

# **Efeito da suplementação da dieta de vacas leiteiras com uma fonte de ácidos gordos ómega-3 protegida (NatOmega-3) na composição em ácidos gordos do leite**

**Mariana Coelho Aires**

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em  
**Engenharia Zootécnica – Produção Animal**

Orientador: Doutor Rui José Branquinho de Bessa

**Júri:**

Presidente: Doutor André Martinho de Almeida, Professor auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutor Rui José Branquinho de Bessa, Professor associado do(a) Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, orientador;

Doutora Maria José Marques Gomes, Professora auxiliar do(a) Escola de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro;

Doutor José Ricardo Dias Bexiga, Professor Auxiliar do(a) Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

2021

## PROJETO NATOMEGA-3

Nº do grupo operacional: PDR2020-101-031461



COORDENADOR: FMV-ULisboa (CIISA)

PARCEIROS:

VIVALEITE – COOPERATIVA DE PRODUTORES DE LEITE, CRL

EUROCEREAL – COMERCIALIZAÇÃO DE PRODUTOS AGRO-PECUARIOS S.A.

TERRA ALEGRE LACTICÍNIOS S.A., grupo Jerónimo Martins

## **AGRADECIMENTOS**

A todos os que contribuíram, ao longo dos últimos anos, para o sucesso do meu percurso académico, deixo o meu mais profundo e sincero agradecimento. Com especial referência aqueles aqui anunciados.

Agradeço a todos os parceiros envolvidos no projeto NatOmega-3: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa (CIISA); VIVALEITE – Cooperativa de Produtores de Leite, Crl; EUROCEREAL – Comercialização de Produtos Agro-Pecuários S.A.; TERRA ALEGRE LACTICÍNIOS S.A., grupo Jerónimo Martins; Barão & Barão Lda.

Ao Professor Doutor Rui Bessa, meu orientador, agradeço a sua disponibilidade, tempo dispensado, orientação, ajuda e correções durante a realização desta dissertação. Agradeço todo o conhecimento científico que me transmitiu, não só durante o desenvolvimento da dissertação, como também, como docente ao longo destes últimos anos de licenciatura e mestrado.

Agradeço à Doutora Susana Alves pela confiança, ajuda, por todo o apoio prestado na realização das atividades laboratoriais, pelas correções e por esclarecer todas as dúvidas que foram surgindo pelo caminho.

Agradeço ao Professor Doutor Luís Costa e ao Dr. Gonçalo Pereira por me incluírem nas suas saídas de campo para que pudesse acompanhar o projeto de perto, pelos conhecimentos transmitidos, pela paciência e tempo dispensados na explicação de todos os procedimentos efetuados.

Agradeço ao Instituto Superior de Agronomia e à Faculdade de Medicina Veterinária pelos anos felizes que me proporcionaram e a todos os docentes que, ao longo do meu percurso académico, me ajudaram e transmitiram os seus conhecimentos.

A todos os meus amigos, agradeço o incentivo constante, as palavras de motivação, a paciência, a amizade e todos os bons e felizes momentos que me proporcionam. Agradeço por me acompanharem, por celebrarem comigo as minhas conquistas e por todas as memórias que partilhamos.

O mais especial agradecimento à minha família. Agradeço aos meus pais pelo investimento constante na minha educação, por me darem a liberdade de escolher o meu caminho e por me disponibilizarem todas as ferramentas para chegar onde pretendo. Agradeço-lhes o apoio incansável, incentivo, paciência, todos os valores e educação que me transmitem diariamente, mas sobretudo, agradeço o amor e carinho inacabáveis que recebo. Agradeço ao meu irmão Pedro, por ser um exemplo de

coragem e resiliência, e pelas palavras bonitas que tem sempre para me dar. Aos meus queridos avós, agradeço por me ensinarem que com trabalho, dedicação e humildade tudo se consegue construir, por me darem o amor e carinho que só eles conseguem dar e por fazerem da minha felicidade a felicidade deles. Aos meus tios e à minha prima Pipa, agradeço por estarem sempre presentes e acompanharem de perto todas as etapas da minha vida. Ao meu tio António (*in memoriam*) agradeço por me ensinar a valorizar as pequenas coisas da vida e por me ter ajudado a tornar na pessoa que sou hoje, da qual espero que se orgulhe.

Por último, mas não menos importante, agradeço ao meu namorado Vasco por toda a sua dedicação, por nunca me deixar desistir de nada, por me fazer acreditar que sou capaz de atingir os meus objetivos e por ser um apoio incondicional.

A todos, deixo o meu mais profundo e sincero agradecimento.

## RESUMO

Os ácidos gordos insaturados presentes na dieta dos ruminantes são extensamente saturados no rúmen através das vias de biohidrogenação o que leva a que a gordura do leite seja constituída, essencialmente, por ácidos gordos saturados (AGS). Assim, apenas uma pequena percentagem de ácidos gordos polinsaturados (AGPI) é absorvida e transferida para o leite, pelo que é necessário desenvolver métodos para reduzir a biohidrogenação ruminal e aumentar o teor de AGPI no leite. Realizou-se um ensaio onde se testou o efeito da inclusão, na dieta de vacas leiteiras, de um suplemento com AGPI ómega-3 protegido da biohidrogenação (NatOmega-3), na composição em ácidos gordos do leite. Na preparação do suplemento, utilizou-se uma tecnologia de encapsulação de uma fonte de ácido linolénico numa matriz lipídica de ácidos gordos saturados de alto ponto de fusão, por forma a proteger os ácidos gordos insaturados do ataque microbiano no rúmen. Sessenta vacas Holstein-Frísias no período pós-parto e sem condições clínicas a registar foram selecionadas para entrar no ensaio e divididas em dois grupos. Durante 9 semanas forneceu-se 1,2 kg/dia do suplemento NatOmega-3 a um grupo e a mesma quantidade de um suplemento com AGS ao outro grupo (controlo). As amostras de leite foram recolhidas semanalmente e centrifugadas para remover a gordura do leite, através da qual se determinou a composição em ácidos gordos por cromatografia gasosa. O suplemento NatOmega-3 aumentou a proporção de ácido linolénico no leite, porém não o suficiente para se considerar uma fonte protegida. O interesse do presente estudo baseia-se na necessidade de desenvolver tecnologias que permitam o enriquecimento dos produtos animais em ácidos gordos ómega-3, com o propósito de alterar o perfil lipídico da gordura do leite e aumentar o seu valor nutricional, com elevado interesse do ponto de vista da saúde humana.

