta, em regime *ad libitum*, pastoreando a um encabeçamento fixo de 2,5 vacas/ha. A pastagem encontrava-se a 390 metros de altitude e era constituída por uma consociação de gramíneas e leguminosas onde as espécies dominantes eram o azevém perene (*Lolium perenne*) e o trevo branco (*Trifolium repens*). As vacas foram suplementadas com um concentrado farinado constituído por farinha de milho e por um prémix vitamínico-mineral, sendo fornecidos 2,5 kg de concentrado em cada ordenha. Os animais tiveram livre acesso a água que se encontrava em tanques em cada uma das parcelas destinadas ao pastoreio.

Durante o Período II os animais foram alimentados com uma Ração Completa de Mistura (RCM) constituída por 60% de silagem de milho produzida na própria exploração da Granja Universitária e por 40% de concentrado, com base na matéria seca. As matérias-primas e as proporções percentuais utilizadas na formulação deste concentrado encontram-se descritas no Quadro 11. Os animais tiveram acesso a água proveniente de bebedouros individuais situados em cada um dos parques.

Período I – Pastoreio + 5 kg de concentrado/ vaca/ dia

Período II – Ração Completa de Mistura (60% silagem de milho + 40% de concentrado, com base na matéria seca)

Período III – Pastoreio + 5 kg de concentrado/ vaca/ dia

Quadro 11 – Composição da RCM.

Ingredientes	% MS
Silagem de milho	60
Cevada	11.2
Milho	8
Bagaço de soja	19.2
Carbonato de cálcio	0.4
Bicarbonato de Sódio	0.4
Premix mineral ^a	0.8

^a MINERVET 2/1; Vetagri Alimentar, SA, Cantanhede, Portugal.

1.3. Delineamento Experimental

O ensaio teve lugar na Granja Universitária situada aproximadamente a 390 metros de altitude. Decorreu durante os meses de Fevereiro, Março e Abril, com a duração de 52 dias.

O ensaio foi delineado em 3 fases: a primeira fase (Período I) teve a duração de 10 dias e os animais foram alimentados com pastagem e suplementados com 5 kg de concentrado, fornecido na altura da ordenha; a segunda fase (Período II) teve a duração de 21 dias e os animais foram alimentados com uma RCM *ad libitum*; a terceira fase (Período III) teve a duração de 21 dias e o regime alimentar foi igual ao do Período I.

1.4. Maneio e Medições

Nos Períodos I e III foi efectuado pastoreio rotacional, com um intervalo de 21 dias entre 2 turnos sucessivos de pastoreio. As vacas pastorearam a um encabeçamento fixo de 2,5 vacas/ha. O concentrado foi fornecido na sala de ordenha, em partes iguais na ordenha da manhã e da tarde. Nos últimos 2 dias do 1º período e nos dias 2, 4, 7, 15 e 21, do 3º período, foram recolhidas amostras de pastagem, aleatoriamente ao longo da parcela. No último dia destes períodos também foram recolhidas amostras de concentrado.

O cálculo da ingestão individual de erva na pastagem (média por cada período de medições) foi feito através do método baseado na performance animal (Baker, 1982). Desta forma, foram tidas em conta as necessidades em energia metabolizável (EM) dos

animais, determinadas pelo somatório das necessidades de manutenção, de produção, de gestação e variação do peso vivo, deduzindo a EM fornecida pelo concentrado, e dividindo pelo valor energético da pastagem ($EM/kgMS^{-1}$), de acordo com a fórmula:

$$\text{Ingestão MS} = (EM_m + EM_p + EM_g + EM_{\Delta PV}) - (EM_c) / EM \text{ pastagem Kg}$$

EM_m = energia metabolizável para manutenção, $Mj \text{ dia}^{-1}$

EM_p = energia metabolizável para produção, $Mj \text{ dia}^{-1}$

EM_g = energia metabolizável para gestação, $Mj \text{ dia}^{-1}$

$EM_{\Delta PV}$ = energia metabolizável para ganho de peso vivo, $Mj \text{ dia}^{-1}$

EM_c = energia metabolizável ingerida sob a forma de concentrado, $Mj \text{ dia}^{-1}$

As necessidades em EM para manutenção e produção foram determinadas pelo sistema proposto pelo MAFF (1975). Foram adicionados às necessidades de manutenção, 20% para a actividade física dentro do tipo de manejo e exposição às condições de naturais do meio ambiente (Baker, 1982). As necessidades para produção foram determinadas através da produção de leite e da sua composição em gordura e proteína (Tyrell e Reid, 1965), pela variação do peso vivo ao longo do ensaio e pelas necessidades de gestação (MAFF, 1975). A estimativa do valor em EM ($Mj/kg MS^{-1}$) das forragens e do concentrado foi determinada através de equações de previsão propostas por MAFF (1975), que são baseados na digestibilidade da MO *in vitro*.

No Período II as vacas foram estabuladas em parques individuais com acesso a uma manjedoura com bebedouro. A RCM foi distribuída a cada animal duas vezes por dia, sendo a primeira distribuição realizada depois da ordenha da manhã e a segunda depois da ordenha da tarde. A RCM foi fornecida *ad libitum* tendo sido efectuados acertos em relação à quantidade de alimento distribuída na ordem dos 15%. Todas as manhãs, antes da primeira distribuição de RCM, foi efectuada uma pesagem individual do refugo. Durante os dias de amostragem e medições (2, 4, 7, 15 e 21), procedeu-se à recolha de amostras de RCM e de refugo para posterior análise laboratorial. A ingestão individual durante o 2º período foi calculada, diariamente, a partir da diferença entre o alimento fornecido e o refugo.

A produção de leite individual (ordenha da manhã e da tarde) diária foi medida durante todo o ensaio, e foram recolhidas duas amostras de leite individuais em cada ordenha nos dias de amostragem (dia 10 do Período I e dias 2, 4, 7, 15 e 21 dos

Períodos II e III). Uma amostra de leite da ordenha da manhã e outra da ordenha da tarde foram levadas para o SERCLAT, imediatamente a seguir à ordenha, onde se procedeu à análise da gordura e da proteína. Foram obtidas amostras de leite compostas, misturando o leite das ordenhas da manhã e da tarde de cada animal em quantidades proporcionais à produção em cada uma das ordenhas. Estas foram congeladas para a posterior determinação do perfil dos AG da gordura do leite, na Estação Zootécnica Nacional.

Os animais foram pesados nos últimos dois dias de cada período, após a ordenha da manhã.

1.5. Metodologia Analítica

1.5.1. Análise química dos alimentos e do leite

A caracterização química dos alimentos (pastagem, concentrados, silagem de milho e mistura (silagem de milho com concentrado) foi efectuada no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Ciências Agrárias da Universidade dos Açores. Para a determinação da matéria seca (MS), cinza bruta (CB), azoto total (N), proteína bruta (PB) e extracto etéreo (EE) recorreu-se ao sistema de WEENDE (AOAC, 1995). A matéria seca (MS) e a matéria seca corrigida das amostras foram determinadas numa estufa a 65°C e 105°C, respectivamente, até peso constante. De seguida, as amostras foram moídas num moinho de martelos com crivo de malha de 1 mm. A CB foi determinada por incineração numa mufla eléctrica a 550°C, durante 12 horas. O N foi determinado pelo método de Kjeldahl, utilizando como catalizador o selénio. A PB foi determinada utilizando a fórmula $\% N \times 6,25$. Para a determinação do EE, a gordura bruta foi extraída com éter de petróleo, por extracção a quente durante 1,30 horas no Soxhlet. A fibra da parede celular vegetal, definida pelas fracções do NDF (fibra insolúvel em detergente neutro), ADF (fibra insolúvel em detergente ácido) e ADL (fibra insolúvel em H₂SO₄), foram determinadas de acordo com os métodos propostos por Goering e Van Soest (1970).

A determinação dos teores butiroso e proteico foi realizada por infravermelhos (Milk-Scan 4000), no SERCLA – Terceira.

1.5.2. Digestibilidade *in vitro* da pastagem e da RCM

A digestibilidade *in vitro* das amostras foi determinada pelo método das duas etapas de Tilley e Terry (1963), modificado por Alexander e McGowan (1966). Foram colocadas 0,5 g de amostra de alimento, previamente moídas, em duplicado em tubos de ensaio de 150 ml. A cada tubo foi adicionada uma mistura 40 ml de solução tampão (saliva sintética) (McDougall, 1948) e 10 ml de suco de rúmen, previamente filtrado em gaze e borbilhado com CO₂. Os tubos foram fechados com rolhas munidas de válvulas de Bunsen, que impedem a entrada de ar e ao mesmo tempo permitem a saída dos gases de fermentação, permitindo a permanência de condições de anaerobiose. Os tubos foram depois colocados em banho-maria a 39 °C, durante 48 horas, com agitação diária ligeira e ocasional. Após esta primeira etapa de digestão microbiana, a fermentação foi parada pela adição de HCl 2,2 N até pH = 1,2. De seguida foram adicionados 50 ml de uma solução de pepsina ácida, com nova incubação à mesma temperatura, durante 48 horas. O conteúdo de cada tubo foi filtrado para cadinhos de porosidade G₂ e os resíduos insolúveis foram lavados em água e secos a 100°C, até peso constante. Os dois padrões em duplicado (amostras de forragem de digestibilidade *in vivo* conhecidas), tal como os ensaios em branco, correram em simultâneo e em paralelo.

O suco ruminal foi fornecido por 2 ovinos adultos, com alimentação padronizada com base em feno de qualidade média e concentrado. O suco de rúmen foi retirado através de uma sonda esofágica e a colheita do inóculo foi feita antes da distribuição matinal da ração, tendo sido utilizado material previamente aquecido a 39 °C.

1.5.3. Determinação quantitativa e qualitativa dos ácidos gordos em amostras de alimento e leite

A determinação do perfil dos ácidos gordos da gordura do leite e das amostras de alimento foi efectuada na Estação Zootécnica Nacional (EZN) – Fonte Boa – Vale de Santarém.

1.5.3.1. Extracção de lípidos em alimentos e em gordura de leite

Foi utilizado o mesmo método de extracção lipídica, tanto nas amostras de alimento como nas amostras de leite. A extracção foi feita utilizando o método clássico

de isolamento e purificação de lípidos totais de tecidos animais de Folch et al. (1957), modificado pela EZN (não publicado).

Material e Métodos da Extracção de Lípidos:

1- Pesar cerca de 0,150 g de gordura de leite fresco, para cada tubo devidamente identificado. No caso dos alimentos, pesar cerca de 0,3 g de concentrado fresco e mistura liofilizada, e cerca de 0,5 g de pastagem liofilizada.

2- No caso das amostras liofilizadas, adicionar 2,5 ml de metanol e colocar 10 minutos no aparelho de ultra-sons a 40°C, para humedecer, após o que se adiciona 5 ml de diclorometano. Levar novamente ao aparelho de ultra-sons durante 30 minutos a 37°C.

2.1- No caso de a amostra ser fresca, adicionar 7,5 ml da solução diclorometano: metanol (2:1), agitar no vortex durante alguns segundos e colocar no aparelho de ultra-sons durante 30 minutos a 37°C.

3- Centrifugar durante 5 minutos à velocidade máxima (2500 rpm), para separar a fase sólida da fase orgânica que contém os lípidos.

4- Recolher a fase líquida para um novo tubo e ao tubo que contém a fase sólida adicionar 5 ml de diclorometano: metanol (2:1).

5- Agitar no vortex e colocar durante mais 30 minutos no aparelho de ultra-sons a 37°C.

6- Centrifugar durante 5 minutos à velocidade máxima de 2500 rpm, para separar a fase sólida da fase orgânica que contém os lípidos. Recolher esta última fase para o mesmo tubo do passo 4.

7- Adicionar ao tubo que contém a fase orgânica, 2 ml de solução salina (cloreto de potássio 0,8%), e agitar no vortex durante alguns segundos.

8- Centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm, para separar a fase aquosa (superior), da fase orgânica (inferior).

9- Retirar a fracção inferior, que contém os lípidos, com a ajuda de uma pipeta de Pasteur, para um tubo já contendo 1 g de sulfato sódico anidro.

10- Centrifugar durante 5 minutos, para retirar o sulfato sódico anidro.

11- O tubo com a fase orgânica vai a evaporar em corrente de azoto a 40 - 45°C, num evaporador – METALBLOCK – Thermostats Labtherm com bloco de aquecimento, não deixando secar totalmente.

12- Após a obtenção do extracto lipídico, segue-se a metilação (transesterificação).

1.5.3.2. Transesterificação (Metilação Básica)

Depois de obter o extracto lipídico é necessário convertê-lo em derivados não polares de baixo peso molecular, para poderem ser analisados por cromatografia gasosa (GC) (Christie, 1994; Yamasaki et al., 1999). Se assim não fosse, seria muito difícil analisá-los por GC devido à sua baixa volatilidade e alta polaridade (Brondz, 2002).

Os lípidos acyl são transesterificados muito rapidamente em metanol anidro na presença de um catalizador básico, o metóxido de sódio, no sentido da obtenção de um éster metílico (Figura 1.2). O metóxido de sódio facilita as trocas entre a cadeia de glicerol e o metanol. Se esta reacção ocorresse em meio ácido havia o risco da criação de isómeros dos PUFA (Christie, 1994).

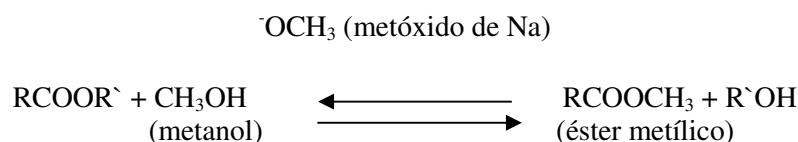


Figura 1.2 – Mecanismo geral da transesterificação.

Deve haver o cuidado de excluir totalmente toda a água do meio para prevenir a formação de ácidos gordos livres, resultantes da hidrólise de lípidos, que não são metilados por este método. A reacção é muito rápida, os fosfoglicéridos são completamente transesterificados em poucos minutos à temperatura ambiente. Os fosfolípidos e os triglicéridos são esterificados rapidamente (1 hora). Para os ésteres de colesterol deve-se deixar a metilar de um dia para o outro (Christie, 1994).

Material e métodos da Metilação Básica (Transesterificação):

- 1- Diluir a amostra em 1 ml de tolueno seco e adicionar, logo de seguida, 2 ml de metóxido de sódio em metanol anidro 0,5 M.
- 2- Manter a solução à temperatura ambiente durante 2 horas e 30 minutos.
- 3- Depois desse repouso, juntar 0,1 ml de ácido acético glacial e 5 ml de água ultra-pura.
- 4- Os ésteres são extraídos com duas lavagens de 5 ml de n-hexano.

- 5- Adicionar 5 ml de n-hexano, agitar no vortex e centrifugar durante 5 minutos, à velocidade de 2500 rpm.
- 6- Retirar a fase orgânica usando uma pipeta de Pasteur, para um tubo contendo já cerca de 1 g de sulfato de sódio anidro. Repetir os passos 5 e 6, colocando a fase orgânica no mesmo tubo.
- 7- Centrifugar, durante 5 minutos à velocidade máxima de 2500 rpm, para separar o n-hexano do sulfato sódio anidro.
- 8- Nas amostras de alimento, devido à sua pigmentação, junta-se cerca de 1 g de carvão activado, agita-se no vortex, vai a centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm e filtra-se a solução para um novo tubo, para evitar resíduos de carvão activado.
- 9- Colocar os tubos a evaporar em corrente de azoto, nas mesmas condições que na Extracção. Reconstituir com 2 ml de hexano para GC e colocar num vial para levar ao GC.

1.5.4. Cromatografia Gasosa

A cromatografia é um método físico de separação, no qual os componentes a serem separados são distribuídos entre duas fases: a fase estacionária (líquido), e a fase móvel (gás). É utilizada com o objectivo de identificar e quantificar os AG presentes numa amostra. Os AG estão eluídos num solvente, como o hexano, e são submetidos a uma alta temperatura para volatilizarem. A amostra é introduzida numa corrente de gás inerte, que actua como gás de arraste (as amostras líquidas vaporizam-se antes da injeção no gás de arraste). O fluxo de gás passa pela coluna, que está a uma temperatura elevada, através da qual os componentes da amostra se deslocam a velocidades diferentes, influenciadas pelo grau de interacção de cada componente com a fase estacionária, não volátil. Os AG que têm maior afinidade com a fase estacionária são retidos por mais tempo e são separados daqueles com menor interacção. À medida que os AG eluem da coluna podem ser quantificados por um detector. A sua identificação é feita com base nos tempos de retenção e em comparação com os tempos de saída de AG conhecidos.

O cromatógrafo utilizado foi um Hewllet-Pakard HP5890A série II, equipado com um detector de chama ionizante (FID), que trabalhava com hidrogénio como fase móvel. O injector operava a 250°C e o detector a 280°C. A coluna esteve a uma temperatura de 150°C, durante 20 minutos, de seguida foi aumentando 5°C/min, até

atingir um novo patamar, permanecendo nesse patamar 70 minutos, posteriormente, aumentou mais 5°C/min até o último patamar, onde permaneceu mais 45 minutos. O tempo total da corrida foi de 160 minutos. A análise dos ésteres metílicos foi feita utilizando um sistema de injeção automático e uma coluna capilar de sílica fundida (Sulpeco SP – 2380) com 100 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 µm de espessura de camada estacionária.

Pelo que foi estabelecido pelo esboço da Norma Portuguesa – Documento de Trabalho (1996), os picos dos cromatogramas devem ser identificados de acordo com o seu tempo de retenção e por comparação com alguns ácidos gordos. Foram feitas coeluições das amostras com AG padrão para identificar correctamente alguns ácidos.

1.5.5. Quantificação – cálculo e apresentação dos resultados da metilação básica

Os AG individuais foram calculados como percentagem da área de cada pico, em relação à área dos picos totais inscritos no integrador. Os resultados da extracção alcalina foram expressos em percentagem do total de AG.

1.6. Análise Estatística

A produção diária de leite e a ingestão e composição do leite a partir do último dia do Período I, e nos dias 2, 4, 7, 15 e 21 dos Períodos II e III foram analisados como medidas repetidas pelo procedimento MIXED do SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC, 1989). O modelo incluiu os efeitos fixos da dieta, dieta em interacção com o tempo, o efeito aleatório do animal e o erro aleatório residual. O tempo foi considerado uma medida repetida. A IMS inicial foi usada como covariável (todas as vacas estavam numa fase da lactação posterior ao pico de produção de leite). A estrutura de covariância auto-regressiva de primeira ordem (AR (1)) foi utilizada de acordo com o critério de informação Akaike da amostra finita corrigida e o critério de informação Bayesiano de Schwarz (Wang e Goonewardene, 2004). As declarações de contraste foram incluídas no modelo para avaliar as diferenças entre os tratamentos.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Composição química dos alimentos e dos seus AGs

Os resultados da composição química dos alimentos: pastagem, concentrado e ração completa de mistura, e a sua composição em AG estão descritos no Quadro 12. A pastagem era de alta qualidade possuindo valores médios de 28,8% de PB (com base na MS), e 55% de NDF. No Período III, a pastagem apresentou teores de PB mais elevados e teores de ADF e ADL mais baixos, do que no Período I. Como esperado, o ácido linolénico (C18:3 n-3) foi o principal AG presente nas amostras de pastagem (Loor et al., 2002). A composição química do concentrado foi concordante com a composição dos ingredientes. A RCM composta por 60% de silagem de milho e 40% de concentrado (com base na MS) conteve 16.1% PB, 26.3% NDF, e 35.2% de amido. Os AG mais representativos do concentrado e da RCM foram o ácido oleico (C18:1 *cis*-9) e o ácido linoleico (C18:2 n-6), em concordância com a composição em AG do milho grão.

Quadro 12 – Composição química, digestibilidade *in vitro*, e composição em ácidos gordos dos alimentos utilizados no ensaio.

Item	Pastagem		Concentrado ^a		RCM ^b
	Período I	Período III	Período I	Período III	
MS %	16.0	14.3	90.3	90.0	56.4
	% MS				
CB	9.1	8.7	3.1	4.7	8.4
PB	25.6	32.0	9.8	10.5	16.1
EE	2.5	2.4	2.6	2.6	2.1
NDF	55.0	54.9	10.3	11.3	26.3
ADF	25.7	23.2	3.3	3.4	17.0
ADL	2.4	2.1	ND ^c	ND	2.9
Amido	ND	ND	64.5	63.7	35.2
Digestibilidade MS <i>in vitro</i>	69.1	70.3	90.9	90.8	83.8
Ácidos gordos	g/100 g ácidos gordos totais				
14:0	0.4	0.4	0.1	0.1	1.0
16:0	8.5	8.5	10.3	11.3	13.6
18:0	0.6	0.6	1.9	1.7	2.3
18:1 <i>cis</i> -9	1.2	1.2	26.5	26.3	16.1
18:2 n-6	8.4	8.5	55.3	55.0	54.1
20:0	-	-	0.4	0.3	-
18:3 n-3	74.6	75.2	1.4	1.6	5.6

^a Concentrado à base de milho (96% milho grão, 0.5% sal, e 3.5% premix mineral MINERVET 2/1; Vetagri Alimentar, SA, Cantanhede, Portugal).

^b 60% silagem de milho e 40% concentrado.

^c Não determinado.

2.2. Ingestão e performance animal

Os efeitos na ingestão, produção e composição do leite, e peso corporal estão representados no Quadro 13. A IMS total não diferiu entre o Período I e o Período III, mas foi mais elevada no Período II, quando os animais foram alimentados com uma RCM. Isto está de acordo com estudos anteriores que registaram IMS mais baixas em vacas leiteiras alimentadas apenas na pastagem (Kolver e Muller, 1998) ou pastagem com concentrado (Bargo et al., 2002) comparativamente a vacas alimentadas com RCM, mas em contraste com os resultados de Schroeder et al. (2003), que não observaram diferenças significativas na IMS total de vacas alimentadas com uma RCM baseada em silagem de milho, ou pastagem suplementada com concentrados baseados em milho, ou substituindo parcialmente o milho com sais de Ca de AG.

Quadro 13 – Ingestão, produção de leite, composição do leite e peso vivo nos diferentes períodos experimentais^a.

	PC1	RCM	PC2	EPM	Efeito		Contraste	
					Dieta	Dieta x Tempo	RCM vs PC1, PC2	PC1 vs PC2
IMS								
Pastagem, kg/d	15.9	-	15.7	0.31	<0.001	<0.001	<0.001	0.546
Silagem, kg/d	-	14.5	-	0.29	<0.001	0.005	<0.001	1.000
Concentrado, kg/d	4.5	9.7	4.5	0.19	<0.001	0.005	<0.001	0.959
Total, kg/d	20.4	24.2	20.2	0.56	<0.001	0.001	<0.001	0.774
Leite								
Produção, kg/d	24.9	27.2	26.3	1.27	<0.001	<0.001	<0.001	0.093
ELC ^b , kg/d	27.2	27.0	26.7	1.17	0.855	<0.001		
Gordura, %	4.06	3.45	3.84	0.142	<0.001	0.003	<0.001	0.076
Proteína, %	3.42	3.36	3.39	0.044	0.505	0.490		
Gordura, kg/d	1.01	0.92	0.95	0.043	0.026	<0.001	0.009	0.133
Proteína, kg/d	0.84	0.89	0.85	0.042	0.073	<0.001	0.022	0.787
PL/IPB ^c	0.19	0.23	0.16	0.009	<0.001	0.003	<0.001	0.006
Peso vivo, kg	572	576	573	15.1	0.243	0.875		

^a PC1 = Pastagem *ad libitum* suplementada com 5 kg/d de concentrado durante os primeiros 10 dias do ensaio; RCM = ração completa de mistura constituída por 60% de silagem de milho e 40% de concentrado durante 21 dias; PC2 = Pastagem *ad libitum* suplementada com 5 kg/d de concentrado durante os últimos 21 dias do ensaio. ^b Energia do leite corrigida, calculada segundo a fórmula: $(0.324 \times \text{kg leite}) + (12.95 \times \text{kg gordura do leite}) + (7.20 \times \text{kg proteína do leite})$. ^c Proteína leite/Ingestão PB.

Apesar do aumento da IMS quando as vacas foram mudadas para a dieta de RCM, os valores máximos não foram imediatamente atingidos (Figura 2.2). Esta resposta pode ser atribuída à mudança abrupta de dieta e também à dificuldade de adaptação das vacas, habituadas ao pastoreio, ao estábulo. Quando transitaram da RCM para a pastagem, as vacas apresentaram um declínio imediato na IMS.

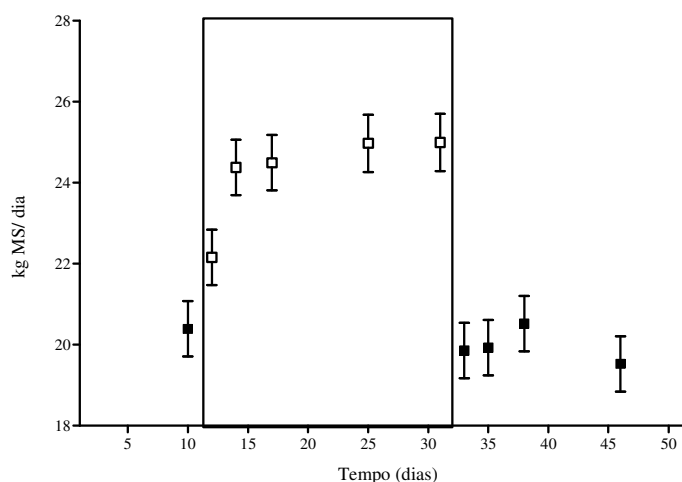


Figura 2.2 – Alterações na ingestão de matéria seca total. Os símbolos a cheio são relativos aos Períodos I e III quando as vacas estiveram em pastoreio, suplementadas com um concentrado à base de milho. Os símbolos vazios são relativos ao Período II quando os animais foram alimentados com uma RCM à base de silagem de milho.

A produção de leite variou entre períodos (Figura 3.2), provavelmente reflectindo as alterações diárias no valor nutritivo dos alimentos. A produção de leite foi significativamente mais elevada quando as vacas foram alimentadas com RCM (Período II). Os efeitos observados na produção de leite não são totalmente explicados pelas diferenças na IMS, uma vez que este parâmetro não apresentou diferenças entre os Períodos I e III, mas a produção de leite foi maior no Período II. Esta diferença pode ser atribuível ao menor conteúdo em fibra da pastagem. Estudos anteriores que compararam dietas de RCM com dietas baseadas na pastagem registaram produções de leite mais baixas em vacas em pastoreio com (White et al., 2001; Agenäs et al., 2002; Bargo et al., 2002) ou sem suplementação com concentrado (Kolver e Muller, 1998; Auldist et al., 2002). A menor produção de leite nas vacas alimentadas apenas com pastagem de alta qualidade comparativamente a vacas alimentadas com uma RCM nutricionalmente balanceada foi atribuída à menor IMS e à menor ingestão de energia (Kolver e Muller, 1998). Portanto, os concentrados que contêm ingredientes ricos em amido são

fornecidos a vacas em pastoreio para aumentar a ingestão de energia e a produção de leite, e para minimizar as perdas de condição corporal e eficiência reprodutiva (Bargo et al., 2002). Contudo, apesar de alguns estudos (Bargo et al., 2002; Reis e Combs, 2000a, 2000b; Soriano et al., 2000) referirem que a suplementação da pastagem com 8 a 9 kg/dia de concentrados à base de milho aumentou a IMS total em aproximadamente 21 kg/dia e manteve a produção de leite nos 30 kg/dia, ambos foram inferiores a quando os animais foram alimentados com RCM.

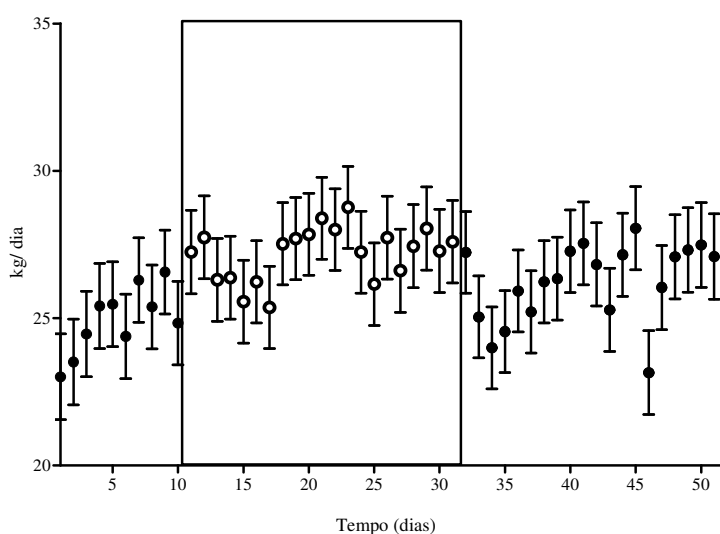


Figura 3.2 – Alterações diárias na produção de leite. Os símbolos a cheio são referentes aos Períodos I e III quando as vacas estiveram em pastoreio, suplementadas com um concentrado à base de milho. Os símbolos vazios são relativos ao Período II quando os animais foram alimentados com uma RCM à base de silagem de milho.

O teor de gordura do leite diminuiu quando as vacas foram alimentadas com a dieta de RCM (Figura 4.2), o que está em concordância com a maior ingestão de amido conseguida com esta dieta. Coincidiu também com o aumento da concentração de C18:1 *trans*-10 no Período II, que tem sido correlacionado negativamente com a gordura do leite (Kadegowda et al., 2008). Apesar de não significativo, foram observados teores de gordura ligeiramente superiores em vacas alimentadas com dietas apenas de pastagem em comparação com dietas de RCM (Kolver e Muller, 1998). Reciprocamente, Bargo et al. (2002) observaram percentagens de gordura no leite mais elevadas com vacas alimentadas em pastoreio com RCM parcial e RCM, do que vacas alimentadas na pastagem suplementadas com concentrado. Estes resultados foram atribuídos à maior

ingestão de fibra na pastagem de boa qualidade e à ingestão de concentrado separadamente da forragem, duas vezes ao dia. Isto pode também contribuir para explicar a ligeira diferença observada no teor de gordura do leite entre os Períodos I e III no presente estudo. Os efeitos observados na produção e no teor de gordura do leite foram reflectidos na produção de energia corrigida do leite. O teor de proteína não foi afectado pelos tratamentos da dieta, mas a eficiência de conversão do azoto da dieta em azoto do leite foi significativamente superior com a dieta de RCM. Estes resultados sugerem que a maior ingestão de PB nas dietas de pastagem foi usada ineficientemente, devido ao elevado conteúdo de azoto degradável no rúmen, em relação ao seu conteúdo em energia fermentescível. O efeito significativo observado na produção de proteína do leite reflecte claramente o efeito na produção de leite.

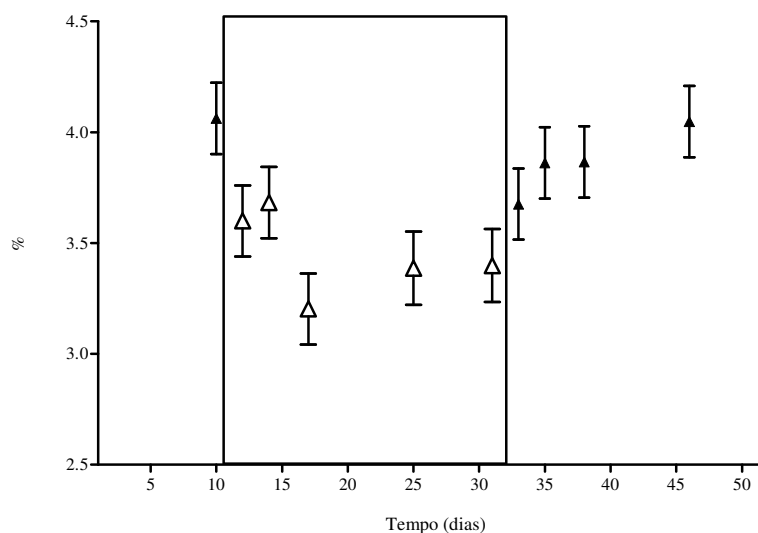


Figura 4.2 – Alterações no teor de gordura do leite. Os símbolos a cheio são referentes aos Períodos I e III quando as vacas estiveram em pastoreio, suplementadas com um concentrado à base de milho. Os símbolos vazios são relativos ao Período II quando os animais foram alimentados com uma RCM à base de silagem de milho.

2.3. Composição em AG da gordura do leite

A composição em AG da gordura do leite de C8:0 a C24:0, com excepção dos AG em C18:1 (Quadro 16), é dada no Quadro 14.

Quadro 14 – Ácidos gordos da gordura do leite (g/100 g de AG totais) produzidos nos diferentes tratamentos experimentais^a.

Ácidos Gordos	PC1	RCM	PC2	EPM	Efeitos			
					Dieta	Dieta x Tempo	RCM vs PC1, PC2	PC1 vs PC2
8:0	0.97	0.68	0.24	0.040	<0.001	<0.001	0.022	<0.001
10:0	2.65	3.08	1.72	0.150	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
10:1	0.30	0.27	0.20	0.018	<0.001	<0.001	0.040	<0.001
12:0	3.39	4.60	2.64	0.178	<0.001	<0.001	<0.001	0.001
14:0	10.88	12.23	9.39	0.330	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
14:1 <i>cis</i> -9	1.07	1.40	1.04	0.143	<0.001	<0.001	<0.001	0.721
15:0	1.24	2.01	1.29	0.093	<0.001	<0.001	<0.001	0.646
16:0	22.32	26.41	23.19	0.489	<0.001	<0.001	<0.001	0.147
16:1 <i>trans</i> -9	0.07	0.12	0.07	0.007	<0.001	<0.001	<0.001	0.522
16:1 <i>cis</i> -7	0.33	0.32	0.35	0.011	0.004	<0.001	0.018	0.062
16:1 <i>cis</i> -9	1.56	2.25	1.97	0.128	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
16:1 <i>cis</i> -13	0.13	0.18	0.14	0.016	0.051	<0.001	0.016	0.884
17:1 <i>cis</i> -8	0.09	0.08	0.09	0.004	0.049	<0.001	0.029	0.946
17:1 <i>cis</i> -9	0.24	0.37	0.36	0.030	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
18:0	12.13	8.41	12.61	0.651	<0.001	<0.001	<0.001	0.364
18:2 n-6	1.48	2.37	2.02	0.117	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
18:3 n-3	0.72	0.49	0.73	0.029	<0.001	<0.001	<0.001	0.885
20:0	0.16	0.13	0.16	0.008	<0.001	0.357	<0.001	0.505
20:1 n-9	0.11	0.09	0.12	0.007	0.001	0.475	0.002	0.154
20:3 n-3	0.02	0.03	0.03	0.005	0.521	0.565		
20:2 n-6	0.03	0.04	0.04	0.003	0.009	0.022	0.919	0.013
20:3 n-6	0.08	0.11	0.12	0.008	0.024	<0.001	0.344	0.006
20:4 n-6	0.09	0.14	0.14	0.009	<0.001	<0.001	0.004	<0.001
20:5 n-3	0.07	0.08	0.06	0.006	<0.001	<0.001	<0.001	0.338
22:0	0.06	0.05	0.06	0.004	0.008	0.636	0.008	0.938
22:2 n-6	0.08	0.04	0.04	0.003	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
22:4 n-6	0.10	0.12	0.11	0.004	<0.001	<0.001	<0.001	0.471
22:5 n-3	0.10	0.03	0.08	0.007	<0.001	<0.001	<0.001	0.003
23:0	0.04	0.03	0.04	0.002	<0.001	0.490	<0.001	0.405
24:0	0.05	0.03	0.06	0.010	0.042	0.239	0.104	0.437
Não identificados	3.80	2.72	1.50	0.086	<0.001	<0.001	0.004	<0.001

^a PC1 = Pastagem *ad libitum* suplementada com 5 kg/d de concentrado durante os primeiros 10 dias do ensaio; RCM = ração completa de mistura constituída por 60% de silagem de milho e 40% de concentrado durante 21 dias; PC2 = Pastagem *ad libitum* suplementada com 5 kg/d de concentrado durante os últimos 21 dias do ensaio.

O perfil dos AG da gordura do leite foi significativamente diferente nos Períodos I e III, quando os animais foram alimentados com pastagem, relativamente ao Período II, em que foram alimentados com uma RCM. A dieta afectou significativamente a concentração de todos os AG da gordura do leite, com excepção do C18:1 *trans*-12, C18:1 *cis*-12, 18:1 *cis*-15, e C20:3 n-3. A ingestão da RCM no Período II aumentou significativamente a concentração dos AGCC e AGCM (C10, C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C14:1 *cis*-9, C16:0 e C16:1 *cis*-9) e a concentração dos AGCL (C18:1 *trans*-10, C18:1 *cis*-11 e *cis*-12), assim como do C18:2 n-6. Durante os períodos de pastoreio (Períodos I e III) a gordura do leite possuiu uma concentração elevada ($P < 0.05$) dos mais representativos AGCL da gordura do leite (C18:0, C18:1 *cis*-9, C18:1 *trans*-11, C18:3 n-3, C18:2 *cis*-9,*trans*-11 CLA e C18:2 *trans*-11,*cis*-15). Portanto, a substituição da RCM pela pastagem na dieta de vacas leiteiras tornou a gordura do leite mais insaturada. A mesma situação foi verificada por Kelly et al. (1998a), Rego et al. (2004) e Khanal et al. (2008), quando as vacas passaram de uma dieta de RCM para a pastagem ou quando a dieta foi mais rica em ácido linolénico (Grummer, 1991). Não só o aumento da ingestão de AGCL presentes na pastagem inibiu a síntese *de novo* de AGCC e AGCM na GM (Dhiman et al., 1995), mas também vacas alimentadas com menos energia do que o necessário, produziram uma gordura com menos AGCC e AGCM, comparativamente ao leite de vacas alimentadas adequadamente (Timmen e Patton, 1988). A diminuição da concentração dos MUFA e PUFA com a dieta de RCM, pode ter sido causada pela menor ingestão de AGI (Harfoot e Hazlewood, 1997) e/ou pela redução da actividade da enzima Δ^9 desaturase (Baumgard et al., 2000). Rego e Almeida (2002) ao substituírem a pastagem por silagens de erva e de milho verificaram um aumento dos AGCC e AGCM e uma diminuição dos AGCL, particularmente do ácido oleico.

As alterações das concentrações dos principais AG da gordura do leite ao longo dos três períodos experimentais estão representadas graficamente nas Figuras 5.2, 6.2, 7.2 e 12.2. As concentrações dos AG láurico, mirístico e palmítico, os chamados ácidos gordos hipercolesterémicos, (respectivamente C12:0, C14:0 e C16:0) mostram um padrão sequencial semelhante (Figura 5.2). Globalmente, estes três AG tiveram a concentração mais elevada no dia 14, depois da transição da pastagem para a dieta de RCM, e a concentração mínima à volta do dia 4, depois da transição para a pastagem (Período III). Por exemplo, a concentração do ácido palmítico, o mais representativo AG na gordura do leite, foi de 22.6 g/100 g AG totais no Período I, aumentou para o

máximo de 28.1 g/100 g AG totais no Período II, e diminuiu para 24.4 g/100 g AG totais no dia 2 do Período III, atingindo a concentração mínima (20.5 g/100 g AG totais) no dia 14 do mesmo período experimental.

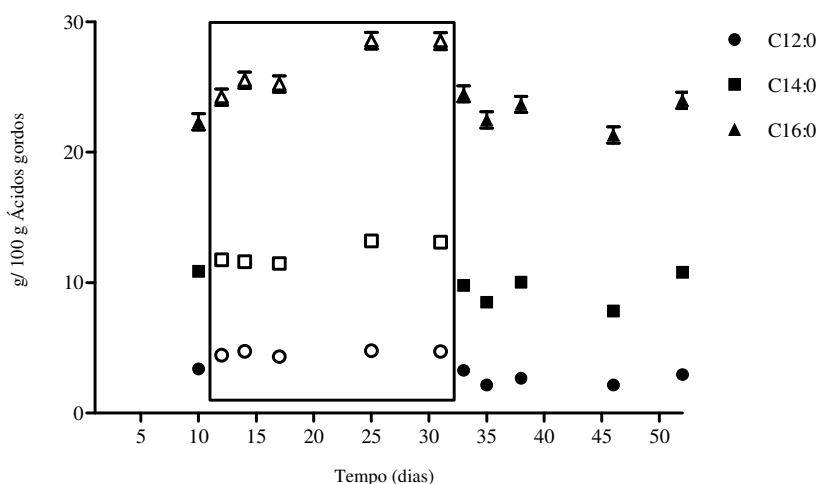


Figura 5.2 – Evolução da concentração dos AG hipercolesterémicos (C12:0, C14:0 e C16:0) ao longo dos períodos experimentais. Os símbolos a cheio são referentes aos Períodos I e III quando as vacas estiveram em pastoreio, suplementadas com um concentrado à base de milho. Os símbolos vazios são relativos ao Período II quando os animais foram alimentados com uma RCM à base de silagem de milho.

Em geral, os AGCL (com exceção do C18:2 n-6) exibiram um comportamento contrário relativamente aos AGCC e AGCM, cujas concentrações diminuíram imediatamente após a transição da pastagem para a RCM, e aumentaram dois dias após a mudança para a pastagem (Figura 6.2, 7.2, 12.2). A concentração dos AG esteárico (C18:0) e oleico (C18:1 cis-9), respectivamente 12.1 e 22.3 g/100 g AG totais no Período I, diminuiu gradualmente até ao dia 7 do Período II para 7.7 e 18.5 g/100 g AG totais, e depois estabilizou até ao dia 21, onde registaram 8.8 e 18.6 g/100 g AG totais, respectivamente (Figura 6.2). Depois da mudança para a pastagem (Período III), atingiram a concentração próxima do máximo no dia 4 com 12.9 e 28.3 g/100 g AG totais. Enquanto a concentração do ácido esteárico estabilizou, o ácido oleico apresentou maior variação entre os dias de amostragem.

A mudança das vacas da pastagem para a dieta de RCM resultou num aumento dramático da concentração de ácido linoleico de 1.48 para 2.72 g/100 g AG totais no dia 4 do Período II, o valor máximo obtido, decrescendo para 2.36 g/100 g AG totais no

último dia deste período. Depois da mudança para a pastagem a sua concentração decresceu gradualmente até atingir 1.32 g/100 g AG totais no dia 21. Na Figura 7.2 pode verificar-se que as concentrações do ácido C18:2 *trans*-11,*cis*-15 e do ácido linolénico decresceram rapidamente após a transição da pastagem para a RCM, enquanto a concentração do ácido linoleico aumentou, tal como foi documentado por Griinari e Bauman (1999). Depois da transição da RCM para a pastagem, verificou-se a situação inversa. Estes dados são consistentes com os resultados apresentados por Kelly et al. (1998a), Dhiman et al. (1999a), Rego et al. (2004) e Khanal et al. (2008).

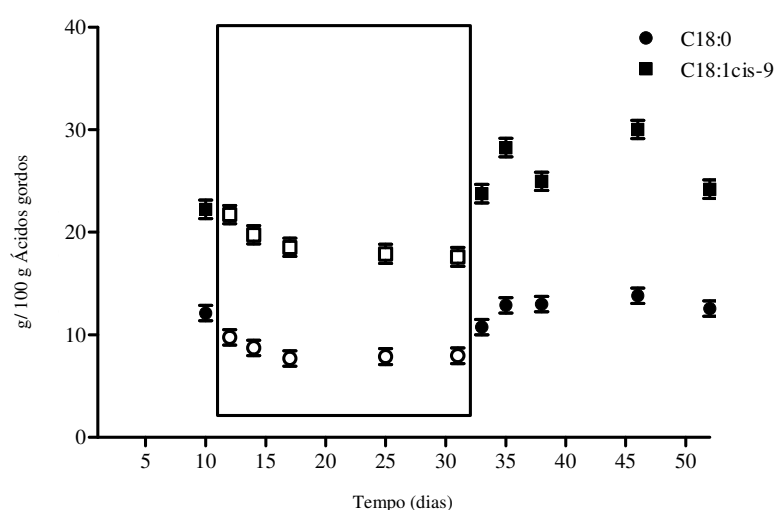


Figura 6.2 – Evolução da concentração do ácido esteárico (C18:0) e do ácido oleico (C18:1 *cis*-9) ao longo dos períodos experimentais. Os símbolos a cheio são referentes aos Períodos I e III quando as vacas estiveram em pastoreio, suplementadas com um concentrado à base de milho. Os símbolos vazios são relativos ao Período II quando os animais foram alimentados com uma RCM à base de silagem de milho.

As concentrações do AG α -linolénico e C18:2 *trans*-11,*cis*-15 (um AG intermediário da biohidrogenação do AG α -linolénico proveniente da dieta) mostraram um padrão muito similar ao longo dos períodos experimentais (Figura 7.2), espelhando a forte correlação entre estes dois AG ($r^2 = 0.86$, $n = 11$, $P < 0.001$ (a); $r^2 = 0.52$, $n = 86$, $P < 0.001$ (b); Figura 8.2). As suas concentrações foram, respectivamente, 0.70 e 0.38 g/100 g AG totais no Período I, diminuíram gradualmente para um mínimo de 0.38 e 0.13 g/100 g AG totais no dia 21 do Período II, atingindo a um máximo de 0.87 e 0.54 g/100 g AG totais no dia 7 do Período III.

Apesar da forte relação entre o ácido *trans*-vacénico (C18:1 *trans*-11) e o ácido ruménico (C18:2 *cis*-9,*trans*-11) ($r^2 = 0.61$, $n = 86$, $P < 0.001$), a evolução do padrão de concentração ao longo dos períodos experimentais foi ligeiramente diferente por causa da grande variabilidade do C18:1 *trans*-11 (Figura 12.2), maioritariamente durante a dieta de RCM. A concentração do ácido ruménico foi de 1.7 g/100 g AG totais no Período I, e diminuiu gradualmente até ao dia 21 da dieta de RCM, atingindo o mínimo de 0.44 g/100 g AG totais. Depois da transição para a pastagem a sua concentração aumentou gradualmente até ao sétimo dia e estabilizou a partir dessa altura, atingindo o valor máximo no dia 21 de 2.16 g/100 g AG totais. Portanto, o ácido ruménico aumentou 5 vezes mais desde o último dia da RCM (Período II) para o último dia de pastoreio (Período III). A concentração de C18:1 *trans*-11 diminuiu de 2.63 g/100 g AG totais no Período I para um mínimo de 1.32 g/100 g AG totais no dia 14 do Período II e depois da transição para a pastagem aumentou, atingindo o máximo de 3.82 g/100 g AG totais no dia 7 do Período III, estabilizando a partir daí.