**Palavras-chave:** biohidrogenação, ómega-3, ácidos gordos, gordura do leite, valor nutricional

## **ABSTRACT**

Unsaturated fatty acids in ruminant diets are extensively saturated in the rumen through biohydrogenation pathways which leads to milk fat being rich in saturated fatty acids (SFA). Therefore, only a small percentage of polyunsaturated fatty acids (PUFA) is indeed absorbed and transferred to milk. Several protection technologies have been developed to reduce rumen biohydrogenation and increase PUFA content in milk. A study was conducted in which a dietary supplement enriched with omega-3 PUFA protected from biohydrogenation was introduced into a dairy cattle diet to test its effect on milk fatty acid composition. The technology used in the supplement consisted of a source of linolenic acid encapsulated in a lipid matrix of saturated fatty acids with a high melting point as a mean to protect unsaturated fatty acids from the microbial attack in the rumen. Sixty Holstein cows in postpartum period and with no previous clinical conditions were selected and divided in two groups. For 9 weeks all cows were fed 1,2 kg/day of whether NatOmega-3 supplement or a SFA supplement (control group). Milk samples were collected weekly and centrifuged to remove milk fat while fatty acid profile was obtained through gas chromatography. Despite the increase in linolenic acid when the NatOmega-3 supplement was administered, it was not enough to be considered as a protected source. The purpose of this study focusses on the need to develop new technologies that allow the enhancement of animal products in omega-3 fatty acids to change the milk fat lipid profile, while also adding nutritional value and becoming highly interesting from a human health point of view.

**Keywords:** biohydrogenation, omega-3, fatty acids, milk fat, nutritional value

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iii
<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>OBJETIVOS</b> .....	2
<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
1. Lípidos .....	3
1.1. Ácidos gordos .....	4
1.1.1. Ácidos gordos saturados .....	5
1.1.2. Ácidos gordos insaturados .....	6
1.2. Importância dos ácidos gordos na saúde humana .....	10
2. Metabolismo lipídico no rúmen .....	12
2.1. Lipólise ruminal .....	13
2.2. Biohidrogenação .....	13
3. Importância da proteção lipídica .....	15
4. Tecnologias de proteção de lípidos .....	16
4.1. Alteração da estrutura .....	17
4.1.1. Sais cálcicos .....	17
4.1.2. Amidas .....	18
4.2. Encapsulação .....	18
4.3. Outras tecnologias estudadas .....	19
4.4. Efeito das diferentes tecnologias na alteração do perfil lipídico do leite .....	20
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
1. Animais e delineamento experimental .....	22
1.1. Composição e administração dos suplementos .....	23
1.2. Recolha e processamento das amostras .....	25
2. Análise das amostras .....	25

2.1. Centrifugação.....	25
2.2. Transesterificação da gordura do leite .....	25
2.3. Cromatografia gasosa .....	26
3. Análise Estatística.....	27
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
1. Produção de Leite.....	28
2. Teor de gordura no leite.....	28
3. Perfil de ácidos gordos.....	29
3.1. Efeito da paridade .....	29
3.2. Efeito dos dias em lactação .....	29
3.3. Efeito da ingestão dos diferentes tratamentos.....	30
<b>DISCUSSÃO DE RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
1. Produção e teor de gordura no leite.....	35
2. Composição em ácidos gordos do leite.....	37
3. Efeito do tipo de suplemento.....	39
3.1. Eficácia do suplemento NatOmega-3 .....	39
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>42</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>51</b>



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Principais ácidos gordos saturados presentes nos alimentos e produtos de origem animal .....	5
Quadro 2. Exemplos de ácidos gordos insaturados mais comuns de encontrar em estado natural .....	6
Quadro 3. Exemplos de funções dos principais AGPI ómega-3 e ómega-6 .....	9
Quadro 4. Efeitos biológicos dos principais isómeros CLA .....	11
Quadro 5. Principais tecnologias de proteção de lípidos referidas na literatura e o seu papel na transferência de AGPI da dieta para o leite .....	21
Quadro 6. Composição química do TMR e dos suplementos (controlo e NatOmega-3). .....	24
Quadro 7. Efeito da paridade, dos dias em lactação e da interação entre os diferentes tratamentos e a ingestão, na produção de leite semanal. ....	28
Quadro 8. Efeito da paridade, dos dias em lactação, do efeito isolado do tratamento e da interação entre os diferentes tratamentos e a ingestão, no teor de gordura do leite. ....	28
Quadro 9. Efeito da paridade, dos dias em lactação e da interação entre a ingestão e os diferentes tratamentos no perfil de ácidos gordos do leite. ....	31

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplos de diferentes estruturas, nomenclaturas e tipos de ácidos gordos...4	
Figura 2. Principais vias do metabolismo ruminal do ácido linoleico e do ácido linolénico .....	14
Figura 3. Comparação entre o efeito da biohidrogenação ruminal numa fonte lipídica não protegida e utilizando uma tecnologia de proteção lipídica .....	17
Figura 4. Representação gráfica da variação da produção de leite ao longo dos dias em lactação para as vacas primíparas e multíparas. ....	36
Figura 5. Representação gráfica da variação do teor de gordura com a ingestão do suplemento controlo e com a ingestão do suplemento NatOmega-3 .....	36
Figura 6. Efeito do aumento da ingestão de C18:3n-3 com sementes de linho no leite .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADF – fibra de detergente ácido  
ADL – lenhina de detergente ácido  
AG – ácidos gordos  
AGE - ácidos gordos essenciais  
AGI – ácidos gordos insaturados  
AGMI – ácidos gordos monoinsaturados  
AGPI – ácidos gordos polinsaturados  
AGPI n-6 – ácidos gordos polinsaturados ómega-6  
AGPI n-3 – ácidos gordos polinsaturados ómega-3  
AGS – ácidos gordos saturados  
AL – ácido linoleico  
ALN – ácido  $\alpha$ -linolénico  
BI – biohidrogenação  
Ca – cálcio  
CG – cromatografia gasosa  
CLA – ácidos gordos conjugados do ácido linoleico  
(*c*-) – *cis*-  
DCV – doenças cardiovasculares  
DEL – dias em lactação  
DHA - ácido docosahexanóico  
EPA - ácido eicosapentanóico  
HDL – lipoproteína de alta densidade  
iAGT – ácidos gordos de origem industrial  
IUPAC – “International Union of Pure and Applied Chemistry”  
LDL – lipoproteína de baixa densidade  
MS – matéria seca  
N – azoto  
NDF – fibra de detergente neutro  
pKa – constante de dissociação  
rAGT – ácidos gordos *trans* de origem ruminal  
SCD – esteroil coenzima A dessaturase  
(*t*-) – *trans*-  
TMR – total mixed ration



## INTRODUÇÃO

A crescente preocupação por parte dos consumidores com os seus hábitos alimentares, aliado a um maior acesso à informação, torna-os cada vez mais conscientes dos alimentos que ingerem e dos seus constituintes. Aspectos como o efeito da dieta na saúde e bem-estar, impacto ambiental dos produtos consumidos, a sua proveniência ou modo de produção, têm cada vez mais peso na hora de decidir que alimentos incluir no plano alimentar. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2010), o consumo de gorduras polinsaturadas deve ser privilegiado em relação ao consumo de gorduras saturadas. Estas recomendações baseiam-se no facto dos ácidos gordos saturados aumentarem o risco de doenças cardiovasculares, assim como, os níveis de colesterol (Lourenço et al. 2010). Nesse sentido, produtos ricos em AGPI apresentam uma vantagem em relação aos produtos onde o teor de AGS é mais elevado.