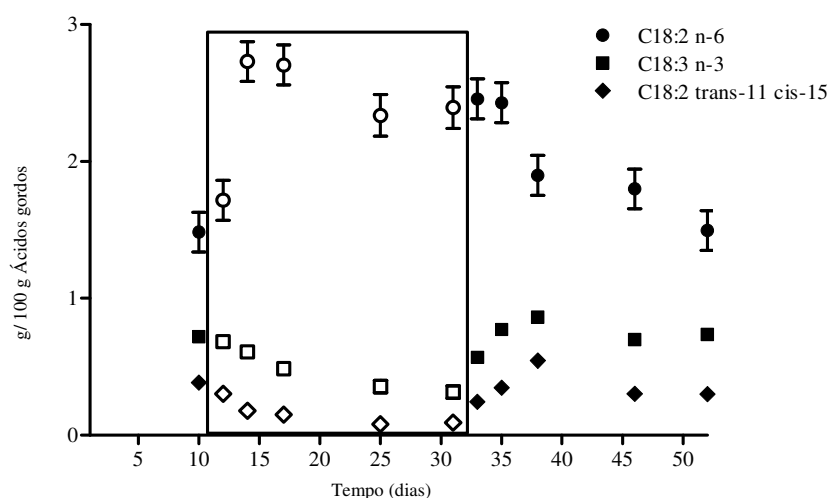
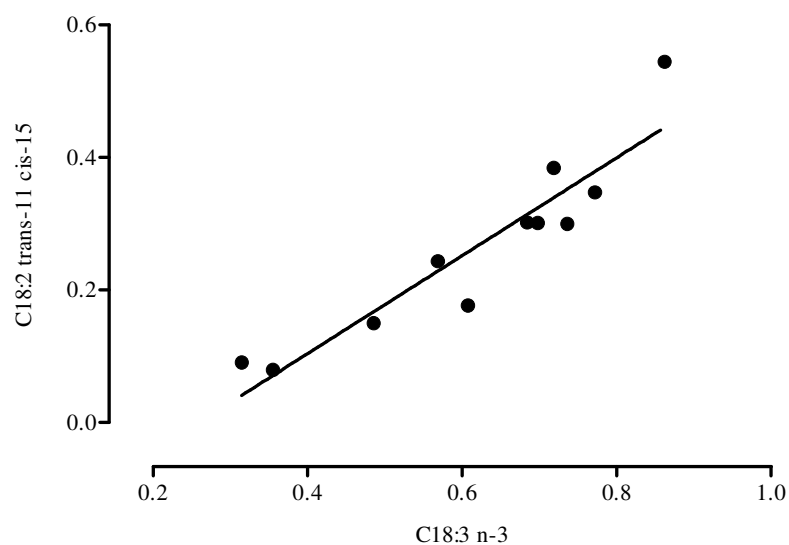


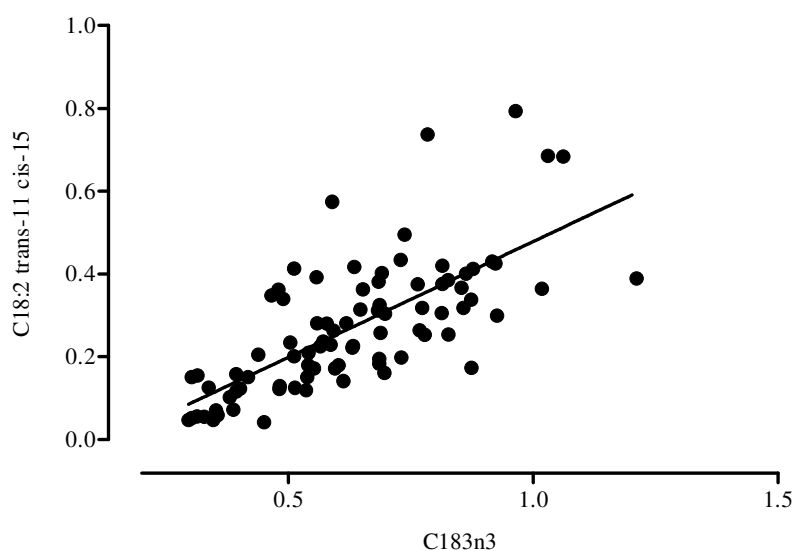
Figura 7.2 - Evolução da concentração dos AG C18:2 n-6, C18:3 n-3 e C18:2 *trans*-11,*cis*-15) ao longo dos períodos experimentais. Os símbolos a cheio são referentes aos Períodos I e III quando as vacas estiveram em pastoreio, suplementadas com um concentrado à base de milho. Os símbolos vazios são relativos ao Período II quando os animais foram alimentados com uma RCM à base de silagem de milho.

$$Y = (0.7389 \pm 0.09799) X - 0.1914 \pm 0.06271; r^2 = 0.8634$$



(a)

$$Y = (0.5584 \pm 0.05909) X - 0.08014 \pm 0.03887; r^2 = 0.5153$$



(b)

Figura 8.2 – Correlação entre o C18:3 n-3 e o C18:2 *trans*-11, *cis*-15, seu intermediário na biohidrogenação ruminal.

Tendo em conta os parâmetros apresentados no Quadro 14, pode considerar-se que a gordura do leite produzido no Período III tem um valor dietético mais elevado do que a gordura do leite produzido no Período I, provavelmente como resultado de diferenças na composição química e no valor nutritivo das pastagens. De uma maneira geral, estes resultados são suportados por Rego et al. (2004) que usaram dietas e condições ambientais similares. Outros estudos sobre o perfil de AG da gordura do leite, que estudaram dietas de RCM *versus* pastoreio (Kelly et al., 1998b; Shroeder et al.,

2003; Kay et al., 2005; Khanal et al., 2008) mostraram uma consistente diminuição nos AGCC e AGCM (C8:0 a C16:0) e um aumento na concentração dos MUFA e PUFA com os animais em pastoreio. Os resultados de todos estes estudos demonstraram que incrementos nos AG C18:2 *cis-9,trans-11*, C18:1 *trans-11* e C18:3 n-3 são sistemáticos, mas menos consistentes para as concentrações de C18:0 e C18:1 *cis-9*. De acordo com os resultados apresentados, o aumento das concentrações de C18:1 *trans-9*, C18:1 *trans-10*, C18:1 *cis-11*, C18:1 *cis-12* e C18:2 n-6 está associado às dietas de RCM. Quando o pastoreio foi comparado com silagem de milho (Couvreur et al., 2006, 2007) ou com uma mistura de silagens de erva e de milho (Elgersma et al., 2004) os resultados da composição em AG da gordura do leite foram similares aos resultados apresentados neste estudo, com exceção do ácido linoleico que tendeu a não variar com as dietas.

No quadro do Anexo I pode verificar-se uma diminuição gradual na concentração de C20:4 n-6 depois da transição das vacas da RCM (0.12 g/100 g AG totais) para a pastagem (0.07 g/100 g AG totais), o mesmo foi observado por Khanal et al. (2008). A diminuição da concentração de ácido linoleico na dieta, seu precursor, levou à sua diminuição no leite (Khanal et al., 2008). O C22:4 n-6 teve um comportamento semelhante ao C20:4 n-6 após a transição da RCM para a pastagem, que diminuiu a sua concentração de 0.16 para 0.09 g/100 g AG totais, enquanto Khanal et al. (2008) não verificaram quaisquer alterações.

Ácidos gordos de cadeia ímpar e ramificada

Os tratamentos da dieta afectaram significativamente os AGCIR da gordura do leite, com exceção do *anteiso*-C15:0 (Quadro 15; Figura 9.2). A RCM aumentou significativamente as concentrações dos AG de cadeia linear ímpar (C11:0, C13:0, C15:0, C17:0 e 17:1 *cis-9*), diminuiu significativamente as concentrações dos AG *iso* (*iso*-C14:0, *iso*-C15:0, *iso*-C16:0 e *iso*-C17:0) e não afectou as concentrações dos AG *anteiso* (*anteiso*-C15:0 e *anteiso*-C17:0). O *anteiso* C17:0 embora não apresente diferenças significativas ao longo dos períodos de amostragem, tendeu a baixar consistentemente com a ingestão de RCM (Figura 9.2; Anexo I), passando de 0.33 g/100 g de AG totais no Período I para 0.09 g/100 g de AG totais no último dia do Período II. Depois de os animais voltarem para a pastagem, a concentração do *anteiso* C17:0 aumentou gradualmente até atingir os 0.31 g/100 g de AG totais no último dia do Período III. A concentração de *anteiso*-C15:0, neste estudo, não foi significativamente

afectada pelos tratamentos da dieta. A grande abundância de *anteiso*-C15:0 em algumas estirpes de bactérias celulolíticas *Butyrivibrio fibrisolvens* e o baixo conteúdo deste AG na *Selenomonas ruminantium* torna difícil relacionar este AG com as espécies de bactérias ruminais (Minato et al., 1988).

Quadro 15 – Ácidos gordos de cadeia ímpar e ramificada (g/100 g de AG totais) nos diferentes períodos experimentais^a.

Ácidos Gordos	PC1	RCM	PC2	SEM	Efeitos		Contrastes	
					Dieta	Dieta xTempo	RCM vs PC1, PC2	PC1 vs PC2
11:0	0.08	0.23	0.05	0.013	<0.001	<0.001	<0.001	0.274
13:0	0.12	0.32	0.12	0.016	<0.001	<0.001	<0.001	0.754
<i>iso</i> -14:0	0.10	0.07	0.14	0.006	<0.001	0.001	<0.001	0.002
<i>iso</i> -15:0	0.32	0.25	0.35	0.015	<0.001	0.008	<0.001	0.060
<i>anteiso</i> -15:0	0.68	0.66	0.68	0.022	0.498	0.068		
15:0	1.24	2.01	1.29	0.093	<0.001	<0.001	<0.001	0.646
<i>iso</i> -16:0	0.31	0.27	0.37	0.014	<0.001	0.008	<0.001	0.033
<i>iso</i> -17:0	0.65	0.53	0.72	0.018	<0.001	0.003	<0.001	0.020
<i>anteiso</i> -17:0	0.33	0.21	0.25	0.020	0.004	<0.001	0.001	0.027
17:0	0.65	0.88	0.82	0.026	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a PC1 = Pastagem *ad libitum* suplementada com 5 kg/d de concentrado durante os primeiros 10 dias do ensaio; RCM = ração completa de mistura constituída por 60% de silagem de milho e 40% de concentrado durante 21 dias; PC2 = Pastagem *ad libitum* suplementada com 5 kg/d de concentrado durante os últimos 21 dias do ensaio.

A substituição da dieta de pastagem por RCM provocou uma diminuição das concentrações dos AG *iso* C14:0, *iso* C15:0, e *iso* C17:0 na gordura do leite. Estes AG passaram de 0.10, 0.32 e 0.65 g/100 g de AG totais, respectivamente, no Período I, para 0.09, 0.27 e 0.54 g/100 g de AG totais no último dia do Período II. Após a transição para a pastagem, a sua concentração aumentou novamente, atingindo os valores máximos no quarto dia do Período III com 0.15, 0.38 e 0.77 g/100 g de AG totais, posteriormente a concentração destes AG decresceu gradualmente até aos 0.13, 0.35 e 0.67 g/100 g de AG totais no último dia deste período experimental (Figuras 10.2 a, b; Anexo I). Diminuições da concentração dos AG *iso* C14:0 e *iso* C15:0 na gordura do leite também foram verificadas por Nielsen et al. (2004) e Shingfield et al. (2005). Estes efeitos são análogos aos verificados após a diminuição do rácio F:C, que provoca um aumento da microflora amilolítica e diminui a microflora celulolítica do rúmen (Oshio

et al., 1987). A substituição da pastagem pela RCM aumentou a ingestão de amido e diminuiu a ingestão de fibra NDF, provocando uma alteração substancial no pH do rúmen e na população microbiana presente, aumentando a proporção de bactérias amilolíticas no rúmen, uma vez que dietas ricas em amido favorecem as fermentações propiônicas em detrimento das fermentações acéticas. A ingestão da RCM incrementou significativamente os AG de cadeia linear ímpar e a ingestão de pastagem, por sua vez, provocou um aumento dos AG ramificados da série *iso* e *anteiso*. Estes resultados são dados pelas correlações apresentadas por Vlaeminck et al. (2006) em que as dietas ricas em amido são correlacionadas positivamente com os AG de cadeia linear ímpar, e negativamente com os AG das séries *iso* e *anteiso* C15:0. Pelo contrário, dietas ricas em fibra correlacionam-se positivamente com os AG ramificados da série *iso* e *anteiso*.

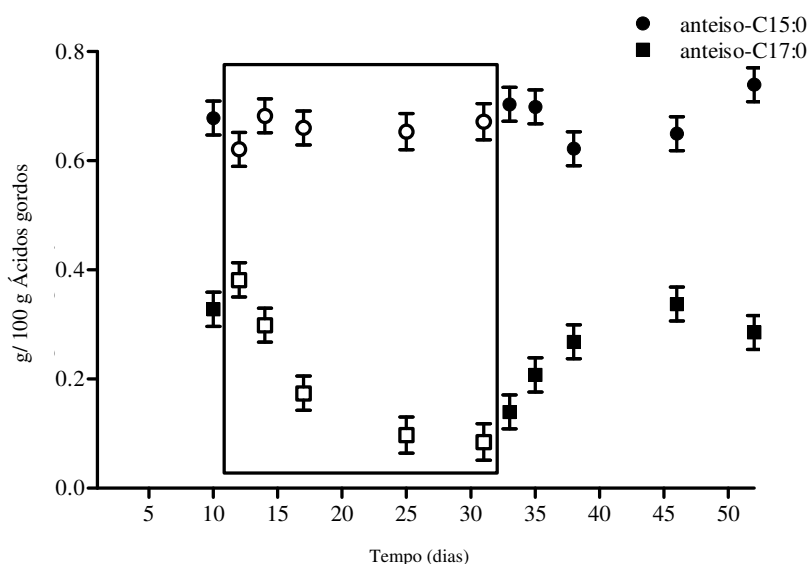
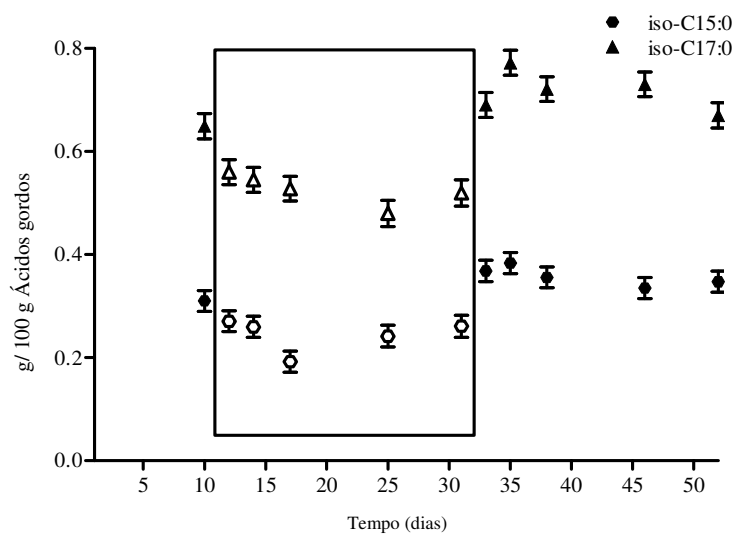


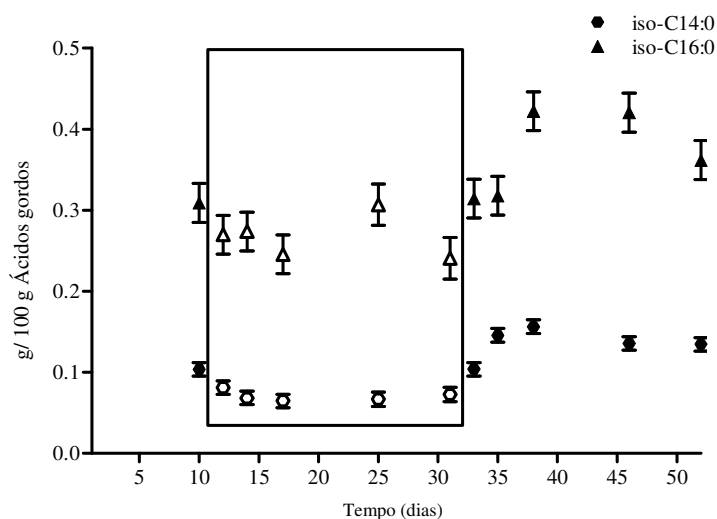
Figura 9.2 – Evolução da concentração dos AG *anteiso*-C15:0 e *anteiso*-C17:0 ao longo dos períodos experimentais. Os símbolos a cheio são referentes aos Períodos I e III quando as vacas estiveram em pastoreio, suplementadas com um concentrado à base de milho. Os símbolos vazios são relativos ao Período II quando os animais foram alimentados com uma RCM à base de silagem de milho.

Os teores de *iso*-C17:0 e de *anteiso*-C17:0 no leite foram mais baixos com a dieta de RCM. Vlaeminck et al. (2006) registraram valores mais elevados destes AG quando usaram silagem de milho, comparativamente a silagem de erva. Cabrita et al. (2003) encontraram correlações negativas entre o teor de PB da dieta e as proporções de *iso*-C17:0 e de *anteiso*-C17:0 no leite. Neste estudo é improvável que as dietas de

pastagem tenham promovido um crescimento bacteriano mais elevado, pois o teor de PB da RCM foi inferior ao das dietas baseadas na pastagem.



(a)



(b)

Figura 10.2 – Evolução da concentração dos AG *iso*-C15:0 e *iso*-C17:0 (a) e dos AG *iso*-C14:0 e *iso*-C16:0 ao longo dos períodos experimentais. Os símbolos a cheio são referentes aos Períodos I e III quando as vacas estiveram em pastoreio, suplementadas com um concentrado à base de milho. Os símbolos vazios são relativos ao Período II quando os animais foram alimentados com uma RCM à base de silagem de milho.

O fornecimento de pastagem aumentou os AGCIR do leite, com exceção dos AG de cadeia linear ímpar, principalmente C15:0 e C17:0 (Figura 11.2). A concentração de C15:0 e C17:0 era de 1.24 e 0.66 g/100 g de AG totais, respectivamente, no Período I, e aumentou gradualmente após a transição para a dieta de RCM, até atingir 2.31 e 1.08g/100 g de AG totais no último dia do Período II. Depois da segunda transição, a

concentração diminuiu ao longo do Período III, atingindo 1.33 e 0.68 g/100 g de AG totais no último dia deste período. Similarmente, Cabrita et al. (2007) observaram que a concentração de amido da dieta aumentou os AG C15:0 e C17:0. Estas alterações podem reflectir mudanças nas populações microbianas do rúmen. A elevada proporção de C15:0 no total de AGCIR neste estudo é consistente com as observações verificadas com bactérias do rúmen puras (Minato et al., 1988). Com base no perfil de AGCIR das bactérias do rúmen, é de esperar que um aumento da proporção de bactérias celulolíticas (com uma dieta de pastagem) resulte num aumento dos AG da série *iso*, e que um aumento das proporções de bactérias amilolíticas (com uma dieta de RCM) provoque um aumento dos AG *anteiso* e de cadeia linear ímpar (Vlaeminck et al., 2006). Outros estudos (Moate et al., 2007) encontraram concentrações mais elevadas de C15:0 e C17:0 no leite de vacas alimentadas em pastoreio comparativamente a vacas alimentadas com RCM. Kelly et al. (1998a) e Khanal et al. (2008) também observaram um aumento em C15:0 na gordura do leite quando as vacas transitaram de uma dieta de pastagem para uma dieta de RCM. Em concordância com os resultados do presente estudo, Roy et al. (2006) ao compararem uma dieta rica em silagem de milho e concentrados com uma dieta de feno, observaram uma diminuição na concentração de AG de cadeia ramificada na gordura do leite. Adicionalmente, Couvreur et al. (2006) demonstraram haver uma relação linear positiva entre a proporção de erva fresca fornecida na dieta e a concentração dos AG C15:0 e C17:0 na gordura do leite. A dupla origem dos AG de cadeia linear ímpar (origem microbiana e síntese *de novo* a partir do propionato) (Scaife et al., 1978; Massart-Leën et al., 1983) e a desaturação do C17:0 a C17:1 *cis*-9 pela Δ^9 -desaturase (Fievez et al., 2003) podem contribuir para explicar estes resultados. Neste estudo, o aumento dos AG C15:0 e C17:0 no leite com a dieta de RCM podem reflectir tanto um aumento das bactérias amilolíticas no rúmen, como um aumento do fornecimento de propionato como precursor.

De uma maneira geral verificou-se que a transição da pastagem para a RCM provocou um incremento nos AG de cadeia linear ímpar, que atingiram o seu pico (4.11g/100 g de AG totais - soma de C11:0, C13:0, C15:0 e C17:0) ao 15º dia após a alteração da dieta. Após a transição da RCM para a pastagem, a concentração destes AG decresceu até um valor mínimo de 1.93g/100 g de AG totais, que foi encontrado até 15 dias depois. Na série *anteiso* não foram verificadas variações no *anteiso*-C15:0 associadas à mudança da dieta, mas o *anteiso*-C17:0 decresceu linearmente até ao 15º dia do Período II. Relativamente à série *iso*, estes AG decresceram significativamente

com a dieta de RCM até a um mínimo (0.78g/100 g de AG totais) encontrado no 7º dia deste tratamento, aumentando depois até um máximo (1.30g/100 g de AG totais) obtido após 4 dias de pastoreio. Isto sugere que a microbiota ruminal responsável pela síntese dos AG da série *iso* adapta-se mais rapidamente a mudanças na dieta do que a microbiota responsável pela formação dos AG da série *anteiso* ou de cadeia linear ímpar.

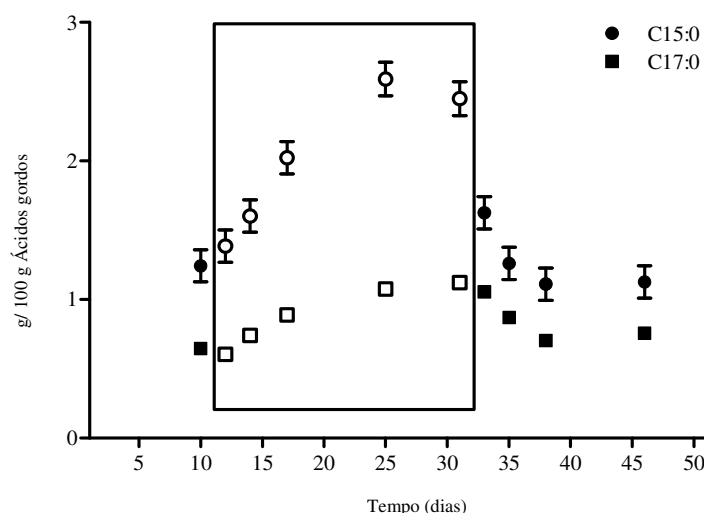


Figura 11.2 – Evolução da concentração dos AG cadeia linear ímpar C15:0 e C17:0 ao longo dos períodos experimentais. Os símbolos a cheio são referentes aos Períodos I e III quando as vacas estiveram em pastoreio, suplementadas com um concentrado à base de milho. Os símbolos vazios são relativos ao Período II quando os animais foram alimentados com uma RCM à base de silagem de milho.

AG em C18:1. Ácido *trans*-vacénico e ácido ruménico (CLA)

Através da análise do Quadro 16 pode verificar-se que a maior concentração de AG em C18:1 nos Períodos I e III (pastagem), respectivamente 32.16 e 36.01 g/100 g de AG totais, relativamente ao Período II (RCM) com 27.96 g/100 g AG totais, deveu-se ao aumento das concentrações de C18:1 *cis*-9 e de C18:1 *trans*-11, que são os principais AG *cis* e *trans* em C18:1 (Khanal et al., 2008). A maior concentração de C18:1 *trans*-11 na gordura do leite em animais alimentados na pastagem, comparativamente a uma dieta de RCM (Figura 12.2; Quadro 16), também foi verificada por Khanal et al. (2008). Isto deveu-se à maior ingestão de ácido linolénico proveniente da pastagem, cuja biohidrogenação incompleta produz C18:1 *trans*-11 no rúmen, precursor da síntese

endógena de CLA (Griinari e Bauman, 1999; Elgersma et al., 2004; Bargo et al., 2006). Similarmente, a concentração de CLA na gordura do leite aumentou (Figura 12.2; Quadro 16) quando os animais estiveram em pastoreio, o que está de acordo com diversos estudos (Stanton et al., 1997; Kelly et al., 1998a; Chilliard et al., 2000; Rego et al., 2004; Khanal et al., 2008). As duas principais causas para o aumento da concentração de CLA na gordura do leite foram o aumento da quantidade de C18:1 *trans*-11 que escapou do rúmen durante a biohidrogenação do ácido linoleico e do ácido linolénico, e a sua conversão em CLA na GM pela Δ^9 desaturase (Khanal et al., 2008). Estes autores verificaram, através de regressão linear, que o aumento do período de tempo em pastoreio aumenta a concentração de CLA na gordura do leite e que este aumento acontece até um determinado limite, a partir do qual estabiliza.

Quadro 16 – Efeito dos períodos experimentais na variação dos AG em C18:1 e em CLA da gordura do leite (g/100 g de AG totais).

Ácidos Gordos	PC1	RCM	PC2	EPM	Efeitos	Contrastes		
						Dieta	Dieta vs Tempo	RCM vs PC1, PC2
18:1 <i>trans</i> -6 a -8	0.32	0.40	0.30	0.024	0.003	<0.001	0.002	0.702
18:1 <i>trans</i> -9	0.58	0.47	0.27	0.044	<0.001	0.006	0.456	<0.001
18:1 <i>trans</i> -10	0.85	1.56	0.53	0.167	<0.001	<0.001	<0.001	0.287
18:1 <i>trans</i> -11	2.63	1.85	3.09	0.298	<0.001	0.004	<0.001	0.242
18:1 <i>trans</i> -12	0.38	0.39	0.37	0.015	0.529	<0.001		
18:1 <i>cis</i> -9	22.25	19.10	26.24	0.737	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
18:1 <i>cis</i> -10+ <i>trans</i> -15	1.11	1.44	1.41	0.054	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
18:1 <i>cis</i> -11	0.37	0.45	0.38	0.013	<0.001	0.004	<0.001	0.641
18:1 <i>cis</i> -12	0.20	0.23	0.26	0.018	0.172	0.037		
18:1 <i>trans</i> -6, <i>cis</i> -14	0.61	0.42	0.53	0.021	<0.001	<0.001	<0.001	0.007
18:1 <i>cis</i> -15	0.35	0.34	0.36	0.016	0.361	0.023		
18:2 outros isómeros ^b	0.42	0.30	0.34	0.032	0.006	0.006	0.002	0.061
18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0.03	0.03						
18:2 <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15	0.38	0.16	0.35	0.022	<0.001	<0.001	<0.001	0.347
CLA <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	1.71	0.85	1.58	0.219	<0.001	<0.001	<0.001	0.562

^bOutros isómeros 18:2- somatório dos isómeros 18:2 eluídos depois de 18:1 *cis*-15 e 18:2 *trans*-11, *cis*-15.

As concentrações de C18:0 e de C18:1 *cis*-9 diminuíram imediatamente após a transição da pastagem para a RCM. O mesmo foi observado por Christie (1979), Timmen e Patton (1988), Chilliard et al. (2001) e Khanal et al. (2008). Um aumento gradual da concentração de C18:0 na gordura do leite pode ser esperado em vacas alimentadas na pastagem, apesar de este ser desaturado intensivamente a C18:1 *cis*-9 na GM, porque é o principal produto final da biohidrogenação ruminal dos ácidos linoleico

e linolênico (Khanal et al., 2008). Também é possível que as concentrações de alguns AG em C18:1 tenham diminuído após a transição para a RCM, devido à menor ingestão de energia na pastagem (Timmen e Patton, 1988).

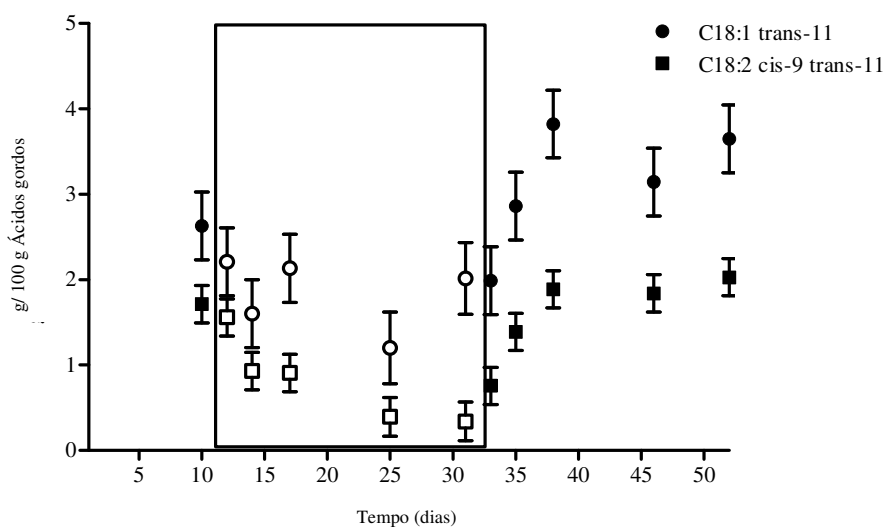


Figura 12.2 - Evolução da concentração do ácido rumênico (C18:2 *cis-9,trans-11*) e do ácido *trans*-vacênico (C18:1 *trans-11*) ao longo dos períodos experimentais. Os símbolos a cheio são referentes aos Períodos I e III quando as vacas estiveram em pastoreio, suplementadas com um concentrado à base de milho. Os símbolos vazios são relativos ao Período II quando os animais foram alimentados com uma RCM à base de silagem de milho.

A evolução da concentração do CLA e do TVA ao longo do ensaio estão representados na Figura 12.2 e no Anexo I. A diminuição do teor de CLA desde o Período I (1.71 g/100 g de AG totais) e ao longo do Período II (1.56 no dia 2 para 0.44 g/100 g de AG totais no dia 21) e o aumento da sua concentração após a transição para o pastoreio no Período III (0.76 no dia 2 até 2.16 g/100 g de AG totais no dia 21) foi linear, enquanto o TVA teve um comportamento menos regular. A concentração de CLA no leite nos Períodos I e III (pastoreio) foi 2 a 5 vezes superior, em relação ao último dia do Período II (RCM), o que está de acordo com diversos autores (Griinari et al., 1998b; Kelly et al., 1998a; Lawless et al., 1998; Dhiman et al., 1999a; Rego et al., 2004).

O C18:1 *cis-9,trans-11* foi o isômero de CLA mais abundantemente encontrado na gordura do leite (Quadro 16), o que está de acordo com Parodi (1977), Griinari e Bauman (1999) e Rego et al. (2005a, 2009). Este AG representou 98,28% do total de

CLA, no Período I, e 96,51% no Período III. O isômero C18:2 *trans*-10,*cis*-12 foi encontrado na gordura do leite nos Períodos I e II, não tendo sido detectado no Período III. Os isômeros de CLA identificados não responderam similarmente à transição, o sugere que os diferentes isômeros seguem diferentes vias metabólicas na síntese na GM (Elgersma et al., 2004).

Khanal et al. (2008) observaram uma correlação linear negativa ligeira entre o teor de gordura e o teor de CLA do leite, quando analisados separadamente dos dados obtidos durante a dieta de pastagem. Lawless et al. (1998) observaram uma redução significativa no teor de gordura do leite com o aumento do teor de CLA no leite, quando vacas mantidas na pastagem foram suplementadas com 3,1 kg de polpa de beterraba, sementes de soja extrudidas ou sementes de colza extrudidas.

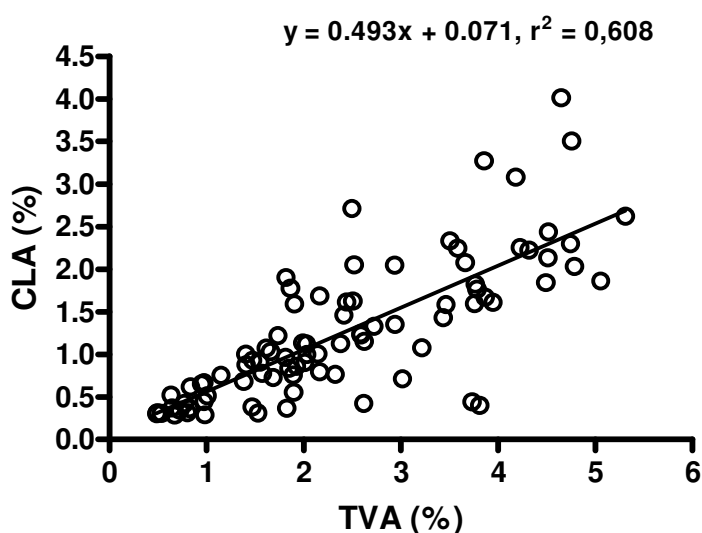


Figura 13.2 – Correlação entre as concentrações de CLA (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) e de TVA (C18:1 *trans*-11), na gordura do leite (n= 86; $P < 0,001$).

A forte correlação verificada entre o CLA e o TVA (Figura 13.2.), também observada por outros autores (Jahreis et al., 1997; Chilliard et al., 2000, 2001, 2003; Solomon et al., 2000; Rego et al., 2004, 2005a,b, 2008b; Khanal et al., 2008), indica que estes AG têm um precursor comum. A diminuição acentuada no conteúdo em ácido linolênico na dieta das vacas alimentadas com RCM, e a diminuição simultânea das concentrações de TVA e de CLA na gordura do leite após a transição da pastagem para a RCM, suportam a hipótese que o ácido linolênico é o precursor predominante do TVA e, conseqüentemente, do CLA na gordura do leite, assim como foi proposto por

Elgersma et al. (2004). Estes autores sugerem que esta correlação mostra a relação precursor/produto.

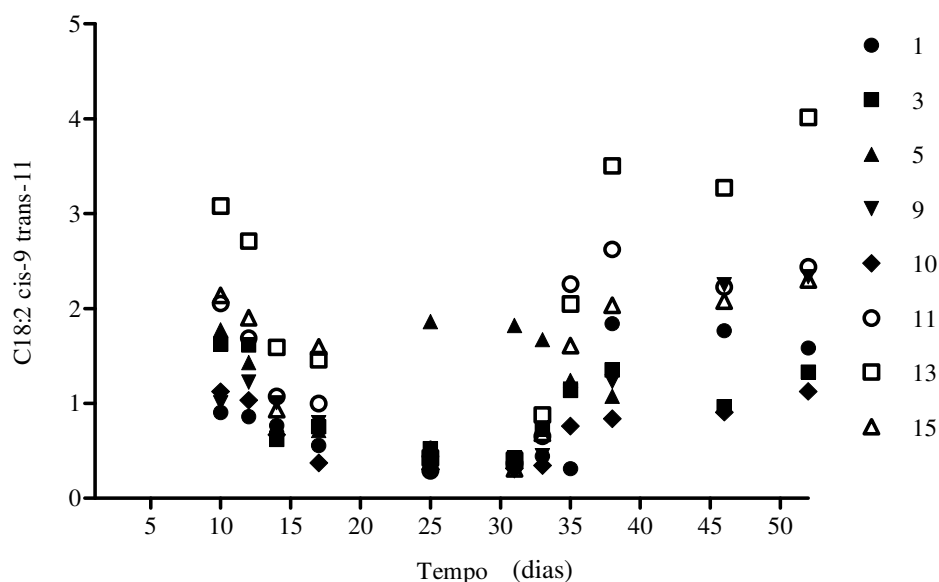


Figura 14.2 – Evolução ao longo do ensaio e hierarquia das concentrações de CLA (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) e de TVA (C18:1 *trans*-11), na gordura do leite das 8 vacas utilizadas no ensaio (n= 86; $P<0,001$).

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas entre vacas, relativamente aos níveis de CLA na gordura do leite. Pela análise da Figura 14.2 observou-se um aumento gradual dos teores de CLA, a nível individual, ao longo do Período III, após a transição para o pastoreio, e até ao fim do ensaio. Observou-se uma correlação significativa ($P<0,001$) relativamente aos níveis de CLA entre os dias 10 e 52 (último dia do Período I e último dia do Período III, respectivamente), para cada vaca, não tendo sido verificado qualquer correlação ($P<0,05$) entre os dias 10 e 31 (último dia do Período I e último dia do Período II, respectivamente) e entre os dias 31 e 52 (último dia do Período II e último dia do Período III, respectivamente).

Diversos estudos realizados observaram grandes variações dos níveis de CLA da gordura do leite entre animais (Kelly et al., 1998a; Lawless et al., 1998; Solomon et al., 2000; Rego et al., 2004; Khanal et al., 2008). Kelly et al. (1998a) e Khanal et al. (2008) verificaram que os limites de variação individual foram maiores em animais alimentados exclusivamente na pastagem, comparativamente a animais alimentados com RCM. A variação individual entre vacas nos conteúdos de CLA e de TVA do leite

aumentou com o incremento da concentração de CLA e de TVA, o que foi associado ao aumento do tempo de pastoreio (Khanal et al., 2008). Nas vacas em pastoreio, o ácido linolénico é o AGI da dieta mais abundante. Durante a biohidrogenação ruminal o ácido linolénico é convertido em TVA pela acção da Δ^9 desaturase na GM (Griinari et al., 2000). A grande variação da actividade da Δ^9 desaturase na GM conduz às variações individuais na concentração de CLA na gordura do leite (Lock e Gransworthy, 2003). Já tinha sido observado anteriormente que vacas em pastoreio tinham maiores variações no teor de CLA no leite comparativamente a vacas alimentadas com RCM (Jahreis et al., 1997; Kelly et al., 1998a; White et al., 2001, Rego et al., 2004).

Lawless et al. (1999) mostraram haver correlações significativas entre os níveis de CLA da gordura individual do leite de vacas na pastagem dentro da mesma raça, em duas amostragens distintas. Pelo contrário, Solomon et al. (2000) observaram que as vacas não mantêm a mesma relação hierárquica na concentração de CLA no leite, diferindo entre dietas. No entanto, Peterson et al. (2002) relataram que a hierarquia individual para as concentrações de CLA na gordura do leite foi mantida durante um largo período de tempo, num estudo de 12 semanas entre animais submetidos à mesma dieta, mesmo no grupo de tratamento variável, que alternava entre duas dietas. Esta hierarquia parece manter-se mesmo quando existe uma mudança na dieta. A existência dessa hierarquia para a produção de CLA para os animais em pastoreio é confirmada neste trabalho, assim como por outros autores (Kelly et al., 1998a,b; Elgersma et al., 2004; Rego et al., 2004, 2005a,b).

A base fisiológica para a variação dos níveis de CLA da gordura do leite entre indivíduos e a hierarquia individual mantida por diferentes dietas ainda não foi estabelecida, mas pode incluir diferenças em relação a padrões de alimentação, mecanismos genéticos, população ruminal e actividade da Δ^9 desaturase na glândula mamária (Rego et al., 2005a). A dieta é um dos principais determinantes do teor de CLA na gordura do leite, mas as variações individuais de cada vaca também devem ser consideradas (Rego et al., 2004). O estudo da heritabilidade deste factor (actividade da Δ^9 desaturase) permitirá seleccionar os animais que produzem mais CLA.

Ácidos Gordos Saturados e Insaturados

O Quadro 17 mostra o somatório dos AGS, MUFA, PUFA, AG hiper (H) e hipocolesterémicos (h) e alguns rácios de importância a nível do valor nutricional da

gordura do leite. Todos estes parâmetros foram significativamente influenciados pela dieta. Quando os animais estiveram em pastoreio, a gordura do leite apresentou um maior conteúdo em CLA, MUFA, PUFA, AG n-3, TVA, fracção hipocolesterémica e nos rácios PUFA/AGS e h/H, e ao mesmo tempo, verificou-se uma diminuição dos AGS e do rácio n-6/n-3, dados consistentes com os apresentados por diversos autores (Hollo et al., 2005; Couvreur et. al., 2006; Dewhurst et al., 2006; Kraft et al., 2008; Or-Rashid et al., 2008). A ingestão da RCM resultou no incremento dos AGS e da fracção hipercolesterémica, assim como no somatório dos AG n-6 e no rácio n-6/n-3.

Quadro 17 – Efeito dos diferentes tratamentos^a sobre alguns somatórios e rácios de AG da gordura do leite (g/100 g de AG totais).

Ácidos Gordos	PC1	RCM	PC2	SEM	Efeitos	Contrastes		
						Dieta	Dieta x Tempo	RCM vs PC1, PC2
Saturados	53.11	56.35	50.15	1.196	<0.001	<0.001	<0.001	0.002
MUFA	33.22	31.27	37.64	0.886	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
PUFA	4.70	4.16	5.02	0.303	<0.001	<0.001	<0.001	0.150
PUFA/Saturados	0.09	0.08	0.10	0.008	<0.001	<0.001	<0.001	0.038
n-3	0.91	0.64	0.89	0.032	<0.001	<0.001	<0.001	0.719
n-6	1.85	2.81	2.48	0.140	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
n-6/n-3	2.12	4.94	2.88	0.159	<0.001	<0.001	<0.001	0.001
h	24.29	22.05	28.88	0.820	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
H	36.85	43.37	35.09	0.802	<0.001	<0.001	<0.001	0.046
h/H	0.66	0.51	0.84	0.035	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

^a PC1 = Pastagem *ad libitum* suplementada com 5 kg/d de concentrado durante os primeiros 10 dias do ensaio; RCM = ração completa de mistura constituída por 60% de silagem de milho e 40% de concentrado durante 21 dias; PC2 = Pastagem *ad libitum* suplementada com 5 kg/d de concentrado durante os últimos 21 dias do ensaio.

A progressão das concentrações dos AGS, MUFA e PUFA ao longo do ensaio está representada graficamente na Figura 15.2. A concentração dos AGS aumentou de 57.85 g/100 g de AG totais no Período I para um máximo de 63.26 g/100 g de AG totais no final do Período II, seguido de um decréscimo para o mínimo de 50.06 g/100 g de AG totais no dia 14 do Período III. Relativamente aos MUFA, a sua concentração foi 33.51 g/100 g de AG totais no Período I, diminuiu para 30.60 no dia 21 do Período II, atingindo o máximo de 42.51 g/100 g de AG totais no dia 14 do Período III. A concentração inicial (Período I) dos PUFA (5.33 g/100 g de AG totais) manteve-se mais ou menos constante até ao dia 7 do Período II, seguido de um decréscimo até ao dia 21 deste período experimental (4.09 g/100 g de AG totais). Após a transição para a

pastagem, a concentração de PUFA aumentou até atingir o máximo de 5.98 g/100 g de AG totais no dia 7, registrando um ligeiro decréscimo posteriormente. Elgersma et al. (2004) verificaram um comportamento idêntico nos MUFA e PUFA depois de uma transição do pastoreio para uma dieta de mistura de silagens.

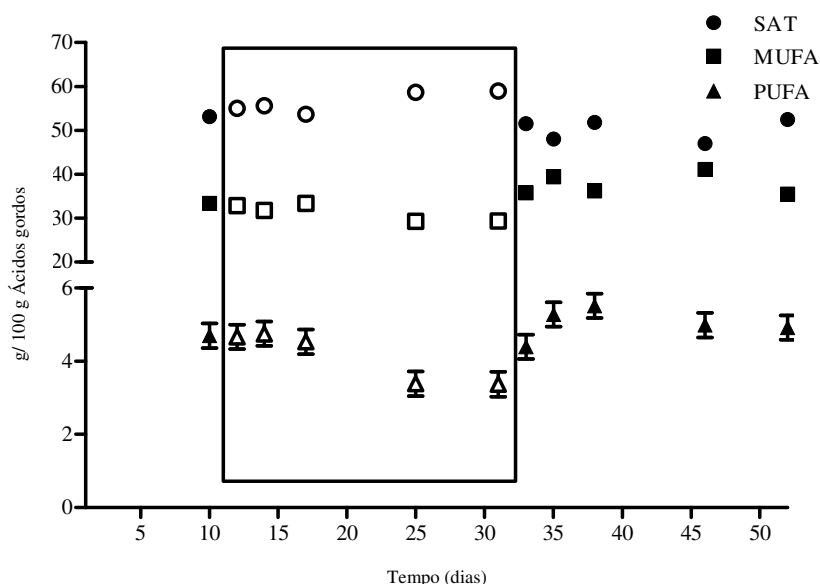


Figura 15.2 – Evolução da concentração dos AGS, MUFA e PUFA ao longo dos períodos experimentais.

O aumento do conteúdo em AGS no Período II, comparativamente aos outros períodos experimentais, deveu-se ao aumento da concentração dos AG hipercolesterémicos (C12:0, C14:0 e C16:0). Os AG hipercolesterémicos representaram 36.86, 43.18 e 35.08 g/100 g de AG totais do total de AG da gordura do leite, nos Períodos I, II e III, respectivamente. Estes dados são consistentes com Khanal et al. (2008) que verificaram uma redução significativa do teor de AG hipercolesterémicos logo após a transição dos animais de uma dieta de RCM para a pastagem. De uma maneira geral, a gordura do leite apresentou-se menos saturada quando os animais foram alimentados na pastagem, possuindo concentrações mais baixas de ácidos hipercolesterémicos, comparativamente à dieta com RCM, tal como foi verificado por Ney (1991), Kolver e Muller (1998) e por Rego et al. (2004). Kelly et al. (1998a) e Rego et al. (2004) também verificaram que a concentração de AGCC e AGCM foi superior quando as vacas foram alimentadas com uma dieta de RCM, comparativamente a uma dieta baseada em pastagem.

3. CONCLUSÕES

A alimentação é o factor que mais influencia o perfil dos AG da gordura do leite. Alterações significativas no perfil dos AG do leite de vacas leiteiras podem ocorrer com mudanças na dieta. Após a transição do pastoreio para uma dieta de RCM, verificou-se um aumento rápido (após dois dias) dos conteúdos em AGS, nomeadamente dos ácidos hipercolesterémicos (C12, C14 e C16), e uma redução dos MUFA e PUFA, assim como das concentrações de CLA, TVA e ómegas-3. Uma nova mudança da alimentação para a pastagem provocou alterações contrárias às produzidas pela RCM.