Na Europa, o consumo de leite e produtos derivados do leite fornecem entre 27 e 57% do consumo total de AGS (Givens 2010). O metabolismo lipídico dos ruminantes tem uma grande influência no perfil de ácidos gordos (AG) destes produtos. Devido ao processo de biohidrogenação (BI) que ocorre no rúmen, os AGPI são convertidos em produtos mais hidrogenados, o que faz com que percam as suas características benéficas antes de serem absorvidos no intestino e transferidos para o leite (Gadeyne et al. 2017). Assim, quando comparados com os monogástricos, os produtos dos ruminantes apresentam elevadas concentrações de AGS e baixas concentrações de ácidos gordos insaturados (AGI). No entanto, os produtos provenientes de ruminantes contêm, também, isómeros conjugados do ácido linoleico (CLA) que, segundo diversos estudos (Whigham et al. 2000; Pariza 2004; Palmquist et al. 2005), contribuem positivamente para a saúde humana ao ajudarem na prevenção do cancro, no combate à aterosclerose, no aumento da resposta imunitária e na alteração do metabolismo energético e proteico. A população microbiana do rúmen, não só é responsável pelo processo de BI, como também, contribui para a formação destes CLA através do ácido linoleico e do ácido linolénico (Chilliard et al. 2007).

Como forma de proteger os AGPI da biohidrogenação e aumentar a sua concentração nos produtos, particularmente no leite, diversas estratégias têm sido testadas. O interesse de aumentar a absorção de AGPI surge, não apenas da perspetiva da melhoria do leite visando promover a saúde humana, mas também, pelo facto dos AGPI aumentarem a fertilidade e o desempenho produtivo dos ruminantes (Staples et al. 1998; Gulliver et al. 2012). No entanto, para as estratégias de proteção ruminal dos AGPI serem eficazes, tem de se assegurar que após o *bypass* lipídico no rúmen a absorção intestinal dos AGPI não seja comprometida (Gadeyne et al. 2017). Assim sendo, apesar de haver várias tecnologias de proteção de lípidos a ser estudadas, todas apresentam

vantagens e desvantagens que serão pertinentemente abordadas no seguimento do presente trabalho e antecedidas por uma breve explicação do metabolismo lipídico ruminal.

## **OBJETIVOS**

O objetivo do ensaio efetuado foi testar, *in vivo*, a eficácia de proteção de um suplemento alimentar com AGPI ómega-3 (NatOmega-3) e avaliar o seu efeito na produção e composição do leite, particularmente, no perfil de AG. O suplemento em teste foi preparado utilizando uma técnica de proteção com encapsulação de uma fonte de ácido linolénico numa matriz lipídica de AGS de alto ponto de fusão.

Esta experimentação realizou-se no contexto de se atingir o objetivo geral de desenvolver leite e derivados naturalmente enriquecidos em ómega-3, mais benéficos para a saúde do consumidor, e que sejam produzidos por animais mais saudáveis, isto é, apresentando melhor bem-estar e desempenho produtivo.

## REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Lípidos

Os lípidos podem ser definidos como substâncias biológicas de natureza hidrofóbica sendo, normalmente, solúveis em solventes orgânicos (Smith 2000). Porém, a definição de lípidos não é consensual na literatura devido à sua complexidade estrutural e biossintética. Outra definição, segundo Christie (2019), refere que os lípidos são ácidos gordos e seus derivados, e substâncias relacionadas a estes compostos a nível biossintético ou funcional. Adicionalmente, o modo de classificação dos lípidos também é muito variável, uma vez que, depende daquilo que se está a considerar. Por exemplo, se se considerar os produtos resultantes da sua hidrólise, podem ser divididos em “simples” ou “complexos”. No grupo dos lípidos simples incluem-se os que têm até dois produtos resultantes da hidrólise (ex: ácidos gordos, esteróis, acilgliceróis), enquanto os lípidos considerados complexos são os que têm três ou mais produtos (ex: glicerofosfolípidos) (Fahy et al. 2005). Por outro lado, pode-se fazer a distinção entre lípidos de reserva (ex: triacilgliceróis) e lípidos estruturais, isto é, aqueles presentes nas membranas, incluindo lípidos complexos, colesterol e vitaminas lipossolúveis (Christie 2019).

Os lípidos são, portanto, um grupo de compostos bastante heterogêneo, com classificações distintas conforme os critérios utilizados. Assim sendo, e por forma a facilitar a comunicação internacional, surgiu o “Comprehensive Classification System of Lipids”(Fahy et al. 2005), um sistema de classificação baseado em princípios químicos e bioquímicos que define os lípidos como pequenas moléculas hidrofóbicas e anfipáticas originadas a partir de condensações (Fahy et al. 2009). Segundo este sistema de classificação, os lípidos são divididos em oito categorias: ácidos gordos, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos, esteróis, prenóides, sacarolípidos e poliquétidos; sendo essas categorias repartidas em classes e subclasses.

Quanto às suas funções, os lípidos estão envolvidos em diversos processos biológicos, nomeadamente, funcionam como componentes estruturais das membranas ou de proteínas específicas, servem como substrato para a produção de energia metabólica ou ainda como compostos de sinalização (Glatz 2015).

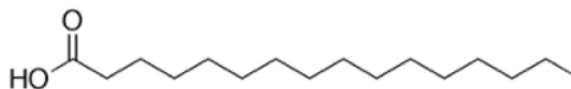
## 1.1. Ácidos Gordos

Os ácidos gordos são moléculas hidrofóbicas que consistem numa cadeia alifática de hidrocarbonetos que termina com um ácido carboxílico (Watkins 2012) e constituem a base da estrutura química dos lípidos (Moghadasian and Shahidi 2016). Os AG podem ser insaturados ou saturados caso possuam, ou não, ligações duplas entre átomos de carbono, respetivamente.

Diferenciam-se ainda pelo comprimento da cadeia de carbono, número, posição e configuração (*cis*, *trans*) das ligações duplas (Cuvelier et al. 2004). Por forma a simplificar a nomenclatura, segundo a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), apresenta-se primeiramente o número de carbonos da cadeia, seguido do número de insaturações (caso existam) e do número do carbono onde ocorre a insaturação, sendo que o carbono do grupo carboxilo é considerado o primeiro carbono (Cuvelier et al. 2004). No caso dos ácidos gordos saturados representam-se, por exemplo, por C16:0 (ácido palmítico) ou C18:0 (ácido esteárico). Nos ácidos gordos insaturados, como a dupla ligação pode ter duas configurações distintas, utiliza-se o prefixo *cis*- (*c*-) ou *trans*- (*t*-) antes de indicar a posição da insaturação (ex: C18:2 *cis*-9, *cis*-12). Outra forma de nomear as duplas ligações é a utilização do “n” ou “ómega” seguido do sinal “menos” e da posição da primeira ligação dupla da cadeia de carbono a contar da terminação oposta ao grupo carboxilo (ex: C18:2n-6) (Lobb and Chow 2007). Na Figura 1 apresentam-se alguns exemplos de vários AG e sua nomenclatura.

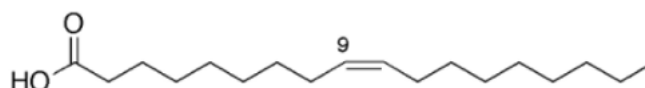
### Ácido Gordo Saturado

Ácido Palmítico  
C16:0



### Ácido Gordo Monoinsaturado

Ácido Oleico  
C18:1 *cis*-9  
C18:1 n-9



### Ácido Gordo Polinsaturado

Ácido Linoleico  
C18:2 *cis*-9, *cis*-12  
C18:2 n-6

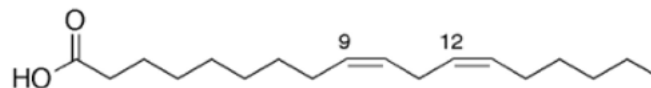


Figura 1. Exemplos de diferentes estruturas, nomenclaturas e tipos de ácidos gordos.

Os AG têm um papel importante em diversos processos biológicos e funções celulares, nomeadamente, integram os fosfolípidos das membranas celulares, afetam a sua fluidez e a interação entre lípidos e proteínas; são substrato para a síntese de eicosanóides, podem afetar o transporte de proteínas e os recetores celulares de hormonas e neurotransmissores (Roche 1999).

### 1.1.1. Ácidos Gordos Saturados

Os AGS caracterizam-se por não terem ligações duplas na cadeia de carbono, isto é, contêm apenas ligações carbono-carbono (C-C) na cadeia alifática, sendo as restantes ligações com átomos de hidrogénio. Com o aumento do comprimento da cadeia, há um aumento do ponto fusão do AG, pelo que, os AG de cadeia curta são líquidos à temperatura ambiente, enquanto os AG com 10 ou mais átomos de carbono são sólidos (Cuvelier et al. 2004). Os AGS podem conter ramificações ao longo da cadeia carbonada, no entanto, os compostos de cadeia linear com 12, 14, 16, 18 ou 20 átomos de carbono são os mais comuns nos tecidos animal e vegetal (Moghadasian and Shahidi 2016). Adicionalmente, AGS com cadeias compostas por 4 a 10 átomos de carbono estão também presentes em pequenas quantidades nos tecidos e em quantidade relevante no leite de ruminantes.

Nos tecidos animais, os AGS podem representar entre 30 a 40% do total de AG (Legrand and Rioux 2010), sendo essa percentagem representada essencialmente pelos ácidos palmítico, esteárico, mirístico e láurico. O ácido palmítico (C16:0), por exemplo, é um dos AGS mais abundante estando presente em quase todos os óleos vegetais, óleos de peixes e gordura animal. Outro exemplo, é o ácido mirístico que representa cerca de 10% dos AG da gordura do leite, juntamente com o ácido butírico e outros AG de cadeia curta. De uma forma geral, os AGS obtêm-se através de produtos de origem animal, como o leite e derivados da gordura do leite, ou de alguns óleos vegetais como o óleo de coco ou óleo de palma (Quadro 1).

Quadro 1. Principais ácidos gordos saturados presentes nos alimentos e produtos de origem animal. [Adaptado de Albuquerque (2009)]

Nome comum	Nome sistemático	Fórmula Estrutural	Fonte
<i>Butírico (C4:0)</i>	Tetranóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	Gordura do leite
<i>Capróico (C6:0)</i>	Hexanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	Gordura do leite
<i>Caprílico (C8:0)</i>	Octanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	Óleo de coco
<i>Cáprico (C10:0)</i>	Decanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	Óleo de palma
<i>Láurico (C12:0)</i>	Dodecanóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Óleo de coco
<i>Mirístico (C14:0)</i>	Tetradenóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Óleo de palma Gorduras animal e vegetal
<i>Palmítico (C16:0)</i>	Hexadenóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Gordura animal e vegetal
<i>Esteárico (C18:0)</i>	Octadenóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Gordura animal Manteiga de cacau



Os AGS, para além de representarem uma importante fonte energética, são também componentes importantes das membranas das células. No entanto, o consumo excessivo de gordura saturada, na dieta humana, está associado a um aumento dos níveis de colesterol no sangue e a altas taxas de mortalidade devido a doenças cardiovasculares (Keys 1997; Kromhout et al. 2000).

### 1.1.2. Ácidos Gordos Insaturados

Quando os ácidos gordos contêm uma ou mais ligações duplas entre átomos de carbono (C=C) denominam-se ácidos gordos insaturados. Os AGI que apresentam apenas uma ligação dupla na cadeia carbonada são ácidos gordos monoinsaturados (AGMI), quando têm mais do que uma ligação dupla pertencem ao grupo dos ácidos gordos polinsaturados. A configuração da ligação dupla pode ser *cis* caso gere um ângulo de  $\pm 30^\circ$  com a cadeia alifática ou *trans* se apresenta uma reduzida angulação da molécula, resultando numa configuração semelhante à dos AGS (Cuvelier et al. 2004). Os AGI são líquidos à temperatura ambiente, podendo solidificar a temperaturas de refrigeração. No Quadro 2 encontram-se exemplos dos AGI mais comuns.

Segundo Woods e Fearon (2009), comprovou-se que o consumo de AGI reduz o risco de doenças cardiovasculares (DCV) e, ainda, a incidência de alguns cancros e doenças como a asma e diabetes.

Quadro 2. Exemplos de ácidos gordos insaturados mais comuns de encontrar em estado natural. [Adaptado de Cuvelier et al. (2004)]

Abreviatura	Nome comum	Nome sistemático	Fórmula Estrutural
C16:1 <i>cis</i> -9	Palmitoleico	<i>cis</i> -9-hexadecenóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
C18:1 <i>cis</i> -9	Oleico	<i>cis</i> -9-octadecenóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
C18:1 <i>trans</i> -11	Vacénico	<i>trans</i> -11-octadecenóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$
C18:2n-6	Linoleico	<i>cis,cis</i> -9,12-octadecadienóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
C18:3n-3	$\alpha$ -Linolénico	<i>cis,cis,cis</i> -9,12,15-octadecatrienóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH})_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
C20:4n-6	Araquidónico	<i>cis,cis,cis,cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenóico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$

## Ácidos Gordos Monoinsaturados

Os AGMI estão presentes em alimentos como o azeite, o óleo de amendoim, abacate e frutos de oleaginosas (amêndoas, nozes, avelã, etc) (Candeias et al. 2005). Outra fonte destes AG é a gordura da carne e produtos derivados. O azeite é um alimento muito rico em AGMI, nomeadamente ácido oleico, estando relacionado com a diminuição do colesterol associado às LDL (lipoproteína de baixa densidade) sanguíneas, designado popularmente por “mau colesterol”, ao aumento do colesterol associado às HDL (lipoproteína de alta densidade; “colesterol bom”) e à diminuição do risco de ataque cardíaco (Moghadasian and Shahidi 2016).