A pastagem por ser rica em ácido linolénico, bom substrato para a produção de TVA no rúmen, precursor do CLA na biohidrogenação ruminal, possibilitou que a gordura do leite fosse mais rica nestes componentes, assim como em MUFA, PUFA e ómegas-3, do que outros alimentos pobres em ácido linolénico, como o concentrado e a silagem de milho que constituíram a RCM.

O leite produzido num sistema baseado na pastagem é mais rico em CLA e ómegas-3, o que, segundo a literatura, é benéfico em termos dietéticos e de saúde, e é preferido pelos consumidores. Para além disso, a produção de leite com base na pastagem, tem menores custos de produção, permitindo bons níveis de performance animal, a nível de produção de leite, TB e TP.

|

CAPÍTULO III

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AbuGhazaleh, A. A., D. J. Schingoethe, A. R. Hippen, L. A. Whitlock. 2002a. Feeding fish meal and extruded soybeans enhances the conjugated linoleic acid (CLA) content of milk. *J. Dairy Sci.* 85:624-631.
- AbuGhazaleh, A. A., D. J. Schingoethe, A. R. Hippen, L. A. Whitlock. 2002b. Fatty acid profiles of milk and rumen digesta from cows fed fish oil, extruded soybeans or their blend. *J. Dairy Sci.* 85: 2266-2276.
- AbuGhazaleh, A. A., L. D. Holmes. 2007. Diet supplementation with fish oil and sunflower oil to increase conjugated linoleic acid levels in milk fat of partially grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:2897–2904.
- Adlof, R. O., S. Duval, E. A. Emken. 2000. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in humans. *Lipids.* 35:131-135.
- Agenäs, S., K. Holtenius, M. Griinari, E. Burstedt. 2002. Effects of turnout to pasture and dietary fat supplements on milk fat composition and conjugated linoleic acid in dairy cows. *Acta Agric. Scand.* 52:25-53.
- Agrawal, S., J. T. Heimbach, M. M. Amann, F. Mohammedshah, J. S. Douglas. 1998. Relative intakes of conjugated linoleic acid (CLA) from meat and dairy products as a function of sex and age. *J. Am. Col. Nutr.* 17(5):526
- Ahnadi, C.E., N. Beswick, L. Delbecchi, J.J. Kennelly, P. Lacasse. 2002. Addition of fish oil to diets for dairy cows: II. Effects on milk fat and gene expression of mammary lipogenic enzymes. *J. Dairy Res.* 69:521–531.
- Alexander, R. H., and M. McGowan, 1966. The routine determination of *in vitro* digestibility of organic matter in forages. An investigation of the problems associated with continuous large-scale operation. *J. Brit. Grassl. Soc.*, 21: 140.
- Alfaia, C. M. M., M. L. F. Castro, S. I. V. Martins, A. P. V. Portugal, S. P. A. Alves, C. M. G. A. Fontes, R. J. B. Bessa, J. A. M. Prates. 2007a. Effect of slaughter season on fatty acid composition, conjugated linoleic acid isomers and nutritional value of intramuscular fat in Barrosa-PDO veal. *Meat Sci.* 75:44-52.
- Almeida, A. M. S. 1986. Biossíntese da matéria gorda do leite em ruminantes. Página 358 em *Inst. Sup. Invest. Agrária, Estação Zootécnica Nacional, Vale de Santarém, Fonte Boa.*
- AOAC. 1995. *Official Methods of Analysis.* 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- ASCN/AIN Task Force on *Trans* Fatty Acids. 1996. Position paper on *trans* fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 63:663-670.

- Asher, J. R., S. K. Gulati, L. J. Cook, T. W. Scott, J. B. Donnelly. 1979. Assessing the biological effectiveness of protected lipid supplements for ruminants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 56:522-527.
- Auldust, M. J., J. K. Kay, N. A. Thomson, A. R. Napper, E. S. Kolver. 2002. Concentration of conjugated linoleic acid in milk from cows grazing pasture or fed a total mixed for an entire lactation. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.* 62:240-241.
- Baer, R. J. 1996. Production and utilization of dairy cow's milk and products with increased unsaturated fatty acids. Pages 247-261 in *Progress in Dairy Science* CAB Int. J.C. Phillips, ed.
- Baker, R.D. 1982. Estimating herbage intake from animal performance. Pages 77-93 in *Herbage Intake Handbook*. Published by Brit. Grassl. Soc.
- Baldwin, R. L., N. E. Smith, J. Taylor, M. Sharp. 1980. Manipulating metabolic parameters to improve growth rate and milk secretion. *J. Anim. Sci.* 51:1416-1428.
- Banni, S., G. Carta, M. S. Contini, E. Angioni, M. Deiana, M. A. Dessi, M. P. Melis, F. P. Corongiu. 1996. Characterization of conjugated diene fatty acids in milk, dairy products, and lamb tissues. *J. Nutr. Biochem.* 7:150-155.
- Banni, S., E. Angioni, E. Murru, G. Carta, M. P. Melis, D. Bauman, Y. Dong, C. Ip. 2001. Vaccenic acid feeding increases tissue levels of conjugated linoleic acid and suppresses development of premalignant lesions in rat mammary gland. *Nutr. Cancer.* 41:91-97.
- Barber, M. C., R. A. Clegg, M. T. Travers, R. G. Vernon. 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta.* 1347:101-126.
- Bargo, F., L. D. Muller, J. F. Delahoy, T. W. Cassidy. 2002. Milk response to concentrate supplementation of high producing dairy cows grazing at two pasture allowances. *J. Dairy Sci.* 85:1777-1792.
- Bargo, F., L. D. Muller, E. S. Kolver, J. F. Delahoy. 2003. Invited review: production and digestion of supplemented dairy cows on pasture. *J. Dairy Sci.* 86:1-42.
- Bargo, F., J. F. Delahoy, G. F. Schroeder, L. D. Muller. 2006. Milk fatty acid composition of dairy cows grazing at two pasture allowances and supplemented with different levels of concentrate. *Anim. Feed Sci. Tech.* 125:17-31.
- Bas, P., Y. Chilliard, P. Morand, A. Rouzeau, N. Mandran. 1987. Compositions des Principaux Tissus Adipeux de la Chèvre Alpine en Fin de Lactation. *Ann. Zootech.* 36:361-374.

- Bateman, H. G., T. C. Jenkins. 1998. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to nonlactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. *J. Dairy Sci.* 81:2451-2458.
- Bauman, D. E., B. A. Corl, L. H. Baumgard, J. M. Griinari. 1998. *Trans* fatty acids, conjugated linoleic acid and milk fat synthesis. Pages 95-103 in Proc.Cornell Nutr.Conf.
- Bauman, D. E., J. M. Griinari. 2001. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livest. Prod. Sci.* 23:219-237.
- Bauman, D. E., B. A. Corl, L. H. Baumgard, J. M. Griinari. 2001. Conjugated linoleic acid (CLA) and the dairy cow. Pages 221-250 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. P.C. Garnsworthy, J. Wiseman, ed. Nottingham University Press, Nottingham.
- Bauman, D. E., L. H. Baumgard, B. A. Corl, J. M. Griinari. 2007. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *J. Anim. Sci.* 77:1-15.
- Baumgard, L. H., B. A. Corl, D. A. Dwyer, A. Saebo, D. E. Bauman. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr.Comp. Physiol.* 278:R179-R184.
- Belury, M. A., K. P. Nickel, C. E. Bird, Y. Wu. 1996. Dietary conjugated linoleic acid modulation of phorbol ester skin tumor promotion. *Nutr.Cancer.* 26:149-157.
- Belury, M. A. 2002. Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annu. Rev. Nutr.* 22:505-531.
- Berven, G., A. Bye, O. Hals, H. Blankson, H. Fagertun, E. Thom, J. Wadstein, O. Gudmundsen. 2000. Safety of conjugated linoleic acid (CLA) in overweight or obese human volunteers. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102:455-462.
- Bessa, R. J. B. 1999. Revalorização nutricional das gorduras dos ruminantes. Páginas 283-313 em *Symposium Europeo – Alimentación en el Siglo XXI*. R. Calero e J. M. Gómez-Nieves, ed. Colégio Oficial de Veterinários de Badajoz, Badajoz, Espanha.
- Bessa, R. J. B., J. Santos-Silva, J. M. R. Ribeiro, A. V. Portugal. 2000. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livest. Prod. Sci.* 63:201-211.
- Bessa, R. J. B. 2001. Utilização de óleo de soja como suplemento de luzerna desidratada na alimentação de ovinos. Efeito sobre o ecossistema e metabolismo retículo-

- ruminal. Tese de doutoramento. Universidade Técnica de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal.
- Bhattacharya, A., J. Banu, M. Rahman, J. Causey, G. Fernandes. 2006. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. *J. Nutr.Biochem.* 17:789-810.
- Bickerstaffe, R., E. F. Annison, J. L. Linzell. 1974. The Metabolism of Glucose, Acetate, Lipids and Amino Acids in Lactating Dairy Cows. *J. Agric. Sci. Camb.* 82:71-85.
- Boatman, C., D. K. Hotckiss, E. G. Hammond. 1965. Effect of Season and Stage of Lactation on Certain Polyunsaturated Fatty Acids of Milk Fat. *J. Dairy Sci.* 48:34-37.
- Brondz, I., 2002. Development of fatty acids analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Anal. Chim. Acta.* 465:1-37.
- Cabrita, A. R. J., A. J. M. Fonseca, R. J. Dewhurst, E. Gomes. 2003. Nitrogen supplementation of corn silages. 2. Assessing rumen function using fatty acid profiles of bovine milk. *J. Dairy Sci.* 86:4020-4032.
- Cabrita, A. R. J., R. J. B. Bessa, S. P. Alves, R. J. Dewhurst, A. J. M. Fonseca. 2007. Effects of dietary protein and starch on intake, milk production, and milk fatty acid profiles of dairy cows fed corn silage-based diets. *J. Dairy Sci.* 90-1429-1439.
- Cameron, P. J., M. Rogers, J. Oman, S. G. May, D. K. Lunt, S. B. Smith. 1994. Stearoyl Coenzyme A Desaturase activity and mRNA levels are not different in subcutaneous adipose tissue from Angus and American Wagyu Steers. *J. Anim. Sci.*, 72:2624-2628.
- Cardoso, R. M. A., 2007. Influência da dieta sobre a concentração de ácidos gordos de cadeia ímpar e ramificada na gordura do leite de vaca. Tese de Licenciatura. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores, Angra do Heroísmo.
- Chilliard, Y., J. Robelin, B. Rémond. 1984. *In vivo* stimulation of body lipid mobilization and reconstitution in dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 64:236-237.
- Chilliard, Y., C. Delouis, M. C. Smith, D. Sauvant, P. Morand-Fehr. 1986. Mammary metabolism in the goat during normal or hormonally-induced lactation. *Reprod. Nutr. Dev.* 26:607-615.

- Chilliard, Y., M. Doreau. 1997a. Effects of ruminal or postruminal fish oil supply on cow milk yield and composition. *Reprod. Nutr. Dev.* 37:338–339.
- Chilliard, Y., M. Doreau. 1997b. Influence of supplementary fish oil and rumen-protected methionine on milk yield and composition in dairy cows. *J. Dairy Res.* 64:173-179.
- Chilliard, Y., J. M. Chardigny, J. Chabrot, A. Ollier, J. L. Sebedio, M. Doreau. 1999. Effects of ruminal or postruminal fish oil supply on conjugated linoleic acid (CLA) content of cow milk fat. *Proc. Nutr. Soc.* 58:70A.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, R. M. Mansbridge, M. Doreau. 2000. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.* 49:181-205.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, M. Doreau. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci.* 70:31-48.
- Chilliard, Y., A. Ferlay, J. Rouel, and G. Lamberet. 2003. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. *J. Dairy Sci.* 86:1751-1770.
- Chilliard, Y., A. Ferlay. 2004. Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:467-492.
- Chilliard, Y., F. Glasser, A. Ferlay, L. Bernard, J. Rouel, M. Doreau. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur. J. Lipid. Sci Technol.* 109:828-855.
- Chin, S. F., W. Liu, J. M. Storkson, Y. L. Ha, M. W. Pariza. 1992. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Compos. Anal.* 5:185-197.
- Chin, S. F., J. M. Storkson, K. J. Albright, M. E. Cook, M. W. Pariza. 1994. Conjugated linoleic acid is a growth factor for rats as shown by enhanced weight gain and improved feed efficiency. *J. Nutr.* 124:2344-2349.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, M. L. Kelly, J. M. Griinari, D.E. Bauman. 1998a. Effect of dietary manipulation on milk conjugated linoleic acid concentrations. *J. Anim. Sci.* 81(Suppl. 1):233. (Abstr.).

- Chouinard, P. Y., L. Corneau, D.E. Bauman, W. R. Butler, Y. Chilliard, J.K. Drackley, 1998b. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different sources of dietary fat. *J. Dairy Sci.* 81(Suppl. 1):234. (Abstr.).
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, D. M. Barbano, L. E. Metzger, D. E. Bauman. 1999a. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *J. Nutr.* 129:1579-1584.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, A. Saebo, D.E. Bauman. 1999b. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:2737-2745.
- Chouinard, P. Y., L. Corneau, W. R. Butler, Y. Chilliard, J. K. Drackley, D.E. Bauman. 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J. Dairy Sci.* 84:680-690.
- Christie, W. W. 1979. The effects of diet and other factors on the lipid composition of ruminant tissues and milk. *Prog. Lipid Res.* 17:245-277.
- Christie, W. W. 1994. The preparation of derivatives of fatty acids. Pages 64-84 in *Gas chromatography and lipids – a practical guide*. Chapter 4. The Oily Press, Glasgow, Scotland, UK.
- Clark, D.A., and V.R. Kanneganti. 1998. Grazing management system for dairy cattle. Page 331 in *Grass for Dairy Cattle*. J.H.Cherney, and D.J.R. Cherney, ed. CAB Int., Oxon, UK.
- Close, R. N., D. A. Schoeller, A. C. Watras, E. H. Nora. 2007. Conjugated linoleic acid supplementation alters the 6-mo change in fat oxidation during sleep. *Am. J. Clin. Nutr.* 86:797-804.
- Codex Alimentarius Commission. 2006. Report of the 34th session of the codex committee on food labelling. Alinorm 06/29/22.
- Cook, M. E., C. C. Miller, Y. Park, M. W. and Pariza. 1993. Immune modulation by altered nutrient metabolism: nutritional control of immune-induced growth depression. *Poult.Sci.* 72:1301-1305.
- Cook, M. E., D. L. Jerome, T. D. Crenshaw, D. R. Buege, M.W. Pariza. K. J. Albright, S. P. Schmidt, J. A. Scimeca, P. A. Lofgren, E. J.Hentgens. 1998. Feeding conjugated linoleic acid improves feed efficiency and reduces whole body fat in pigs. *FASEB J.* 12:A836.

- Collomb, M., U. Butikofer, R. Sieber, O. Bosset, B. Jeangros. 2001. Conjugated linoleic acid and *trans* fatty acid composition of cows' milk fat produced in lowlands and highlands. *J. Dairy Res.* 68:519-523.
- Collomb, M., R. Sieber, U. Butikofer. 2004a. CLA isomers in milk fat from cows fed diets with high levels of unsaturated fatty acids. *Lipids.* 39: 355-364.
- Collomb, M., H. Sollberger, U. Butikofer, R. Sieber, W. Stoll, W. Schaeren. 2004b. Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflower seed on the fatty acid composition of milk fat. *Int. Dairy J.* 14:549-559.
- Collomb, M., A. Schimid, R. Sieber, D. Wechsler, E. Ryhänen. 2006. Conjugated linoleic acid in milk fat: variation and physiological effects. *Int. Dairy J.* 16:1347–1361.
- Corl, B. A., P. Y. Chouinard, D. A. Dwyer, D. E. Bauman, J. M. Griinari, K. V. V. Nurmela. 1998. Conjugated linoleic acid in milk fat of dairy cows originated in part by endogenous synthesis from *trans*-11 octadecenoic acid. *J. Dairy Sci.* 81(Suppl. 1): 233. (Abstr.).
- Corl, B. A., L. H. Baumgard, J. M. Griinari, P. Delmonte, K. M. Morehouse, M. P. Yurawecz, and D. E. Bauman. 2002. *Trans*-7,*cis*-9 CLA is synthesized endogenously by Δ^9 -desaturase in dairy cows. *Lipids* 37:681–688.
- Corl, B.A., D.M. Barbano, D.E. Bauman, C. Ip. 2003. *Cis*-9 *trans*-11 CLA derived endogenously from *trans*-11 18:1 reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.* 133:2893–2900.
- Couvreur, S., C. Hurtaud, C. Lopez, L. Delaby, J. L. Peyraud. 2006. The linear relationship between the proportion of fresh grass in the cow diet, milk fatty acid composition, and butter properties. *J. Dairy Sci.* 89:1956-1969.
- Couvreur, S., C. Hurtaud, P.G. Marnet, P. Faverdin, J. L. Peyraud. 2007. Composition of milk fat from cows selected for milk fat globule size and offered either fresh pasture or a corn silage-based diet. *J. Dairy Sci.* 90:392-403.
- Cruz-Hernandez, C., Z. Deng, J. Zhou, A. R. Hill, M. P. Yurawecz, P. Delmonte, M.M. Mossoba, M.E. Dugan, J.K. Kramer. 2004. Methods for analysis of conjugated linoleic acids and *trans*-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography/ gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography, *J. AOAC Int.* 87:545–562.

- Dannenberger, D., K. Nuernberg, G. Nuernberg, N. Scollan, H. Steinhart, K. Ender. 2005. Effect of pasture vs. concentrate diet on CLA isomer distribution in different tissue lipids of beef cattle. *Lipids*. 40:589-598.
- Dawson, R. M. C., and P. Kemp. 1970. Biohydrogenation of dietary fats in ruminants. Pages 504-518 in *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. A. T., Phillipson, ed. Oriel Press, Newcastle-upon-Tyne.
- Delahoy, J. E., L. D. Muller, F. Bargo, T. W. Cassidy, L. A. Holden. 2003. Supplemental carbohydrate sources for lactating dairy cows on pasture. *J. Dairy Sci.* 86:906-915.
- De Smet, S., K. Raes, D. Demeyer. 2004. Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. *Anim. Res.* 53:81-89.
- Devillard, E., F. M. McIntosh, S. H. Duncan, R. J. Wallace. 2007. Metabolism of linoleic acid by human gut bacteria: different routes for biosynthesis of conjugated linoleic acid. *J. Bacteriol.* 189:2566-2570.
- Dewhurst, R. J., and P. J. King. 1998. Effects of extended wilting, shading and chemical additives on the fatty acids in laboratory grass silages. *Grass Forage Sci.* 53:219-224.
- Dewhurst, R. J., K. J. Shingfield, M. R. F. Lee, and N. D. Scollan. 2006. Increasing the concentration of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:168-206.
- Dhiman, T. R., K. V. Vanten, L. D. Satter. 1995. Effect of dietary fat source on fatty acid composition of cow's milk. *J. Sci. Food Agric.* 69:101-107.
- Dhiman, T. R., G. R. Anand, L. D. Satter, M. W. Pariza. 1999a. Conjugated linoleic acid content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci.* 82:2146-2156.
- Dhiman, T. R., E. D. Helmink, D. J. McMahon, R. L. Fite, M. W. Pariza. 1999b. Conjugated linoleic acid content of milk and cheese from cows feed extruded oilseeds. *J. Dairy Sci.* 82:412-419.
- Dhiman, T. R., L. D. Satter, M. W. Pariza, M. P. Galli, K. Albright, M. X. Tolosa. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk fat from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J. Dairy Sci.* 83:1016-1027.
- Diedrich, M., and K. P. Henschel. 1990. The natural occurrence of unusual fatty acids. 1. Odd numbered fatty acids. *Nahrung*. 34:935-943.
- Doll, R. 1992. The lessons of life: keynote address to the nutrition and cancer conference. *Cancer Res.* 52:2024s-2029s.

- Donovan, D. C., D. J. Schingoethe, R. J. Baer, J. Ryall, A. R. Hippen, S. T. Franklin. 2000. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid and other fatty acids in milk fat from lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:2620-2628.
- Doreau, M., Y. Chilliard. 1997. Effects of ruminal or postruminal fish oil supplementation on intake and digestion in dairy cows. *Reprod. Nutr. Dev.* 37:113–124.
- Doreau, M., Y. Chilliard, H. Rulquin, D. L. Demeyer. 1999. Manipulation of milk fat in dairy cows. Pages 81-109 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. P.C. Garnsworthy, J. Wiseman, ed. Nottingham University Press, Nottingham.
- Dugan, M. E. R., J. L. Aalhus, A. L. Schaefer, J. K. G. Kramer. 1997. The effects of conjugated linoleic acid on fat to lean repartitioning and feed conversion in pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 77:723-725.
- Dunshea, F. R., E. Ostrowska, M. Muralitharan, R. Cross, D. E. Bauman, M. W. Pariza, C. Skarie. 1998. Dietary conjugated linoleic acid decreases back fat in finisher gilts. *J. Anim. Sci.* 76 (Suppl. 1):131. (Abstr.).
- Dunshea, F. R., G. P. Walker, E. Ostrowska, P. T. Doyle. 2008. Seasonal variation in the concentrations of conjugated linoleic and *trans* fatty acids in milk fat from commercial dairy farms is associated with pasture and grazing management and supplementary feeding practices. *Aust. J. Exp. Agric.* 48:1062-1075.
- Elgersma, A., G. Ellen, H. van der Horst, B. G. Muuse, H. Boer, S. Tamminga. 2003a. Comparison of the fatty acid composition of fresh and ensiled perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.), affected by cultivar and regrowth interval. *An. Feed Sci. Technol.* 108:191–205.
- Elgersma, A., S. Tamminga, G. Ellen. 2003b. Effect of grazing *versus* stall-feeding of cut grass on milk fatty acid composition of dairy cows. Pages 271–274 in *Proceedings of the International Occupational Symposium of the European Grassland Federation*. Pleven, Bulgaria.
- Elgersma, A., G. Ellen, P.R. Dekker, H. van der Horst, H. Boer, S. Tamminga. 2003c. Effects of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars with different linolenic acid contents on milk fatty acid composition. *Asp. Appl. Biol.* 70:107–114.
- Elgersma, A., G. Ellen, H. van der Horst, B.G. Muuse, H. Boer, S. Tamminga. 2003d. Influence of cultivar and cutting date on the fatty acid composition of perennial ryegrass. *Grassl. Sci.* 58:323–331.