Alguns dos AGMI mais comuns são o ácido palmitoleico (C16:1 *cis*-9) e o ácido oleico (C18:1 *cis*-9). Apesar do ácido palmitoleico ser um constituinte de quase todas as categorias de plantas e animais, o ácido oleico é o ácido mais abundante podendo representar uma percentagem de mais de 50% dos AG totais, estando presente em grande parte das gorduras animais e vegetais (Cuvelier et al. 2004).

A concentração de ácido oleico no tecido adiposo está dependente da atividade da delta-9 dessaturase, codificada pelo gene estearoil coenzima A dessaturase (SCD), responsável pela conversão dos AGS em AGMI (Smith et al. 2006). Esta enzima introduz uma dupla ligação entre o carbono 9 e o carbono 10 da cadeia carbonada e mantém o rácio entre AGMI e AGS (Brock et al. 2006).

A gordura proveniente dos animais ruminantes e os óleos de produtos industriais constituem, ainda, fontes importantes de AGMI *trans* resultantes da hidrogenação. O leite e laticínios são a principal fonte de isómeros octadecenóicos, nomeadamente, o ácido vacénico (C18:1 *trans*-11). Estes ácidos gordos *trans* (rAGT) surgem como compostos intermédios da hidrogenação dos AGI aquando da fermentação bacteriana no rúmen (Fritsche and Steinhart 1998). No caso dos ácidos gordos *trans* de origem industrial (iAGT), predominam os isómeros C18:1 *trans*-9 (ácido elaídico) e *trans*-10, formados a partir da hidrogenação parcial de óleos vegetais (Ferlay et al. 2017).

O aumento do fluxo de saída do rúmen de C18:1 *trans*-11 tem particular interesse, uma vez que, funciona como substrato para a atuação da delta-9 dessaturase da qual resulta a formação de CLA *cis*-9, *trans*-11 (Alves and Bessa 2014). Por sua vez, a acumulação de C18:1 *trans*-10 está relacionada com o síndrome da depressão da gordura do leite (Griinari et al. 1998).

## *Ácidos Gordos Polinsaturados*

Todos os ácidos gordos desempenham funções importantes e necessárias ao normal funcionamento dos organismos, mas os AGPI são componentes fundamentais na alimentação. O seu papel na produção de metabolitos essenciais, na resposta a infeções, no crescimento e desenvolvimento do organismo e na modulação da resposta cardiovascular são apenas algumas das suas diversas funções (Candeias et al. 2005). Como exemplos de fontes de AGPI tem-se os óleos vegetais, de oleaginosas, cereais integrais, gorduras e óleos de peixes.

Os AGPI podem ser divididos em duas famílias: ácidos gordos polinsaturados ómega-6 (AGPI n-6) e ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (AGPI n-3). Os AGPI n-6 caracterizam-se por terem uma ligação dupla no sexto carbono a contar do último radical metilo, enquanto nos AGPI n-3 se localiza no terceiro carbono. Distinguem-se dos outros AG por serem considerados essenciais, uma vez que, desempenham funções indispensáveis, mas não são completamente sintetizados de novo pelos vertebrados e têm de ser obtidos através da alimentação. Esta essencialidade advém do facto destes AG, não só, desempenharem funções vitais, mas também, representarem importantes nutrientes (Spector 1999). No Quadro 3 apresentam-se algumas funções dos AG ómega-3 e ómega-6.

Na família dos AG ómega-3 destacam-se o ácido  $\alpha$ -linolénico (ALN; C18:3n-3), o ácido eicosapentanoico (EPA; C20:5n-3) e o ácido docosahexanoico (DHA; C22:6n-3). O ALN pode ser obtido em sementes e óleos (óleo de linho, óleo de soja), vegetais de folha verde e frutos secos; enquanto o EPA e o DHA podem ser obtidos através da gordura e óleo de peixes (salmão, sardinha, arenque) (Covington 2004).

Para além de serem ácidos gordos essenciais (AGE), os AG ómega-3 podem ainda ter um efeito preventivo e modelador em relação a várias doenças, nomeadamente, doenças cardíacas, enfartes, aterosclerose, doenças inflamatórias e até distúrbios comportamentais (Connor 2000). Adicionalmente, têm um papel importante no normal desenvolvimento dos sistemas cardíaco e circulatório, do córtex cerebral e das capacidades cognitivas em crianças (Candeias et al. 2005; Moghadasian and Shahidi 2016).

Quanto aos AG ómega-6 destacam-se o ácido linoleico (AL; C18:2n-6) e o ácido araquidónico (C20:4n-6). O ácido araquidónico deriva do ácido linoleico e tem um papel importante na síntese de eicosanóides e na regulação da expressão de genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo dos lípidos (Bessa 1999). O AL é dos ácidos gordos mais abundantes podendo encontrar-se em óleos vegetais (soja, milho,

girassol), grãos de cereais, carne e sementes de várias plantas (Covington 2004; Cuvelier et al. 2004).

Quadro 3. Exemplos de funções dos principais AGPI ômega-3 e ômega-6. [Adaptado de Spector (1999)]

<b>Classe</b>	<b>Ácido gordo</b>	<b>Função</b>
<b>n-6</b>	Araquidónico	Síntese de eicosanóides Constituinte da membrana dos fosfolípidos envolvidos na transdução de sinal
<b>n-6</b>	Linoleico	Síntese de lípidos que formam a barreira permeável da epiderme
<b>n-3</b>	Eicosapentanóico	Síntese de eicosanóides Compete com o ácido araquidónico pelas mesmas vias metabólicas
<b>n-3</b>	Docosahexanóico	Estrutura dos lípidos da membrana Modulação de proteínas da membrana integral Formação de radicais livres Regulação da expressão de genes

Enquanto os AG ômega-3 têm propriedades anti-inflamatórias, antitrombóticas e antiarrítmicas, os AG ômega-6 são pro-inflamatórios e pro-trombóticos (Covington 2004). Quantidades excessivas de AG ômega-6 e uma razão n-6/n-3 elevada na dieta, promovem a patogénese de várias doenças como doenças cardiovasculares, cancro, doenças inflamatórias e autoimunes; ao passo que, quando o teor de AG ômega-3 é mais elevado (razão n-6/n-3 baixa) o efeito é supressivo (Simopoulos 2002).

O ácido linoleico e o ácido linolénico são os principais AGE e, ao sofrerem uma alongação e uma desaturação, dão origem aos seus derivados de longa cadeia como o ácido araquidónico, o EPA e o DHA. O alongamento e desaturação do AL resultam na formação do ácido dihomog- $\gamma$ -linolénico (C20:3n-6) que, por sua vez, é desaturado a ácido araquidónico. O ácido ALN é alongado e desaturado a ácido eicosatetraenóico (C20:4n-3) e, posteriormente, a EPA e DHA (Moreira et al. 2002). As vias biossintéticas dos n-6 e n-3 competem entre si pelas mesmas enzimas (as delta-5 e delta-6 desaturases), pelo que é importante manter o rácio n-6/n-3 equilibrado na dieta humana (Ander et al. 2003).

## 1.2. Importância dos ácidos gordos na saúde humana

A crescente consciencialização dos consumidores em relação aos alimentos que incluem nas suas dietas, traduz-se numa escolha de produtos que possuam na sua constituição componentes que contribuam positivamente para a manutenção da sua saúde e para a prevenção do surgimento de doenças. A dieta tem um papel fundamental como fator de risco para doenças crónicas, mais especificamente, o efeito do tipo e quantidade de gordura ingerida (Givens 2009).

Nos países ocidentais, onde o consumo de produtos animais assume grande importância, as dietas caracterizam-se por conterem níveis elevados, tanto de AGS, como de AGPI ómega-6, e reduzidos níveis de AGPI ómega-3 (Givens 2010). A ingestão diminuta de peixe e produtos derivados é, em parte, responsável pelo reduzido consumo de AGPI ómega-3, nomeadamente, de EPA e DHA.

Os AGPI de cadeia longa têm um papel importante na manutenção da saúde humana e na prevenção de doenças, nomeadamente, cardiovasculares, inflamatórias e neurológicas (Yashodhara et al. 2009). A carência destes AG está associada a doenças como a hipertensão, distúrbios inflamatórios e imunes, depressão e disfunções neurológicas (Williams 2000). Adicionalmente o EPA e o DHA, desempenham um papel importante na prevenção de doenças crónicas e cardíacas (Bernal-Santos et al. 2010). Segundo recomendações da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA 2010), a ingestão de gordura deve representar entre 20 a 35% do consumo total de energia, sendo que o teor de AGS e de AG *trans* tem de ser o mais baixo possível. Estas recomendações relacionam-se com o facto de o consumo excessivo destes AG estar associado ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Givens 2010). Dentro dos AGS, os ácidos láurico, mirístico e palmítico, estão relacionados com o aumento da concentração LDL e da concentração do colesterol plasmático total (Williams 2000). Similarmente, os AG *trans* aumentam os níveis sanguíneos de colesterol LDL e diminuem os de colesterol HDL (Candeias et al. 2005). O consumo de leite e laticínios representa uma contribuição importante no consumo de ácidos gordos essenciais e vitaminas. O teor de gordura nestes produtos contribui para a sua qualidade nutricional, bem como, para os seus atributos sensoriais. Os AGPI presentes na gordura do leite são, essencialmente, o ácido linoleico e o ácido linolénico, apesar de conterem também pequenas quantidades de EPA e DHA (Dewhurst et al. 2006). Porém, a proporção de AGS (0,70-0,75) supera largamente a proporção de AGMI (0,20-0,25) e de AGPI (0,05) (Lock and Shingfield 2004). Como consequência, o leite e produtos derivados (ex: manteiga), representam uma fonte considerável de consumo de AGS e de AG *trans*, uma vez que, os lípidos presentes nestes produtos são ricos nestes ácidos gordos (Hulshof et al. 1999; Kliem and Givens 2011). No entanto, estes produtos

contribuem também (cerca de 67% do consumo total) para o consumo de isómeros conjugados do ácido linoleico (Lawson et al. 2001).

Os produtos provenientes dos ruminantes são também a principal fonte de CLA na dieta (Chouinard et al. 1998). Segundo vários estudos, os CLA estão associados a diversos efeitos benéficos na saúde humana (Quadro 4), nomeadamente redução da acumulação de gordura corporal, efeitos antidiabéticos, diminuição do desenvolvimento da aterosclerose, aumento da mineralização óssea e modelação do sistema imunitário (Belury 1995; Houseknecht et al. 1998). Possuem, ainda, propriedades anticarcinogénicas, imunomoduladoras e promovem o aumento do crescimento e da massa corporal magra (Bessa et al. 2000). Estudos realizados em animais e com modelos *in vitro* demonstraram, através da modulação de moléculas inflamatórias, que os CLA tinham um efeito positivo nas respostas imunitárias e inflamatórias (Viladmiu et al. 2016).

O isómero CLA mais abundante na gordura de ruminantes é o CLA *cis-9, trans-11* (ácido ruménico), representando cerca de 75 a 90% do total de CLA, caracterizado por ter efeitos anticarcinogénicos (Lock and Bauman 2004). Outro isómero com interesse é o CLA *trans-10, cis-12*, com efeitos ao nível da redução da gordura corporal e da prevenção da obesidade (Martin and Valeille 2002).

Quadro 4. Efeitos biológicos dos principais isómeros CLA. [Adaptado de Martin and Valeille (2002)]

<b>Efeito biológico</b>	<b>CLA <i>cis-9, trans-11</i></b>	<b>CLA <i>trans-10, cis-12</i></b>
Anticancerígeno	+	+
Diminuição da gordura corporal	0	+
Anti aterosclerose	+ (?) <sup>1</sup>	+ (?) <sup>1</sup>
Resistência à insulina	0	+ ou - <sup>2</sup>
Síntese de eicosanóides	-	-

Notas: (+) efeito positivo; (-) efeito negativo; <sup>(1)</sup> necessita de confirmação adicional; <sup>(2)</sup> comprovado apenas em ratos.

Apesar de os produtos de origem animal constituírem uma fonte importante de nutrientes, a quantidade e composição em AG pode afetar positiva ou negativamente a saúde. A principal preocupação prende-se com o teor elevado de AGS e da sua associação com o aumento do risco de doenças cardiovasculares e outras doenças crónicas (Givens 2009). Por outro lado, alguns destes produtos contêm componentes que podem ter efeitos benéficos na saúde a longo prazo. O leite, por exemplo, é um produto com uma perceção menos boa por parte do consumidor devido ao seu elevado

teor de gordura, no entanto, estudos têm vindo a demonstrar que o leite e laticínios podem ter um efeito protetor contra doenças vasculares e outras condições (Kliem and Givens 2011). O objetivo principal passa por melhorar a composição destes produtos através da nutrição animal, potenciando os constituintes que afetam positivamente a saúde humana.