- Elgersma, A., G. Ellen, H. van der Horst, H. Boer, P. R. Dekker, S. Tamminga. 2004. Quick changes in milk fat composition from cows after transition from fresh grass to a silage diet. *Anim. Feed Sci. Technol.* 117:13-27.
- Elgersma, A., S. Tamminga, G. Ellen. 2006. Modifying milk composition through forage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:207–225.
- Ellis, K.A., G. Innocent, D. Grove-White, P. Cripps, W.G. McLean, C.V. Howard, M. Mihm. 2006. Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. *J. Dairy Sci.* 89:1938–1950.
- Emmanuel, B.1978. The relative contribution of propionate and long-chain even-numbered fatty acids to the production of long-chain odd-numbered fatty acids in rumen bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 528:239-246.
- Enjalbert, F., M. C. Nicot, C. Bayourthe, R. Moncoulon. 1998. Duodenal infusions of palmitic, stearic or oleic acids differently affect mammary gland metabolism of fatty acids in lactating dairy cows. *J. Nutr.* 128:1525-1532.
- Enser, M., K. G. Hallett, B. Hewett, G. A. J. Fursey, J. D. Wood, G. Harrington. 1998. Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Sci.* 49:329-341.
- Eppard, P. J., D. E. Bauman, J. Bitman, D. L. Wood, R. M. Akers, W. A. House. 1985. Effect of dose bovine growth hormone on milk composition: α -lactalbumin, fatty acids, and mineral elements. *J. Dairy Sci.* 68:3047-3054.
- European Food Safety Authority. 2004. Opinion of the scientific panel on dietetic products, nutrition and allergies on a request from the commission related to the presence of *trans*-fatty acids in foods and the effect on human health of the consumption of *trans*-fatty acids. *EFSA Journal.* 1:1-49.
- Fellner, V., F. D. Sauer, J. K. Kramer.1997. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. *J. Dairy Sci.* 80:921-928.
- Ferlay, A., C. Agabriel, C. Sibra, C. Journal, B. Martin, Y. Chilliard. 2008. Tanker milk variability in fatty acids according to farm feeding and husbandry practices in a French semi-mountain area. *Dairy Sci. Technol.* 88:193-215.
- Fievez, V., B.Vlaeminck, M. S.Dhanoa, R. J. Dewhurst. 2003. Use of principal component analysis to investigate the origin of heptadecenoic and conjugated linoleic acids in milk. *J. Dairy Sci.* 86:4047-4053.

- Flowers, G., S. A. Ibrahim, A. A. AbuGhazaleh. 2008. Milk fatty acid composition of grazing dairy cows when supplemented with linseed oil. *J. Dairy Sci.* 91:722–730.
- Folch, J., M. Lees, G. H. Stanley Sloane. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *J. Biol. Chem.* 226:497-509.
- Franklin, S. T., K. R. Martin, R. J. Baer, D. J. Schingoethe, A. R. Hippen. 1999. Dietary marine algae (*Schizochytrium sp.*) increases concentration of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *J. Nutr.* 129:2048-2052.
- Fremann, D. 2000. Conjugated linoleic acids: supply and distribution in the plasma lipid fractions in humans. PH.D. Thesis. Institute of Food Science, Technical University of Munich, Germany.
- Fritsche, J., H. Steinhart. 1998a. Amount of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 206:77-82.
- Fritsche, J., H. Steinhart. 1998b. Analysis, occurrence, and physiological properties of *trans* fatty acid (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA): a review. *Fett/Lipid.* 100:190-210.
- Fritsche, J., R. Rickert, H. Steinhart, M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, N. Sehat, J. A. G. Roach, J. K. G. Kramer, Y. Ku. 1999. Conjugated linoleic acid (CLA) isomers: formation, analysis, amounts in foods, and dietary intake. *Fett/Lipid.* 101:272-276.
- Gaullier, J. M., J. Halse, K. Hoye, K. Kristiansen, H. Fagertun, H. Vik, O. Gudmundsen. (2005). Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans. *J. Nutr.* 135:778-784.
- Giesy, J. G., S. Viswanadha, T. W. Hanson, L. R. Fallen, M. A. McGuire, C. H. Skaric, A. Vinci. 1999. Effects of calcium salts of conjugated linoleic acid (CLA) on estimated energy balance on Holstein cows early in lactation. *J. Dairy Sci.* 82(Suppl. 1):74. (Abstr.).
- Givens, D. I., B. R. Cottrill, M. Davies, P. Lee, R. Mansbridge, A. R. Moss. 2000. Sources of n-3 polyunsaturated fatty acids additional to fish oil for livestock diets – a review. *Nutr. Abstr. Rev. Series B* 71: 55R–83.
- Gläser, K. R., C. Wenk, M. R. Scheeder. 2002. Effects of feeding pigs increasing levels of C18:1 *trans* fatty acids on fatty acid composition of backfat and intramuscular fat as well as backfat firmness. *Arch. Anim. Nutr.* 56:117-130.

- Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage Fibre Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures, and Some Applications). Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.
- Goff, D. H. 1999. Dairy Science and Technology Series. University of Guelph. Canada. <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/home.html> Consultado a 08-08-2005.
- Griinari, J. M., D. A. Dwyer, M. A. McGuire, D. E. Bauman, D. L. Palmquist, K. V. V. Nurmela. 1998a. *Trans*-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1251-1261.
- Griinari, J. M., K. V. V. Nurmela, A. Sairanen, J. I. Nousiainen, H. Khalili. 1998b. Effect of dietary sunflower oil and pasture forage maturity on conjugated linoleic acid (CLA) content in milk fat from lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81(Suppl. 1):300. (Abstr.).
- Griinari, J. M., D. E. Bauman. 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. Pages 180-200 in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 1. M. P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J. K. G. Kramer, G. Nelson, M. W. Pariza, ed. AOCS Press, Champaign.
- Griinari, J. M., B. A. Corl, S. H. Lacy, P. Y. Chouinard, K. V. V. Normela, D. E. Bauman. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesised endogenously in lactating dairy cows by Δ^9 desaturase. *J. Nutr.* 130:2285-2291.
- Gruffat, D., C. Rémond, D. Durand, O. Loreau, D. Bauchart. 2008. 9*cis*, 11*trans* conjugated linoleic acid (CLA) is synthesized and desaturated into conjugated 18:3 in bovine adipose tissues. *Animal.* 2:645-652.
- Grummer, R. R. 1991. Effect of feed on the composition of milk fat. *J. Dairy Sci.* 74:3244-3257.
- Guckert, J. B., M. A. Hood, D. C. White. 1986. Phospholipid ester linked fatty acid profile changes during nutrient deprivation of *Vibrio cholerae*: increases in the *cis/trans* ratio and proportion of cyclopropyl fatty acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 52:794-801.
- Gulati, S. K., S. M. Kitessa, J. R. Ashes, E. Fleck, E. B. Byers, Y. G. Byers, T. W. Scott. 2000. Protection of conjugated linoleic acids from ruminal hydrogenation and their incorporation into milk fat. *Anim. Feed Sci. Technol.* 86:139-148.
- Ha, Y. L., N. K. Grimm, M. W. Pariza. 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis.* 8:1881-1887.

- Ha, Y. L., N. K. Grimm, M. W. Pariza. 1989. Newly recognized anticarcinogenic fatty acids: identification and quantification in natural and processed cheeses. *J. Agric. Food Chem.* 37:75-81.
- Ha, Y. L., J. Storkson, M. W. Pariza. 1990. Inhibition of benzo(a)pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Res.* 50:1097-1101.
- Harfoot, C. G., R. C. Nobel, J. H. Moore. 1973. Food particles as a site of biohydrogenation of unsaturated fatty acids in the rumen. *Biochem. J.* 132:829-832.
- Harfoot, C. G., G. P. Hazlewood. 1988. Lipid metabolism in the rumen. Pages 285-426 in *The rumen microbial ecosystem*. 1st Ed. P. N. Hobson, Ed. Elsevier Science Publ., Ltd., London, England.
- Harfoot, C. G., G. P. Hazlewood. 1997. Lipid metabolism in the rumen. Pages 382-426 in *The rumen microbial ecosystem*. P. N. Hobson, C. S. Stewart, ed. Blackie, London, UK.
- Harvatine, K. J., Y. R. Boisclair, D. L. Bauman. 2009. Recent advances in regulation of milk fat. *Animal* 3:40-54.
- Henderson, C. 1973. The effect of fatty acids on pure cultures of rumen bacteria. *J. Agric. Sci. Camb.* 81:107-112.
- Herbel, B. K., M. K. McGuire, M. A. McGuire, T. D. Shultz. 1998. Safflower oil consumption does not increase plasma conjugated linoleic acid concentrations in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:332-337.
- Hilditch, T. P. 1956. The chemical constitution of natural fats. Triglyceride fats in human nutrition. Fifty-fifth scientific meeting, Birmingham. Chapman & Hall Ltd., London.
- Hollo, G., K. Nuernberg, I. Repa, I. Hollo, J. Seregi, G. Pohn, et al. 2005. The influence of feeding on the composition of the intramuscular fat of the longissimus and various fat depots of young bulls Hungarian Grey cattle breeds and Holstein Friesian. *Arch. Tierz.* 48:537-546.
- Holman, R. T. 1998. The slow discovery of the importance of omega-3 essential fatty acids in human health. *J. Nutr.* 128:427s-433s.
- Houseknecht, K. L., J. P. Vanden Heuvel, S. Y. Moya-Camarena, C. P. Portocarrero, L. W. Peck, K. P. Nickel, M. A. Belury. 1998. Dietary conjugated linoleic acid

- normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa Rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244:678-682.
- Ip, C., S. F. Chin, J. A. Scimeca, M. W. Pariza. 1991. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.* 51:6118-6124.
- Ip, C., J. A. Scimeca, H. J. Thompson. 1994a. Conjugated Linoleic Acid: a powerful anticarcinogen from animal fat sources. *Cancer.* 74:1050-1054.
- Ip, C., M. Singh, H. J. Thompson, J. A. Scimeca. 1994b. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Res.* 54:1212-1215.
- Ip, C., S. Banni, E. Angioni, G. Carta, J. McGinley, H. Thompson, D. Barbano, D. Bauman. 1999. Conjugated linoleic acid enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. *J. Nutr.* 129:2135-2142.
- Jahreis, G., J. Fritsche, H. Steinhart. 1997. Conjugated linoleic acid in milk fat: high variation depending on production system. *Nutr. Res.* 17:1479-1484.
- Jahreis, G., J. Fritsche, J. Kraft. 1999. Species-dependent, seasonal, and dietary variation of conjugated linoleic acid in milk. Pages 215-225 in *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. Vol. 1. M. P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J. K. G. Kramer, G. Nelson, M. W. Pariza, ed. AOCS Press, Champaign, IL, USA.
- Jiang, J. L., L. Björck, R. Fondén, M. Emanuelson. 1996. Occurrence of conjugated *cis*-9, *trans*-11-octadecenoic acid in bovine milk: effects of feed and dietary regimen. *J. Dairy Sci.* 79:438-445.
- Jensen, R. G., A. M. Ferris, C. J. Lammi-Keefe. 1991. The composition of milk-fat. *J. Dairy Sci.* 74:3228-3243.
- Jones, D. F., W. P. Weiss, D. L. Palmquist. 2000. Short communication: Influence of dietary tallow and fish oil in milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 83:2024-2026.
- Kadegowda, A. K. G., L. S. Piperova, R. A. Erdman. 2008. Principal component and multivariate analysis of milk long-chain fatty acid composition during diet-induced fat depression. *J. Dairy Sci.* 91:749-759.
- Kalscheur, K. F., B. B. Teter, L. S. Piperova, R. A. Erdman. 1997. Effect of dietary forage concentration and buffer addition on duodenal flow of *trans*-C18:1 fatty acids and milk fat production in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80:2104-2114.
- Kaneda, T. 1991. *Iso*- and *anteiso*-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol. Rev.* 55:288-302.

- Kay, J. K., T. R. Mackle, M. J. Auldist, N. A. Thomson, D. E. Bauman. 2004. Endogenous synthesis of *cis*-9,*trans*-11 conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. *J. Dairy Sci.* 87:369-378.
- Kay, J.K., J.R. Roche, E.S. Kolver, N.A. Thomson, L.H. Baumgard. 2005. A comparison between feeding systems (pasture and TMR) and the effect of vitamin E supplementation on plasma and milk fatty acid profiles in dairy cows. *J. Dairy Res.* 72:322-332.
- Keady, T.W.J., C.S. Mayne, D.A. Fitzpatrick. 2000. Effects of supplementation of dairy cattle with fish oil on silage intake, milk yield and milk composition. *J. Dairy Res.* 67:137– 153.
- Keenan, T. W., S. Patton. 1995. The milk lipid globule membrane. Pages 5-62 in *Handbook of Milk Composition*. R. G. Jensen, ed. Academic Press, New York.
- Keeney, M., I. Katz, M. J. Allison. 1962. On the probable origin of some milk fatty acids in rumen microbial lipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 39:198-201.
- Keeney, M. 1970. Lipid Metabolism in the Rumen. Pages 489-503 in *Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant*. A. T. Phillipson, ed. Oriel Press, Newcastle-Upon-Tyne.
- Kelly, M. L., D. E. Bauman. 1996. Conjugated linoleic acid: a potent anticarcinogen found in milk fat. Pages 68-74 in *Proceedings of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*. Cornell University, Department of Animal Sciences, Ithaca, NY, USA.
- Kelly, M. L., E. S. Kolver, D. E. Bauman, M. E. Van Amburgh, L. D. Muller. 1998a. Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:1630-1636.
- Kelly, M. L., J. R. Berry, D. A. Dwyer, J. M. Griinari, P. Y. Chouinard, M. E. Van Amburgh, D. E. Bauman. 1998b. Dietary fatty acids sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr.* 128:881-885.
- Kepler, C. R., W. P. Tucker, S. B. Tove. 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 241:1350-1354.
- Kepler, C.R., W.P. Tucker, S B. Tove. 1970. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. IV. Substrate specificity and inhibition of linoleate delta 12-*cis*, delta 11-*trans* isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 245:3612-3620.

- Khanal, R. C., K. C. Olson. 2004. Factors affecting conjugated linoleic acid (CLA) content in milk, meat, and egg: a review. *Pak. J. Nutr.* 3:82-89.
- Khanal, R. C., T. R. Dhiman, R. L. Boman. 2008. Changes in fatty acid composition of milk from lactating dairy cows during transition to and from pasture. *Livest. Sci.* 114:164-175.
- Kinsella, J.E. 1972. Stearyl CoA as a precursor of oleic acid and glycerolipids in mammary microsomes for lactating bovine: possible regulatory step in milk triglyceride synthesis. *Lipids.* 7:349-355.
- Knekt, P., R. Jarvinen, R. Seppanen, E. Pukkala, A. Aromaa. 1996. Intake of dairy products and the risk of breast cancer. *Br. J. Cancer.* 73:687-691.
- Kolver, E. S., L. D. Muller. 1998. Performance and nutrient intake of high producing Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 81:1403-1411.
- Kramer, J. K. G., P. W. Parodi, R. G. Jensen, M. M. Mossoba, M. P. Yurawecz, R. O. Adlof. 1998. Rumenic acid: a proposed common name for the major conjugated acid isomer found in natural products. *Lipids.* 33:835.
- Kraft, J., M. Collomb, P. Möckel, R. Sieber, G. Jahreis. 2003. Differences in CLA isomer distribution of cow`s milk. *Lipids.* 38:657-664.
- Kraft, J., J. K. G. Kramer, F. Schoene, J. R. Chambers, G. Jahreis. 2008. Extensive analysis of long-chain polyunsaturated fatty acids, CLA, *trans*-18:1 isomers, and plasmalogenic lipids in different retail beef types. *J. Agric. Food Chem.* 56:4775-4782.
- Kritchevsky, D. 1998. History of recommendations to the public about dietary fat. *J. Nutr.* 128:449s-452s.
- Kuhnt, K., J. Kraft, P. Mockel, G. Jahreis. 2006. *Trans*-11-18:1 is effectively delta-9-desaturated compared with *trans*-12-18:1 in humans. *Br. J. Nutr.* 95:752-761.
- Lavillonnière, F., J.C. Martin, P. Bougnoux, J.L. Sébédio. 1998. Analysis of conjugated linoleic acid isomers and content in French cheeses. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75:343-352.
- Lawless, F., J.J. Murphy, J.J. Harrington, R. Devery, C. Stanton. 1998. Elevation of conjugated *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoic acid in bovine milk because of dietary supplementation. *J. Dairy Sci.* 81:3259-3267.

- Lawless, F., C. Stanton, L. L'Escop, R. Devery, P. Dillon, J.J. Murphy. 1999. Influence of breed on bovine milk *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid content. *Livest. Prod. Sci.* 62:43-49.
- Ledoux, M., P. Juanéda, J. L Sébédio. 2007. *Trans* fatty acids: definition and occurrence in foods. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:891-900.
- Lee, K.N, D. Kritchevsky, M.W. Pariza. 1994. Conjugated linoleic acid and atherosclerosis in rabbits. *Atherosclerosis.* 108:19-25.
- Lee, K.N, M.W. Pariza, J.M. Ntambi. 1998. Conjugated linoleic acid decreases hepatic Stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248:817-821.
- Léger, C. L., L. Razanamahefa, I. Margaritis. 2007. Health risks and benefits of *trans* fatty acids including conjugated fatty acids in food e synopsis of the AFSSA report and recommendations. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109:887-890.
- Leite, J., E. Lima, J. Baptista. 2007. Azorean bovine milk conjugated linoleic acid. Effect of green pasture diet, storage and processing temperature. *Lait.* 87:167–179.
- Letha, T., L. Ovesena, K. Hansenb. 1998. Fatty acid composition of meat from ruminants, with special emphasis on *trans* fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75:1001-1005.
- Liew, C., H.A. Schut, S.F. Chin, M.W. Pariza, R.H. Dashwood. 1995. Protection of conjugated linoleic acids against 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline-induced colon carcinogenesis in the F344 rat: a study of inhibitory mechanisms. *Carcinogenesis.* 16:3037-3043.
- Lin, H., T.D. Boylston, M. J. Chang, L.O. Luedecke, T.D. Shultz. 1995. Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *J. Dairy Sci.* 78:2358-2365.
- Lock, A. L., P.C. Gransworthy. 2003. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and Δ^9 -desaturase activity in dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 79:47-59.
- Lock, A. L., D. E. Bauman, P. C. Garnsworthy. 2005. Short communication: effect of production variables on the *cis*-9,*trans*-11 conjugated linoleic acid content of cows' milk. *J. Dairy Sci.* 88:2714-2717.
- Lock, A. L., C. Tyburczy, D. A. Dwyer, K. J. Harvatine, F. Destailats, Z. Mouloungui, I. Candy, and D. E. Bauman. 2007. *Trans*-10 octadecenoic acid does not reduce milk fat synthesis in dairy cows. *J. Nutr.* 137:71–76.

- Loor, J. J. and J.H. Herbein. 1998. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting *de novo* fatty acid synthesis. *J. Nutr.* 128:411-419.
- Loor, J.J., J.H. Herbein, C.E. Polan. 2002. *Trans*18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat of grazing cows fed a grain supplement containing solvent-extracted or mechanically extracted soybean meal. *J. Dairy Sci.* 85:1197-1207.
- Loor, J.J., A. Ferlay, A. Ollier, K. Ueda, M. Doreau, Y. Chilliard. 2003. Conjugated linoleic acids (CLA) and *trans* fatty acid profiles of blood plasma and milk fat in dairy cows fed a high-concentrate diet supplemented with linseed, sunflower, or fish oil. *J. Anim. Sci.* 81(Suppl. 1):269. (Abstr.).
- Loor, J.J., M. Doreau, J.M. Chardigny, A. Ollier, J.L. Sebedio, Y. Chilliard. 2005a. Effects of ruminal or duodenal supply of fish oil on milk fat secretion and profiles of *trans*-fatty acids and conjugated linoleic acid isomers in dairy cows fed maize silage. *Anim. Feed Sci. Technol.* 119:227-246.
- Loor, J. J., A. Ferlay, A. Ollier, K. Ueda, M. Doreau, and Y. Chilliard. 2005b. Relationship among *trans* and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil. *J. Dairy Sci.* 88:726-740.
- Luna, P., M.A. De la Fuente, M. Juárez. 2005. Conjugated linoleic acid in processed cheeses during the manufacturing stages. *J. Agric. Food Chem.* 53:2690-2695.
- MacGibbon, A.H., Y.E.H. Van der Does, B.Y. Fong, N.P. Robinson, N.A. Thomson. 2001. Variations in the CLA content of New Zealand milk fat. *Aust. J. Dairy Technol.* 56:158.
- Maczulac, A. E., B. A. Dehorty, D. L. Palmquist. 1981. Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 42:856-862.
- MAFF. 1975. Energy allowances and feeding systems for ruminants. Technical Bulletin n° 33. London, HMSO, UK.
- Martin, J.C., K. Valeille. 2002. Conjugated linoleic acid: all the same or to everyone its own function? *Reprod. Nutr. Dev.* 42:525-536.
- Martins, S.V., P.A. Lopes, C.M. Alfaia, V.S. Ribeiro, T.V. Guerreiro, C. Fontes, M.F. Castro, G. Soveral, J.A. Prates. 2007. Contents of conjugated linoleic acid in ruminant– derived foods and estimation of their contribution to daily intake in Portugal. *Brit. J. Nutr.* 98:1206-1213.

- Massart-Leën, A. M., E. Roets, G. Peeters, R. Verbeke. 1983. Propionate for fatty acid synthesis by the mammary gland of the lactating goat. *J. Dairy Sci.* 66:1445-1454.
- Mather, I.H., T.W. Keenan. 1998. Origin and secretion of milk lipids. *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia.* 3:259-273.
- McDougall, E.I. 1948. Studies on ruminant saliva. The composition and output of sheep's saliva. *Biochem. J.* 43:99-109.
- McGuire, M.A., M.K. McGuire, M.A. Guy, W.K. Sanchez, T.D. Shultz, L.Y. Harrison, D.E. Bauman, J.M. Griinari. 1996. Effect of dietary lipid concentration on content of conjugated linoleic acid (CLA) in milk from dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 74(Suppl. 1): 266. (Abstr.).
- McLeod, R. S., A. M. LeBlanc, M. A. Langille, P. L. Mitchell, D. L. Currie. 2004. Conjugated linoleic acids, atherosclerosis, and hepatic very-low-density lipoprotein metabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:1169S-1174S.
- Miller, C.C., Y. Park, M.W. Pariza, M.E. Cook. 1994. Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198:1107-1112.
- Minato, H., S. Ishibashi, T. Hamaoka. 1988. Cellular fatty acid and sugar composition of representative strains of rumen bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 34:303-319.
- Moate, P. J., W. Chalupa, R. C. Boston, I. J. Lean. 2007. Milk fatty acids. I. Variation in the concentration of individual fatty acids in bovine milk. *J. Dairy Sci.* 90:4730-4739.
- Molkentin, J.A., and D. Precht. 1995. Optimized analysis of *trans*-octadecenoic acids in edible fats. *Chromatographia.* 41:267-272.
- Mosley, E. E., G. L. Powell, M. B. Riley, T. C. Jenkins. 2002. Microbial biohydrogenation of oleic acid to *trans* isomers in vitro. *J. Lipid Res.* 43:290–296.
- Mosley, E. E., M. K. McGuire, J. E. Williams, M. A. McGuire. 2006a. *cis*-9,*trans*-11 conjugated linoleic acid is synthesized from vaccenic acid in lactating women. *J. Nutr.* 136:2297-2301.
- Mosley, E. E., B. Shafii, P. J. Moate, M. A. McGuire. 2006b. *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid is synthesized directly from vaccenic acid in lactating dairy cattle. *J. Nutr.* 136:570-575.
- Murphy, J.J., G.P. McNeill, J.F. Connolly, P.A. Gleeson. 1990. Effect on cow performance and milk fat composition of including full fat soybeans and

- rapeseeds in the concentrate mixture for lactating dairy cows. *J. Dairy Res.* 57:295-306.
- Murphy, J.J., J.F. Connolly, G.P. McNeill. 1995. Effects on cow performance and milk fat composition of feeding full fat soybeans and rapeseeds to dairy cows at pasture. *Livest. Prod. Sci.* 44:13-25.
- Ney, D.M. 1991. Potential for enhancing the nutrition properties of milk fat. *J. Dairy Sci.* 74:4002-4012.
- Nicolosi, R.J., E.J. Rogers, D. Kritchevsky, J.A. Scimeca, P.J. Huth. 1997. Dietary conjugated linoleic acid reduces plasma lipoproteins and early atherosclerosis in hypercholesterolemic hamsters. *Artery.* 22:266-277.
- Nielsen, T.S., K. Sejrsen, H. R. Andersen, P. Lund, E. M. Staarup. 2004. Effect of silage type and energy concentration on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J. Anim. Feed Sci.* 13(Suppl. 1):697-700.
- Norma Portuguesa ISO 5508:1990 – Documento de Trabalho. 1996. Óleos e gorduras de origem animal e vegetal – análise por cromatografia em fase gasosa de ésteres metílicos de ácidos gordos.
- Ntambi, J.M. 1995. The regulation of Stearoyl-CoA Desaturase (SCD). *Prog. Lipid Res.* 34:139-150.
- Nurnberg, K., J. Wegner, K. Ender. 1998. Factors influencing fat composition in muscle and adipose tissue of farm animals. *Livest. Prod. Sci.* 56:145-156.
- Nuernberg, K., D. Dannenberger, G. Nuernberg, K. Ender, J. Voigt, N. D. Scollan, et al. 2005. Effect of a grass-based and a concentrate feeding system on meat quality characteristics and fatty acid composition of longissimus muscle in different cattle breeds. *Livest. Prod. Sci.* 94:137-147.
- O'Donnell, J.A. 1989. Milk fat technologies and markets: a summary of the Wisconsin milk marketing board 1988 Milk Fat Roundtable. *J. Dairy Sci.* 72:3109-3115.
- Offer, N. W., M. Marsden, J. Dixon, B. K. Speake, Thacker. 1999. Effect of dietary fat supplements on levels of *n*-3 polyunsaturated fatty acids, *trans* acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. *Anim. Sci.* 69:613-625.
- Or-Rashid, M. M., N. E. Odongo, B. Subedi, P. Karki, B. W. McBride. 2008. Fatty acid composition of yak (*Bos grunniens*) cheese including conjugated linoleic acid and *trans*-18:1 fatty acids. *J. Agric. Food Chem.* 56:1654-1660.

- O'Shea, M., R. Devery, F. Lawless, J. Murphy, C. Stanton. 2000. Milk fat conjugated linoleic acid inhibits growth of human mammary MCF-7 cancer cells. *Anticancer Res.* 20:3591-3602.
- Oshio, S., I. Tahata, H. Minato. 1987. Effect of diets differing in ratios of roughage to concentrate on microflora in the rumen of heifers. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:99-111.
- Page, A. M, C. A. Sturdivant, D. K. Lunt, S. B. Smith. 1997. Dietary whole cottonseed depresses lipogenesis but has no effect on Stearoyl Coenzyme Desaturase activity in subcutaneous adipose tissue. *Comp. Biochem. Physiol.* 118B:79-84.
- Palmquist, D. L. 1988. The feeding value of fats. Pages 293-311 in *Feed Science – World Animal Science*. E. R. Orskov, E. R. Elsevier, ed. Sci. Publ., Amsterdam.
- Palmquist, D. L., A. D. Beaulieu D. M. Barnano. 1993. Feed and Animal Factors Influencing Milk Fat Composition. *J. Dairy Sci.* 76:1753-1771.
- Palmquist, D. L., A. L. Lock, K. J. Shingfield, D. E. Bauman. 2005. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. *Adv. Food Nutr. Res.* 50:179-217.
- Pariza, M. W., W. A. Hargraves. 1985. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumours by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Carcinogenesis.* 6:591-593.
- Pariza, M. W. 1997. Conjugated linoleic acid, a newly recognized nutrient. *Chem. Ind.* 12:464-466.
- Pariza, M. W. 1999. The Biological Activities of Conjugated Linoleic Acids. Pages 12-20 in *Advances in conjugated linoleic acid research*. Vol. 1. M. P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J. K. G. Kramer, G. Nelson, M. W. Pariza, ed. AOCS Press.
- Pariza, M. W., Y. Park, M.E. Cook. 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* 40:283-298.
- Park, Y., K.J. Albright, J.M. Storkson, M. E. Cook, M.W. Pariza. 1997. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids.* 32:853-858.
- Park, Y., J.M. Storkson, K. J. Albright, W. Liu, M.W. Pariza. 1999a. Evidence that the *trans*-10, *cis*-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids.* 34:235–241.
- Park, Y., K. J. Albright, J.M. Storkson, W. Liu, M. E. Cook, M.W. Pariza. 1999b. Changes in body composition during feeding and withdrawal of dietary conjugated linoleic acid. *Lipids.* 34:243-248.

- Parodi, P. W. 1976. Distribution of isomeric octadecenoic fatty acids in milk fat. *J. Dairy Sci.* 59:1870-1873.
- Parodi, P. W. 1977. Conjugated Octadecadienoic Acids of Milk Fat. *J. Dairy Sci.*, 60: 1550-1553.
- Parodi, P. W. 1982. Positional distribution of fatty acids in the triglyceride classes of milk fat. *J. Dairy Res.* 49:73-80.
- Parodi, P. W. 1994. Conjugated linoleic acid – an anticarcinogenic fatty acid present in milk fat. *Aust. J. Dairy Technol.* 49:93-97.
- Parodi, P. W. 1999. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy Sci.* 82:1339-1349.
- Pestana, J. M., S. I. V. Martins, C. M. M. Alfaia, P. A. Lopes, R. J. B. Bessa, M. L. F. Castro, J. A. M. Prates. 2009. Content and distribution of conjugated linoleic acid isomers in bovine milk, cheese and butter from Azores. *Dairy Sci. Technol.* 89: 193-200.
- Peterson, D. G., J. A. Kelsey, D. E. Bauman. 2002. Analysis of variation in *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:2164-2172.
- Pimentel, C. C. S., O. Rego, H. D. J. Rosa, S. P. Alves, C. M. M. Alfaia, J. A. M. Prates, C. M. Vouzela, A. E. S. Borba, R. J. B. Bessa. 2008. Caracterização do perfil dos AG da gordura de laticínios provenientes dos Açores e do Continente Português. XVII Congresso de Zootecnia - Desenvolvimento Sustentável das Regiões, 16-19 de Abril, S. Miguel, Açores. p.90.
- Piperova, L. S., B. B. Teter, I. Bruckental, J. Sampugna, S. E. Mills, M. P. Yurawecz, J. Fritsche, K. Ku, R. A. Erdman. 2000. Mammary lipogenic enzyme activity, *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed milk fat-depressing diet. *J. Nutr.* 130:2568-2574.
- Polidori, P., G. L. Maggi, V. M. Moretti, F. valfre, P. Navarotto. 1993. A note on the effect of the use of bovine somatotrophin on the fatty acid composition of the milk fat in dairy cows. *Anim. Prod.* 57:319-322.
- Ponnampalam, E. N., N. J. Mann, A. J. Sinclair. 2006. Effect of feeding systems on omega-3 fatty acids, conjugated linoleic acid and *trans* fatty acids in Australian beef cuts: potential impact on human health. *Asian Pac. J. Clin. Nutr.* 15:21-29.

- Precht, D., and J. Molquentin. 1997. Effect of feeding on conjugated *cis* Δ 9, *trans* Δ 11-octadecadienoic acid and other isomers of linoleic acid in bovine milk fats. *Nahrung*. 41:330-335.
- Precht, D., and J. Molquentin. 2000. Frequency distributions of conjugated linoleic acid and trans fatty acid contents in European bovine milk fats. *Milchwissenschaft*. 55:687-691.
- Raes, K., V. Fievez, T. T. Chow, D. Ansorena, D. Demeyer, S. S. De. 2004. Effect of diet and dietary fatty acids on the transformation and incorporation of C18 fatty acids in double-muscled Belgian Blue young bulls. *J. Agric. Food Chem.* 52:6035-6041.
- Rego, O.A., e J. A. A. Almeida. 2002. Suplementação de vacas leiteiras em pastoreio com silagem de milho e erva. 2. Efeito sobre o perfil dos ácidos gordos dos triglicéridos do leite e plasma sanguíneo. *Rev. Port. Zootec.* IX (2):85-93.
- Rego, O.A., P. V. Portugal, M. B. Sousa, H. J. D. Rosa, C. M. Vouzela, A. E. S. Borba, R. J. B. Bessa. 2004. Effect of diet on the fatty acid pattern of milk from dairy cows. *Anim. Res.* 53:213-220.
- Rego, O.A., H. J. D. Rosa, P. V. Portugal, T. Franco, C. M. Vouzela, A. E. S. Borba, R. J. B. Bessa. 2005a. The effect of supplementation with sunflower and soybean oils on the fatty acid profile of milk fat from grazing dairy cows. *Anim. Res.* 54:17-24.
- Rego, O.A., H. J. D. Rosa, P. V. Portugal, R. Cordeiro, A. E. S. Borba, C. M. Vouzela, R. J. B. Bessa. 2005b. Influence of dietary fish oil on conjugated linoleic acid, ω -3 and other acids in milk fat from grazing dairy cows. *Livest. Prod. Sci.* 95:27-33.
- Rego, O.A., R.M. Bouça, P. V. Portugal, A. E. S. Borba, H. J. D. Rosa, C. M. Vouzela, R. J. B. Bessa. 2005c. Efeito directo e residual da suplementação com óleo de peixe sobre os conjugados do ácido linoleico (CLA), ω 3 e outros ácidos gordos da gordura do leite de vacas leiteiras em pastoreio. *Rev. Port. Zootecnia*. Ano XII, 1:1-21.
- Rego, O.A., H. J. D. Rosa, S. M. Regalo, S. P. Alves, C. M. M. Alfaia, J. A. M. Prates, C. Vouzela, R. J. B. Bessa. 2008a. Short communication: Seasonal changes of CLA isomers and other fatty acids of milk fat from grazing dairy herds in the Azores. *J. Sci. Food Agric.* 10:1855-1859.
- Rego, O.A., S. M. Regalo, H. J. D. Rosa, S. P. Alves, A. E. S. Borba, R. J. B. Bessa, A. R. J. Cabrita, A.J.M. Fonseca. 2008b. Effects of grass silage and soybean meal

- supplementation on milk production and milk fatty acid profiles of grazing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:21736-2743.
- Rego, O.A., S. P. Alves, L. M. S. Antunes, H. J. D. Rosa, C. M. M. Alfaia, J. A. M. Prates, A. R. J. Cabrita, A.J.M. Fonseca, R. J. B. Bessa. 2009. Rumen biohydrogenation-derived fatty acids in milk fat from grazing dairy cows supplemented with rapeseed, sunflower, or linseed oils. *J. Dairy Sci.* 92:4530-4540.
- Reis, R.B., D.K. Combs. 2000a. Effects of corn processing and supplemental hay on rumen environment and lactation performance of dairy cows grazing grass-legume pasture. *J. Dairy Sci.* 83:2529-2538.
- Reis, R.B., D.K. Combs. 2000b. Effects of increasing levels of grain supplementation on rumen environment and lactation performance of dairy cows grazing grass-legume pasture. *J. Dairy Sci.* 83:2888-2898.
- Riel, R. R. 1963. Physico-chemical characteristics of Canadian milk fat: unsaturated fatty acids. *J. Dairy Sci.* 46:102-106.
- Rickert, R., H. Steinhart, J. Fristche, J. Sehat, M.P. Yurawecz, M.M. Mossoba, J.A.G. Roach, K. Eulitz, Y. Ku, J.K.G. Kramer. 1999. Enhanced resolution of conjugated linoleic acid isomers by tandem-column silver-ion high performance liquid chromatography. *J. High Resolut. Chrom.* 22:144-148.
- Rogers, G. L. 1979. The effects of forage diets on milk fat composition. Page 58 in Ellinbank Dairy Research Station Annual Report. Victoria Dep. Agric.
- Roy, A., A. Ferlay, K.J. Shingfield, Y. Chilliard. 2006. Examination of the persistency of milk fatty acid composition responses to plant oils in cows given different basal diets, with particular emphasis on *trans*-C18:1 fatty acids and isomers of conjugated linoleic acid. *Anim. Sci.* 82:479-492.
- Roy, A., J.M. Chardigny, D. Bauchart, A. Ferlay, S. Lorenz, D. Durand, et al. 2007. Butters rich either in *trans*-10-C18:1 or in *trans*-11-C18:1 plus *cis*-9,*trans*-11 CLA differentially affect plasma lipids and aortic fatty strea in experimental atherosclerosis in rabbits. *Animal.* 1:467-476.

- Rule, D. C., K. S. Broughton, S. M. Shellito, G. Maiorano. 2002. Comparison of muscle fatty acid profiles and cholesterol concentrations of bison, beef cattle, elk, and chicken. *J. Anim. Sci.* 80:1202-1211.
- Ryhänen, E. L., K. Tallavaara, J. M. Griinari, S. Jaakkola, S. Mantere-Alhonen, K. J. Shingfield. 2005. Production of conjugated linoleic acid enriched milk and dairy products from cows receiving grass silage supplemented with a cereal-based concentrate containing rapeseed oil. *Int. Dairy J.* 15:207-217.
- Salminen, L., M. Mutanen, M. Jauhiainen, A. Aro. 1998. Dietary *trans* fatty acids increase conjugated linoleic acid levels in human serum. *J. Nutr. Biochem.* 9:93-98.
- Sargent, J.R. 1997. Fish oil and human diet. *Br. J. Nutr.* 78(Suppl. 1):S5– S13.
- SAS. 1989. SAS/TAT[®] User's guide: Version 6, 4th Edition. SAS Inst. Cary, NC, 846.
- Sauer, F. D., V. Fellner, R. Kinsman, J. K. Kramer, H. A. Jackson, A. J. Lee, S. Chen. 1998. Methane output and lactation response in Holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. *J. Anim. Sci.* 76:906-914.
- Scaife, J. R., K. W. J. Wahle, G. A. Garton. 1978. Utilization of methylmalonate for the synthesis of branched-chain fatty acids by preparation of chicken liver and sheep adipose tissue. *Biochem. J.* 176:799-804.
- Schmid, A., M. Collomb, R. Sieber, G. Bee. 2006. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: a review. *Meat Sci.* 73:29-41.
- Schroeder, G. F., G. A. Gagliostro, D. Becu-Villalobos, I. Lacau-Mengido. 2002. Supplementation with partially hydrogenated oil in grazing dairy cows in early lactation. *J. Dairy Sci.* 85:580–594.
- Schroeder, G. F., G. A. Gagliostro, F. Bargo, J. E. Delahoy, L. D. Muller. 2003. Milk fatty acid composition of cows fed a total mixed ration or pasture plus concentrates replacing corn with fat. *J. Dairy Sci.* 86:3237-3248.
- Schroeder, G. F., G. A. Gagliostro, F. Bargo, J. E. Delahoy, L. D. Muller. 2004. Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. *Livest. Prod. Sci.* 86:1-18.
- Scott, T. W., L. J. Cook, S. C. Milss. 1971. Protection of dietary polyunsaturated fatty acids against microbial hydrogenation in ruminants. *J. Am. Oil Soc.* 48:358-364.
- Secchiari, P., M. Antongiovanni, M. Mele, A. Serra, A. Buccioni, G. Ferruzi, F. Paoletti, and F. Petacchi. 2003. Effect of kind of dietary fat on the quality of milk fat from Italian Frisian cows. *Livest. Prod. Sci.* 83:43–52.

- Seltzer, S. 1972. *Cis-trans* Isomerization. Pages 381-406 in *The Ezymes*. P. D. Boyer, ed. Academic Press, New York.
- Shingfield, K. J., S. Ahvenjärvi, V. Toivonen, A. Ärölä, K. V. V. Nurmela, P. Huhtanen, J. Griinari. 2003. Effect of dietary fish oil biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. *Anim. Sci.* 77:165-179.
- Shingfield, K. J., P. Salo-Väänänen, E. Pahkala, V. Toivonen, S. Jaakkola, V. Piironen, P. Huhtanen. 2005. Effect of forage conservation method, concentrate level and propylene glycol on the fatty acid composition and vitamin content of cow's milk. *J. Dairy Res.* 72:1-13.
- Shingfield, K. J., Y. Chilliard, V. Toivonen, P. Kairenius, D. I. Givens. 2008. *Trans* fatty acids and bioactive lipids in ruminant milk. *Adv. Exp. Med. Biol.* 606:3-65.
- Shorland, F. B., R. O. Weenink, A. T. Johns, I. R. C. McDonald. 1957. The effect of sheep-rumen contents on unsaturated fatty acids. *Biochem. J.* 67:328-333.
- Sikkema, J., J. A. M. deBont, B. Poolman. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.* 59:201-222.
- Singh, A. P., C. A. Avramis, J. K. G. Kramer, A. G. Marangoni. 2004. Algal meal supplementation of the cow's diet alters the physical properties of the milk fat. *J. Dairy Res.* 71:66-73.
- Sisk, M., M. J. Azain, D. B. Hausman, D. E. Jewell. 1998. Conjugated linoleic acid on fat pad weights and cellularity in Sprague-Dawley and Zucker rats. *FASEB J.* 12:A536.
- Smith, S. 1994. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* 8:1248-1259.
- Solomon, R., L. E. Chase, B. Ben-Ghedalia, D. E. Bauman. 2000. The effect of non-structural carbohydrate and addition of full fat extruded soybeans on the concentration of conjugated linoleic acid in the milk fat of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 83:1322-1329.
- Sol Morales, M., D.L. Palmquist, W.P. Weiss. 2000a. Effects of fat source and copper on unsaturation of blood and milk triacylglycerol fatty acids in Holstein and Jersey cows. *J. Dairy Sci.* 83:2105-2111.
- Sol Morales, M., D.L. Palmquist, W.P. Weiss. 2000b. Milk fat composition of Holstein and Jersey cows with control or depleted copper status and fed whole soybeans or tallow. *J. Dairy Sci.* 83:2112-2119.

- Soriano, F. D., C. E. Polan, C. N. Miller. 2000. Milk production and composition, rumen fermentation parameters, and grazing behavior of dairy cows supplemented with different forms and amounts of corn grain. *J. Dairy Sci.* 83:1520-1529.
- Spector, A. A., M. A. Yorek. 1985. Membrane lipid composition and cellular function. *J. Lipid Res.* 26:1015-1035.
- Stanton, C., F. Lawless, G. Kjellmer, D. Harrington, R. Devery, J. F. Connolly, J. Murphy. 1997. Dietary influences on bovine milk *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid content. *J. Food Sci.* 62:1083–1086.
- Storry, J. E., P. E. Brumby, A. J. Hall, B. Tuckley. 1974. Effects of free and protected forms of cod liver oil on milk fat secretion in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 57:1046-1049.
- Terpstra, A. H. 2004. Effect of conjugated linoleic acid on body composition and plasma lipids in humans: an overview of the literature. *Am. J. Clin. Nutr.* 79:352-361.
- Tesfa, A. T., M. Tuori, L. Syrjäläquist. 1991. High rapeseed oil feeding to lactating dairy cows and its effect on milk yield and composition in ruminants. *Finn. J. Dairy Sci.* 74:65-81.
- Thiel, R. L., J. C. Sparks, B. R. Wiegand, Parrish, F. C. Jr., R. C. Ewan. 1998. Conjugated linoleic acid improves performance and body composition in swine. Page 61 in Midwest Animal Science Meetings. Abstract 127. Midwestern Section, American Society of Animal Science, Savoy, IL.
- Thompson, H., Z. Zhu, S. Banni, K. Darcy, T. Loftus, C. Ip. 1997. Morphological and biochemical status of the mammary gland as influenced by conjugated linoleic acid: implication for a reduction in mammary cancer risk. *Cancer Res.* 57:5067-5072.
- Tilley, J. M. A. and R. A. Terry. 1963. A two-stage technique *in vitro* digestion of forage crops. *J. Brit. Grassl. Soc.* 18:104-111.
- Timmen, H., and S. Patton. 1988. Milk fat globules: fatty acid composition, size and *in vivo* regulation of fat liquidity. *Lipids.* 23:685-689.
- Tocher, D. R., M. J. Leaver, P. A. Hodgson. 1998. Recent advances in the biochemistry and molecular biology of fatty acyl desaturases. *Prog. Lipid Res.* 37:73-117.
- Tricon, S., P. Yaqoob. 2006. Conjugated linoleic acid and human health: a critical evaluation of the evidence. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 9:105-110.

- Tricon, S., G. C. Burdge, E. L. Jones, J. J. Russell, S. El-Khazen, E. Moretti, et al. 2006. Effects of dairy products naturally enriched with *cis*-9,*trans*-11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy middle-aged men. *Am. J. Clin. Nutr.* 83:744-53.
- Troegeler-Meynadier, A., F. Enjalbert. 2005. Les acides linoléiques conjugués: 2. Origines et effets sur les productions animales. *Rev. Med. Vet.* 156:207-216.
- Tsiplakou, E., K. C. Mountzouris, G. Zervas. 2006. The effect of breed, stage of lactation and parity on sheep milk fat CLA content under the same feeding practices. *Livest. Sci.* 105:162-167.
- Tsiplakou, E., A. Kominakis, G. Zervas. 2008. The interaction between breed and diet on CLA and fatty acids content of milk fat of four sheep breeds kept indoors or at grass. *Small Rumin. Res.* 74:179-187.
- Turpeinen, A. M., M. Mutanen, A. Aro, I. Salminen, S. Basu, D. L. Palmquist, J. M. Griinari. 2002. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 76:504-510.
- Tyrell, H. F. and J. T. Reid. 1965. Prediction of energy value of cows milk. *J. Dairy Sci.* 48:1215.
- United States Dep. Agric, Agricultural Research Service. 2003. USDA Nutrient Database for Standard Reference, Release 16.
- Van Kempen, G. J. M., and A. J. M. Jasman. 1994. Use of EC produced oil seeds in animal feeds. Pages 31-56 in *Recent Advances in Animal Nutrition*. Univ. Press, Nottingham, UK.
- Van Wijlen, R. P. J., P. C. Colombani. 2010. Review: Grass-based ruminant production methods and human bioconversion of vaccenic acid with estimations of maximal dietary intake of conjugated linoleic acids. *Int. Dairy J.* 20:433-448.
- Vlaeminck, B., V. Fievez, A. R. J. Cabrita, A. J. M. Fonseca, R. J. Dewhurst. 2006. Factors affecting odd and branched-chain fatty acids in milk: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 131:389-417.
- Wachira, A. M., A. J. Sinclair, R. G. Wilkinson, M. Enser, J. D. Wood, A. V. Fisher. 2002. Effects of dietary fat source and breed on the carcass composition, n-3 polyunsaturated fatty acid and conjugated linoleic acid content of sheep meat and adipose tissue. *Br. J. Nutr.* 88:697-709.
- Wahle, K. W., W. P. James. 1983. Fatty acids modification and membrane lipids. *Proc. Nutr. Soc.* 42:273-287.