## **2. Metabolismo lipídico no rúmen**

O metabolismo lipídico no rúmen influencia fortemente a composição em AG da carne e do leite de ruminantes (Jenkins et al. 2008). No caso dos animais monogástricos, aumentando-se a ingestão de AGPI, consegue-se aumentar a concentração destes nos seus produtos, no entanto, nos ruminantes tal não acontece. A saturação que ocorre quando os AGPI são expostos ao ataque microbiano no rúmen, não permite que a quantidade de AGPI na dieta se reflita nos produtos resultantes, isto é, na carne e no leite de ruminantes (Buccioni et al. 2012). O perfil lipídico após a passagem ruminal é consideravelmente diferente do perfil lipídico ingerido, isto é, à entrada do rúmen predominam os AGI, enquanto que, à saída a grande maioria dos AG presentes são saturados (Jenkins et al. 2008). As dietas dos ruminantes, normalmente constituídas por forragens e concentrados, contêm cerca de 4% de matéria seca correspondente a fração lipídica, sendo a maior parte AGI de cadeia C18 (Ferlay et al. 2017). Adicionalmente, as forragens apresentam uma concentração maior de ácido linolénico (C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15), enquanto que, os grãos de cereais são ricos em ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) (Bauman et al. 2003).

A maioria dos lípidos que entram no rúmen são triglicéridos, fosfolípidos e galactolípidos, sofrendo uma hidrólise resultante da atividade enzimática dos microrganismos ruminais (Dawson and Hemington 1974). A população microbiana no rúmen é constituída, essencialmente, por bactérias anaeróbicas, arqueias, protozoários ciliados e fungos. As bactérias abundam em relação aos restantes, seguidas por arqueias, protozoários e em menor quantidade encontram-se os fungos (Lourenço et al. 2010). Estes microrganismos permitem a libertação de nutrientes ao atacarem e degradarem rapidamente as partículas ingeridas (Huws et al. 2013). As bactérias, têm enzimas que convertem os carboidratos fermentescíveis em AG voláteis (ácidos acético, propiónico e butírico) funcionando como substrato energético nos ruminantes (Doreau et al. 2016). Os microrganismos do rúmen transformam os lípidos através de dois processos distintos: a lipólise e a bioidrogenação.

## 2.1. Lipólise ruminal

A degradação dos lípidos no rúmen tem início com um processo de hidrólise denominado de lipólise. Neste processo, as lípases microbianas hidrolisam as ligações éster permitindo a libertação de AG (Dawson et al. 1977) e glicerol. A lipólise é uma etapa necessária à BI, uma vez que, a hidrogenação só é possível se existir um grupo carboxílico livre (Buccioni et al. 2012).

No caso de animais com dietas ricas em cereais e óleos vegetais, os triglicéridos são mais abundantes, sendo hidrolisados predominantemente por lípases microbianas (Dawson et al. 1977). Quando os animais têm uma dieta à base de pastagem, predominam os galactolípido e os fosfolípido (Harfoot 1981). Dentro dos diversos microrganismos existentes na população ruminal, as bactérias são as mais ativas na lipólise (Lourenço et al. 2010), com poucas evidências de um papel significativo dos protozoários e dos fungos, bem como das lípases vegetais (Bauman et al. 2003). As bactérias mais ativas na lipólise dos triglicéridos são as bactérias da espécie *Anaerovibrio lipolytica* e, no caso dos fosfolípido e dos galactolípido as bactérias do género *Butyrivibrio spp* (Harfoot and Hazlewood 1997).

Existem vários fatores que podem afetar a extensão da lipólise. Num estudo efetuado por Beam et al. (2000), concluiu-se que a extensão da lipólise diminui quando o teor de gordura na dieta aumenta, particularmente quando estes apresentam um elevado ponto de fusão. Adicionalmente, Van Nevel e Demeyer (1996), verificaram que à medida que o pH no rúmen baixa, a inibição da lipólise aumenta.

## 2.2. Biohidrogenação

Como referido anteriormente, a lipólise antecede o processo de biohidrogenação e é necessária para que este aconteça. O objetivo da BI passa por proteger as bactérias da toxicidade dos ácidos gordos insaturados (Maia et al. 2010). A biohidrogenação consiste na saturação dos AGI através da isomerização em AG *trans* e da hidrogenação das duplas ligações (Jenkins and Bridges 2007). As isomerizações envolvem a alteração da configuração geométrica de *cis* para *trans* e da posição das duplas ligações, formando intermediários como os AG *trans*. Assim, do processo de BI resultam AG saturados e AG *trans* indesejados, que diminuem a quantidade de AGPI disponíveis para absorção no intestino delgado (Harfoot and Hazlewood 1997).

O ácido linoleico e o ácido linolénico são o principal substrato para a biohidrogenação, que é tanto mais rápida quanto maior o grau de insaturação (Bauman et al. 2003). Em animais com dieta à base de pastoreio, o substrato para a biohidrogenação é o ácido linolénico, uma vez que é o AG mais abundante presente nos glicolípido e fosfolípido das forragens, enquanto que, nos animais aos quais são fornecidos suplementos



lipídicos, o ácido linoleico na forma de triglicérido funciona como substrato (Lourenço et al. 2010).

À semelhança da lipólise, as bactérias também têm um papel fundamental na biohidrogenação. As bactérias do rúmen envolvidas na BI, foram inicialmente classificadas, consoante as suas vias metabólicas, por Kemp e Lander (1984), em dois grupos: bactérias do grupo A e B. As bactérias do grupo A são capazes de hidrogenar o C18:2n-6 e o C18:3n-3 a C18:1, nomeadamente, C18:1 *trans*-11 (ácido vacénico), porém são incapazes de concluir a BI dos AG C18:1 a C18:0. As bactérias que completam a BI dos C18:1 a C18:0 (ácido esteárico) pertencem ao grupo B. Assim, para obter uma BI completa dos AGPI ambos os grupos de bactérias necessitam de atuar. Quando os AG não são completamente hidrogenados, ocorre a formação de diferentes compostos intermédios através das diferentes vias de BI (Figura 2). Segundo Bauman e Griinari (2003), dois principais intermediários são o *trans*11-18:1 formado a partir do AL e do ALN e o CLA *cis*-9, *trans*-11 formado a partir da BI do AL. De facto, inúmeros estudos *in vivo*, detetaram uma vasta presença de isómeros C18:1 *trans* e CLA nos conteúdos ruminais de bovinos e ovinos, o que sugere a passagem destes AGPI por diversas vias metabólicas para além das principais vias de BI (Jenkins and Bridges 2007). Alterações no ambiente ruminal, bem como na composição da dieta podem causar estas mudanças das vias de BI, resultando em diferenças consideráveis nos AG intermédios obtidos (Bauman et al. 2003).