- Wahle, K.W., S.D. Heys, D. Rotondo. 2004. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Prog. Lipid Res.* 43:553-587.
- Wang, Z., L.A. Goonewardene. 2004. The use of mixed models in the analysis of animal experiments with repeated measures data. *Can. J. Anim. Sci.* 84:1–11.
- Ward, R. J., M. T. Taravers, S. E. Richards, R. G. Vernon, A. M. Salter, P. J. Battery, M. C. Barber. 1998. Searoyl-CoA desaturase mRNA is transcribed from a single gene in the ovine genome. *Biochem. Biophys. Acta.* 1391:145-156.
- Ward, A. T., K. M. Wittenberg, H. M. Froebe, R. Przybylsky, L. Malcolmson. 2003. Fresh forage and solin supplementation on conjugated linoleic acid levels in plasma and milk. *J. Dairy Sci.* 86:1742-1750.
- Warren, J.M., V.A. Simon, G. Bartolini, K.L. Erickson, B.E. Mackey, B.E. Kelley. 2003. *Trans*-10, *cis*-12 CLA increases liver and decreases adipose tissue lipids in mice: possible roles of specific lipid metabolism genes. *Lipids.* 38:497-504.
- Weill, P., B. Schmitt, G. Chesneau, N. Daniel, F. Safraou, P. Legrand. 2002. Effects of introducing linseed in livestock diet on blood fatty acid composition of consumers of animal products. *Ann. Nutr. Metab.* 46:182-191.
- West, D. B., J. P. DeLany, P. M. Camet, F. Blohm, A. A. Truett, J. Scimeca. 1998. Effects of conjugated linoleic acid on body fat and energy metabolism in the mouse. *Am. J. Physiol. Reg. I.* 44:R667-R672.
- Whigham, L. D., A. C. Watras, D. A. Schoeller. 2007. Efficacy of conjugated linoleic acid for reducing fat mass: a meta-analysis in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 85:1203-1211.
- White, R. W., P. Kemp, R. M. C. Dawson. 1970. Isolation of a rumen bacterium that hydrogenates oleic acid as well as linoleic acid and linolenic acid. *Biochem. J.* 116:767-768.
- White, S. L., J. A. Bertrand, M. R. Wade, S. P. Washburn, J. T. Green, T. C. Jenkins. 2001. Comparison of fatty acid content of milk from Jersey and Holstein cows consuming pasture or a total mixed ration. *J. Dairy Sci.* 84:2295-2301.
- Whitlock, L., D. Schingoethe, A. Hippen, K. Kalscheur, R. Baer, N. Ramaswamy, K. Kasperson. 2002. Fish oil and extruded soybeans fed in combination increase conjugated linoleic acids in milk of dairy cows more than when fed separately. *J. Dairy Sci.* 85:234–243.
- WHO. 1998. World Health Report – Life in the 21st century. A vision for all. Geneve.

- WHO. 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: Report of a joint WHO/FAO expert consultation. World Health Organization. Geneva.
- Williams, C. M. 2000. Dietary fatty acids and human health. *Ann. Zootech.* 49:165-180.
- Wolff, R. L. 1994. Contribution of *trans*-18:1 acids from dairy fat to European diets. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71:277-283.
- Wolff, R. L. 1995. Content and distribution of *trans*-18:1 acids in ruminant milk and meat fats. Their importance in European diets and their effect on human milk. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72:259-272.
- Wolff, R. L., C. C. Bayard, R. J. Fabien. 1995. 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. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72:1471-1483.
- Wongtangintharn, S. H. Oku, H. Iwasaki, T. Toda. 2004. Effect of branched-chain fatty acids on fatty acid biosynthesis of human breast cancer cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 50:137-143.
- Wonsil, B.J., J.H. Herbein, B.A. Watkins. 1994. Dietary and ruminally derived *trans*-18:1 fatty acids alter bovine milk lipids. *J. Nutr.* 124:556-565.
- Yamasaki, M., K. Kishihara, I. Ikeda, M. Sugano, K. Yamada. 1999. A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugated linoleic acid. *JAOCs.* 76:933-938.
- Yurawecz, M. P., J. A. G. Roach, N. Sehat, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, J. Fritsche, H. Steinhart, Y. Ku. 1998. A new conjugated linoleic acid isomer, 7 *trans*, 9 *cis*-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. *Lipids.* 33:803-809.
- Zegarska, Z., B. Paszczyk, Z. Borejszo. 1996. *Trans* fatty acids in milk fat. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 5:89-96.

ANEXO I

Anexo I – Variação do perfil dos AG (g/100 g de AG totais) ao longo dos dias de ensaio (P1- dia 10; P2- dias 12, 14, 17, 25 e 31; P3- dias 33, 35, 38, 46 e 52).

Ácidos	Dia											EPM	Signific.
	10	12	14	17	25	31	33	35	38	46	52		
6:0	0,76 ^d	0,21 ^{ab}	0,27 ^{bc}	0,42 ^c	0,04 ^{ab}	0,05 ^a	0,07 ^{ab}	0,07 ^{abc}	ND	ND	ND	0,099	<0,001
8:0	0,97 ^e	0,81 ^d	0,79 ^d	0,88 ^{de}	0,35 ^b	0,54 ^c	0,45 ^{bc}	0,21 ^a	0,20 ^a	0,18 ^a	0,11 ^a	0,057	<0,001
10:0	2,65 ^e	3,20 ^f	3,24 ^f	3,04 ^f	2,72 ^e	2,94 ^{ef}	2,16 ^d	1,41 ^a	1,79 ^b	1,31 ^a	1,81 ^c	0,171	<0,001
10:1	0,30 ^{ce}	0,35 ^f	0,26 ^{cd}	0,25 ^{bd}	0,22 ^{bc}	0,28 ^{de}	0,23 ^{bc}	0,17 ^a	0,21 ^{ab}	0,17 ^a	0,23 ^b	0,021	<0,001
11:0	0,08 ^{ab}	0,14 ^c	0,21 ^d	0,24 ^d	0,26 ^d	0,23 ^d	0,10 ^{bc}	0,03 ^a	0,04 ^a	0,03 ^a	0,06 ^a	0,020	<0,001
12:0	3,39 ^c	4,44 ^d	4,75 ^d	4,33 ^d	4,55 ^d	4,45 ^d	3,27 ^c	2,15 ^a	2,67 ^b	2,03 ^a	2,98 ^{bc}	0,223	<0,001
13:0	0,12 ^a	0,18 ^b	0,28 ^c	0,34 ^d	0,37 ^d	0,35 ^d	0,19 ^b	0,09 ^a	0,09 ^a	0,08 ^a	0,12 ^{ab}	0,025	<0,001
14:0	10,88 ^{cd}	11,75 ^f	11,60 ^{ef}	11,48 ^e	12,83 ^g	12,69 ^g	9,80 ^c	8,50 ^b	10,04 ^{cd}	7,41 ^a	10,85 ^d	0,374	<0,001
<i>iso</i> -C14:0	0,10 ^b	0,08 ^a	0,07 ^a	0,06 ^a	0,07 ^a	0,09 ^{ab}	0,10 ^{bc}	0,15 ^{de}	0,16 ^e	0,14 ^{de}	0,13 ^{cd}	0,009	<0,001
14:1 <i>cis</i> -9	1,07 ^{ab}	1,31 ^c	1,12 ^b	1,34 ^{cd}	1,53 ^e	1,52 ^{de}	1,19 ^{bc}	0,89 ^a	1,02 ^a	0,86 ^a	1,29 ^c	0,154	<0,001
15:0	1,24 ^a	1,39 ^{ab}	1,60 ^b	2,02 ^c	2,43 ^d	2,31 ^{cd}	1,63 ^b	1,26 ^a	1,11 ^a	1,08 ^a	1,33 ^a	0,129	<0,001
<i>iso</i> -C15:0	0,31 ^{cd}	0,27 ^{bc}	0,26 ^b	0,19 ^a	0,26 ^b	0,27 ^b	0,37 ^c	0,38 ^c	0,36 ^{de}	0,33 ^d	0,35 ^d	0,021	<0,001
<i>Anteiso</i> -C15:0	0,68	0,62	0,68	0,66	0,67	0,69	0,70	0,70	0,62	0,64	0,73	0,032	NS
15:1	0,02 ^a	0,03 ^b	0,03 ^b	0,04 ^b	0,05 ^{cd}	0,04 ^{bc}	0,03 ^{ab}	ND	ND	0,02 ^a	0,07 ^d	0,006	<0,001
16:0	22,59 ^b	24,46 ^{cd}	25,75 ^e	25,41 ^{de}	28,12 ^f	27,87 ^f	24,44 ^c	22,43 ^b	23,57 ^b	20,52 ^a	23,61 ^{bc}	0,676	<0,001
16:1 <i>cis</i> -7	0,33 ^{cb}	0,32 ^b	0,35 ^c	0,36 ^c	0,31 ^b	0,28 ^a	0,36 ^c	0,37 ^d	0,32 ^b	0,37 ^d	0,34 ^c	0,014	<0,001
16:1 <i>cis</i> -9	1,56 ^a	1,81 ^b	2,05 ^{cd}	2,34 ^{ef}	2,46 ^f	2,47 ^f	2,47 ^f	2,11 ^{de}	1,74 ^{ab}	1,85 ^{bc}	1,67 ^a	0,149	<0,001
16:1 <i>cis</i> -13	0,12 ^a	0,25 ^b	0,28 ^b	0,20 ^b	0,19 ^b	0,06 ^a	0,13 ^{ab}	ND	ND	ND	ND	0,037	<0,01
16:1 <i>trans</i> -9	0,07 ^a	0,08 ^a	0,11 ^b	0,17 ^c	0,12 ^b	0,11 ^b	0,11 ^b	0,06 ^a	0,06 ^a	0,06 ^a	0,07 ^a	0,011	<0,001
17:0	0,66 ^a	0,62 ^a	0,76 ^b	0,90 ^c	1,05 ^d	1,08 ^d	1,05 ^d	0,86 ^c	0,70 ^{ab}	0,74 ^b	0,68 ^a	0,042	<0,001
<i>iso</i> -C17:0	0,65 ^b	0,56 ^a	0,55 ^a	0,53 ^a	0,50 ^a	0,54 ^a	0,69 ^{cb}	0,77 ^d	0,73 ^c	0,74 ^{cd}	0,67 ^b	0,026	<0,001
<i>anteiso</i> -C17:0	0,33 ^{de}	0,38 ^e	0,30 ^d	0,17 ^{ab}	0,10 ^a	0,09 ^a	0,14 ^a	0,21 ^{bc}	0,27 ^{cd}	0,37 ^e	0,31 ^d	0,030	<0,001
17:1 <i>cis</i> -8	0,09 ^b	0,11 ^c	0,10 ^{bc}	0,10 ^c	0,06 ^a	0,06 ^a	0,08 ^b	0,10 ^b	0,09 ^b	0,12 ^d	0,09 ^b	0,006	<0,001
17:1 <i>cis</i> -9	0,24 ^a	0,26 ^a	0,33 ^{bc}	0,42 ^{ef}	0,40 ^{de}	0,40 ^d	0,46 ^f	0,42 ^e	0,30 ^{ab}	0,35 ^{cd}	0,24 ^a	0,034	<0,001
18:0	12,13 ^d	9,76 ^{bc}	8,74 ^a	7,70 ^a	8,40 ^a	8,84 ^{ab}	10,76 ^{cd}	12,88 ^e	13,00 ^{ef}	14,16 ^f	12,35 ^{cd}	0,822	<0,001
18:1 <i>trans</i> -6-8	0,33 ^a	0,33 ^{ab}	0,42 ^c	0,56 ^d	0,36 ^b	0,33 ^a	0,38 ^{bc}	0,27 ^a	0,25 ^a	0,30 ^a	0,29 ^a	0,039	<0,001
18:1 <i>trans</i> -9	0,58 ^{cb}	0,30 ^a	0,50 ^b	0,75 ^c	0,44 ^b	0,32 ^a	0,42 ^{ab}	0,26 ^a	0,23 ^a	0,23 ^a	0,20 ^a	0,079	<0,001
18:1 <i>trans</i> -10	0,85 ^{ab}	0,94 ^{ab}	1,72 ^c	3,02 ^d	1,07 ^{bc}	0,86 ^{ab}	1,09 ^{bc}	0,51 ^{ab}	0,40 ^{ab}	0,34 ^{ab}	0,28 ^a	0,269	<0,001
18:1 <i>trans</i> -11	2,63 ^{bed}	2,21 ^{abc}	1,60 ^a	2,13 ^{abc}	1,32 ^a	2,12 ^{abc}	1,99 ^{ab}	2,86 ^{cde}	3,82 ^e	3,29 ^{def}	3,79 ^{ef}	0,407	<0,001
18:1 <i>trans</i> -12	0,38 ^{ab}	0,38 ^{ab}	0,42 ^{cd}	0,48 ^d	0,33 ^{ab}	0,34 ^{ab}	0,38 ^{ab}	0,32 ^a	0,39 ^{bc}	0,36 ^{ab}	0,41 ^c	0,025	<0,001
18:1 <i>cis</i> -9	22,25 ^{bc}	21,73 ^b	19,77 ^a	18,54 ^a	18,70 ^a	18,59 ^a	23,77 ^{cd}	28,26 ^e	24,97 ^d	31,10 ^f	24,30 ^d	0,805	<0,001

Continuação do Anexo I

Ácidos	Dia												EPM	Signific.
	10	12	14	17	25	31	33	35	38	46	52			
18:1 <i>cis</i> -10+ <i>trans</i> -15	1,11 ^a	1,15 ^a	1,44 ^c	1,64 ^c	1,48 ^{cd}	1,47 ^{cd}	1,54 ^{cde}	1,60 ^{de}	1,20 ^{ab}	1,42 ^c	1,29 ^b	0,068	<0,001	
18:1 <i>cis</i> -11	0,36 ^{ab}	0,41 ^{bcd}	0,50 ^e	0,44 ^d	0,46 ^d	0,42 ^{bcd}	0,44 ^{cd}	0,38 ^{abc}	0,35 ^a	0,41 ^{bcd}	0,33 ^a	0,024	<0,001	
18:1 <i>cis</i> -15	0,20 ^{ab}	0,18 ^a	0,23 ^{abc}	0,23 ^{bc}	0,23 ^{bc}	0,22 ^{abc}	0,27 ^c	0,28 ^c	0,20 ^a	0,27 ^{bc}	0,28 ^c	0,025	<0,01	
18:1 <i>cis</i> -16	0,35 ^b	0,33 ^{ab}	0,36 ^b	0,26 ^a	0,39 ^{bc}	0,32 ^{ab}	0,45 ^c	0,32 ^{ab}	0,34 ^{ab}	0,38 ^{bc}	0,32 ^{ab}	0,031	<0,05	
18:2 <i>trans</i> -9, <i>trans</i> -12	0,61 ^g	0,58 ^{fg}	0,46 ^{de}	0,42 ^{bc}	0,34 ^a	0,35 ^{ab}	0,48 ^{cdef}	0,52 ^{def}	0,52 ^{def}	0,58 ^{fg}	0,56 ^{efg}	0,031	<0,001	
18:2 <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	0,42 ^d	0,42 ^d	0,32 ^{abc}	0,30 ^{abc}	0,26 ^{ab}	0,25 ^a	0,37 ^{cd}	0,34 ^{bcd}	0,32 ^{abc}	0,33 ^{abcd}	0,35 ^{bcd}	0,039	<0,01	
18:2 <i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15	0,03	0,02	0,03	0,04	0,03	0,04	ND	ND	ND	ND	ND	0,003	NS	
18:2 <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11	0,38 ^f	0,30 ^{cd}	0,18 ^{abc}	0,15 ^{ab}	0,12 ^a	0,13 ^a	0,24 ^{bcd}	0,35 ^{ef}	0,54 ^g	0,27 ^{cde}	0,27 ^{cde}	0,038	<0,001	
18:2 <i>cis</i> -6	1,71 ^{ef}	1,56 ^e	0,93 ^{cd}	0,91 ^c	0,51 ^{ab}	0,44 ^a	0,76 ^{bc}	1,39 ^{de}	1,89 ^f	1,91 ^f	2,16 ^f	0,236	<0,001	
18:3 <i>n</i> -3	1,48 ^{ab}	1,72 ^e	2,73 ^f	2,70 ^{ef}	2,33 ^d	2,36 ^d	2,46 ^{def}	2,43 ^{def}	1,90 ^c	1,70 ^{bc}	1,38 ^a	0,150	<0,001	
18:3 <i>n</i> -6	0,70 ^{cde}	0,67 ^{cde}	0,59 ^{cd}	0,48 ^{ab}	0,43 ^a	0,38 ^a	0,57 ^{bc}	0,78 ^{ef}	0,87 ^f	0,65 ^{cd}	0,74 ^{de}	0,054	<0,001	
20:0	0,02 ^a	0,02 ^{ab}	0,03 ^{bc}	0,04 ^c	0,03 ^c	0,05 ^d	0,04 ^{cd}	0,03 ^{abc}	ND	ND	ND	0,004	<0,001	
20:1 <i>n</i> -9	0,16 ^c	0,14 ^a	0,15 ^{ab}	0,14 ^a	0,13 ^a	0,14 ^a	0,16 ^{bc}	0,17 ^c	0,16 ^{bc}	0,16 ^{bc}	0,16 ^{bc}	0,010	<0,001	
20:2 <i>n</i> -6	0,11 ^{abc}	0,09 ^b	0,09 ^b	0,09 ^a	0,10 ^b	0,10 ^b	0,13 ^c	0,13 ^c	0,10 ^b	0,12 ^c	0,11 ^{bc}	0,009	<0,001	
20:3 <i>n</i> -3	0,04 ^a	0,04 ^a	0,04 ^{ab}	0,05 ^{cd}	0,04 ^{bc}	0,04 ^a	0,05 ^d	0,05 ^d	ND	0,04 ^{ab}	0,04 ^{ab}	0,004	<0,001	
20:3 <i>n</i> -6	0,02	0,02	0,03	0,03	0,05	0,05	0,06	0,04	ND	ND	ND	0,019	NS	
20:4 <i>n</i> -6	0,07 ^a	0,09 ^{abc}	0,10 ^{abc}	0,10 ^{abc}	0,11 ^{bc}	0,11 ^c	0,16 ^d	0,16 ^d	0,12 ^c	0,08 ^{ab}	0,07 ^a	0,014	<0,001	
20:5 <i>n</i> -3	0,09 ^a	0,10 ^{ab}	0,14 ^{cd}	0,13 ^{bc}	0,16 ^{de}	0,16 ^{de}	0,20 ^f	0,17 ^e	0,13 ^{bc}	0,10 ^a	0,09 ^a	0,014	<0,001	
22:0	0,07 ^{ab}	0,09 ^{bc}	0,11 ^d	0,11 ^{cd}	0,06 ^a	0,06 ^a	0,07 ^{ab}	0,06 ^a	0,06 ^{ab}	0,05 ^a	0,05 ^a	0,009	<0,001	
22:2 <i>n</i> -6	0,06 ^{abc}	0,05 ^a	0,05 ^a	0,05 ^a	0,06 ^{abc}	0,05 ^{ab}	0,08 ^c	0,06 ^{abc}	0,06 ^{abc}	0,06 ^{abc}	0,07 ^{bc}	0,008	NS	
22:4 <i>n</i> -6	0,08 ^{cd}	0,08 ^{cd}	0,04 ^{ab}	ND	ND	ND	0,02 ^a	0,06 ^{bc}	ND	ND	0,10 ^d	0,011	<0,05	
22:5 <i>n</i> -3	0,10 ^c	0,10 ^{bc}	0,13 ^{ef}	0,14 ^g	0,12 ^{def}	0,12 ^{de}	0,14 ^g	0,13 ^{eg}	0,11 ^d	0,08 ^{ab}	0,07 ^a	0,009	<0,001	
23:0	0,10 ^d	0,08 ^c	0,05 ^{ab}	0,03 ^{ab}	0,02 ^a	0,06 ^{bc}	0,04 ^{ab}	0,09 ^{cd}	0,08 ^{cd}	0,07 ^{bc}	0,10 ^{cd}	0,013	<0,001	
24:0	0,04 ^{bcd}	0,02 ^a	0,02 ^{ab}	0,04 ^{cd}	0,03 ^{abc}	0,03 ^{abcd}	0,04 ^{cd}	0,06 ^d	0,05 ^{cd}	0,04 ^{cd}	0,04 ^{bcd}	0,007	<0,05	
Outros	0,05 ^b	0,04 ^{ab}	0,03 ^{ab}	0,03 ^a	0,03 ^a	0,03 ^a	0,08 ^d	0,05 ^{bc}	0,07 ^{cd}	0,04 ^{ab}	0,04 ^{ab}	0,006	<0,001	
AGS	3,23 ^e	2,48 ^d	2,34 ^{bcd}	2,52 ^d	2,43 ^{cd}	2,08 ^{abc}	2,44 ^{cd}	1,91 ^a	1,96 ^{ab}	2,16 ^{abcd}	2,20 ^{abcd}	0,148	<0,001	
MUFA	57,85 ^{bcd}	59,12 ^{de}	60,10 ^e	58,61 ^{cde}	62,92 ^f	63,26 ^f	56,19 ^b	52,30 ^a	55,59 ^b	50,06 ^a	56,39 ^{bc}	1,222	<0,001	
PUFA	33,51 ^b	33,15 ^b	32,13 ^{ab}	33,80 ^b	30,45 ^a	30,60 ^a	36,27 ^c	39,86 ^d	36,46 ^c	42,51 ^e	36,04 ^c	0,942	<0,001	
Total <i>n</i> -6	5,33 ^b	5,45 ^b	5,65 ^{bc}	5,25 ^b	4,29 ^a	4,09 ^a	5,11 ^b	5,92 ^c	5,98 ^c	5,28 ^b	5,38 ^b	0,362	<0,001	
Total <i>n</i> -3	1,86 ^{ab}	2,08 ^{bc}	3,17 ^e	3,12 ^e	2,77 ^d	2,79 ^d	3,03 ^{de}	2,92 ^d	2,26 ^c	1,98 ^b	1,68 ^a	0,178	<0,001	
<i>n</i> -6: <i>n</i> -3	0,96 ^c	1,08 ^f	1,05 ^{ef}	0,77 ^{cd}	0,62 ^b	0,47 ^a	0,70 ^{bc}	0,93 ^{de}	0,98 ^e	0,77 ^{bcd}	0,89 ^{de}	0,068	<0,001	
PI:S	1,95 ^{ab}	2,02 ^{ab}	3,07 ^c	4,19 ^d	4,93 ^e	6,49 ^f	4,45 ^{de}	3,17 ^c	2,32 ^{ab}	2,66 ^{bc}	1,97 ^a	0,324	<0,001	
h:H	0,093 ^{bc}	0,093 ^{bc}	0,096 ^{bcd}	0,090 ^b	0,068 ^a	0,065 ^a	0,092 ^b	0,115 ^e	0,110 ^{cd}	0,107 ^{cde}	0,096 ^{bc}	0,096	<0,001	
	0,68 ^{cd}	0,62 ^{bc}	0,58 ^b	0,55 ^{ab}	0,49 ^a	0,49 ^a	0,74 ^{de}	0,97 ^f	0,79 ^e	1,14 ^g	0,72 ^d	0,037	<0,001	

EPM - erro padrão da média; ND - não detectado; PI: S - rácio polinsaturados/ saturados; h:H - hipocolesterolémicos/ hipercolesterolémicos (*n*-6 + *n*3 + C18:1 *cis*-9) / (C12:0 + C14:0 + C16:0).
 Signif. - Nível de significância estatística (NS - não significativo, P>0,05). Médias na mesma linha com índices diferentes (a, b, ..., g) diferem significativamente (P<0,05).