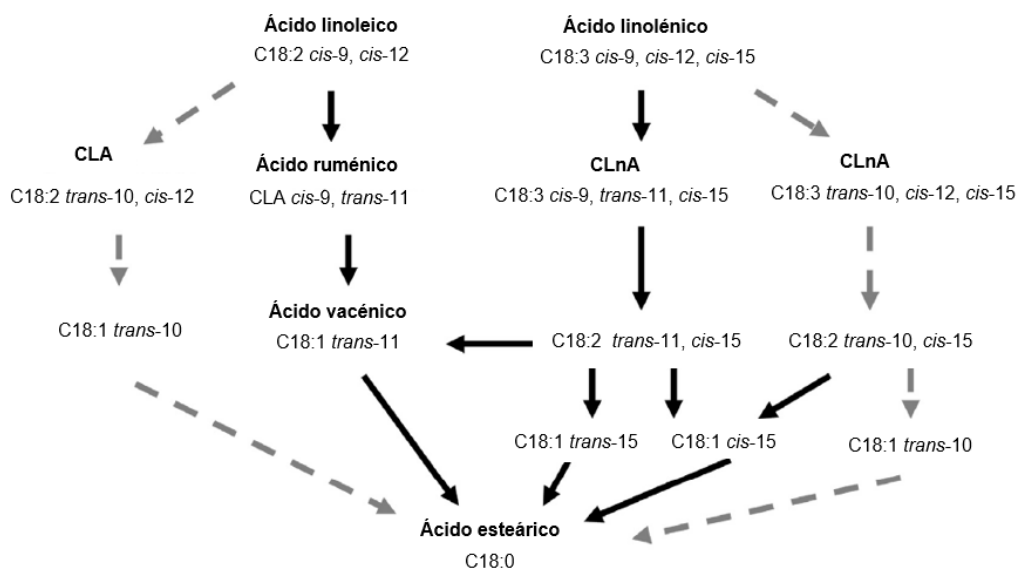


Figura 2. Principais vias do metabolismo ruminal do ácido linoleico e do ácido linolénico; onde as setas contínuas identificam o processo em condições normais e as setas descontínuas representam vias alternativas provocadas, neste caso, por baixo pH e/ou dieta rica em amido e suplementada com AGI. [Adaptado de Ferlay et al. (2017)]

Apesar das bactérias serem as principais intervenientes na BI, acredita-se que cerca de metade da biomassa microbiana no rúmen são protozoários (Williams and Coleman 1992), representando uma importante fonte de AGPI, CLA e C18:1 *trans*-11 para incorporação na carne e no leite. Os fungos, apesar de representarem pouco peso na biomassa microbiana, podem contribuir significativamente para o metabolismo global, para além de conterem uma composição alta de C18:1 (Kemp et al. 1984). Adicionalmente, têm uma participação direta na produção C18:2 *trans*-11 a partir da BI do AL e do ALN (Nam and Garnsworthy 2007).

Vários fatores que afetam a lipólise, também têm um efeito direto na BI, nomeadamente a quantidade e tipo de gordura adicionados à dieta, que afetam a BI dos lípidos no rúmen (Buccioni et al. 2012). Adicionalmente, a qualidade da forragem (nomeadamente o estado de maturação e teor de N), área superficial das partículas alimentares e modificações na estrutura das moléculas dos lípidos, fazem variar as taxas de hidrogenação (Jenkins 1993).

### **3. Importância da proteção lipídica**

A maioria dos AGPI na dieta dos ruminantes, são convertidos em produtos mais hidrogenados no processo de BI ruminal, o que leva à perda das suas propriedades benéficas antes que possam ser absorvidos no intestino delgado (Gadeyne et al. 2017). Como forma de impedir que esta degradação aconteça, têm vindo a ser estudadas diversas tecnologias que protejam os AGPI e possibilitem a sua absorção e incorporação nos produtos dos ruminantes. Quando se fala em proteção dos AG no rúmen, fala-se fundamentalmente em proteger os dois AG essenciais: o ácido linoleico e o ácido linolénico (Jenkins and Bridges 2007). De facto, Doreau et al. (2015), referem que quando se utilizam fontes de AGPI n-3 sem qualquer tipo de proteção, o leite e a carne não atingem concentrações consideradas pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA 2009) que permitam a sua identificação como “fonte de” ou “rico em” AGPI n-3.

A gordura do leite constitui cerca de 75% da gordura total consumida através dos produtos ruminantes (Chilliard et al. 2000), sendo que 25-35% do total de gorduras saturadas ingeridas provém dos lacticínios (O'Donnell 1993). Grande parte dos lípidos presentes na dieta dos ruminantes são naturalmente enriquecidos em AL e ALN, contudo, devido às transformações sofridas nos processos de lipólise e BI, a proporção de AGPI n-3 na gordura do leite é relativamente baixa (Gawad et al. 2015). Os AG n-3 representam menos de 0,5% no total dos AG presentes na gordura do leite, sendo maioritariamente ALN (Jensen 2002). No entanto, vários estudos demonstraram que é

possível aumentar os AG n-3 no leite através da suplementação lipídica na dieta dos animais.

O ácido eicosapentaenóico (C20:5n-3) e o ácido docosahexaenóico (C22:6n-3) são exemplos de AGPI de cadeia longa, que têm como precursor o ALN (C18:3n-3). Um estudo efetuado, com bovinos leiteiros, por Petit e Twagiramungu (2006), demonstrou que quando os animais foram suplementados com DHA e EPA, a sua performance reprodutiva melhorou, uma vez que, a taxa de fertilidade aumentou.

Posto isto, o que se pretende atingir com as tecnologias de proteção de lípidos é uma melhoria do perfil lipídico dos produtos dos ruminantes, através da diminuição do teor de AGS e do aumento do teor de AG n-3. Estas tecnologias são uma solução importante como forma de proteger os AG do metabolismo ruminal, nomeadamente os AGPI, e garantir a acumulação e absorção dos produtos intermédios da BI. Adicionalmente, com a utilização de tecnologias eficazes torna-se possível, através da suplementação, proteger as propriedades benéficas que estes possuem, tanto para a saúde animal como para a saúde humana.

#### **4. Tecnologias de proteção de lípidos**

As tecnologias de proteção de lípidos surgem da necessidade de combater a extensa biohidrogenação dos AGPI no rúmen, permitindo o *bypass* dos lípidos e a sua posterior absorção. Adicionalmente, garantem que determinados ácidos gordos insaturados (AGI) específicos sejam fornecidos ao organismo quando a sua necessidade excede a quantidade resultante da degradação ruminal (Jenkins and Bridges 2007). Para que estas tecnologias sejam eficazes, após o *bypass* dos lípidos, têm de permitir que os AGPI sejam libertados para possibilitar a sua absorção no intestino, entrada no sistema linfático e transferência para os tecidos periféricos (Figura 3) (Gadeyne et al. 2017).

Segundo Jenkins e Bridges (2007), para uma tecnologia de proteção de lípidos ser eficiente tem de fornecer um fluxo consistente de AGI ao duodeno, uma adequada libertação e absorção no intestino e interferir o menos possível com a fermentação no rúmen. Inúmeras tecnologias têm vindo a ser estudadas de modo a cumprir os requisitos anteriormente descritos e simultaneamente a contornar o problema da BI no rúmen. No entanto, muitas destas tecnologias utilizam produtos prejudiciais, são dispendiosas ou não são consistentes o suficiente ao nível da proteção ruminal.

Das tecnologias mais frequentemente descritas na literatura destacam-se as que funcionam através da alteração da estrutura dos AG e as que utilizam uma técnica de encapsulação dos AGI numa cápsula resistente ao ataque microbiano.

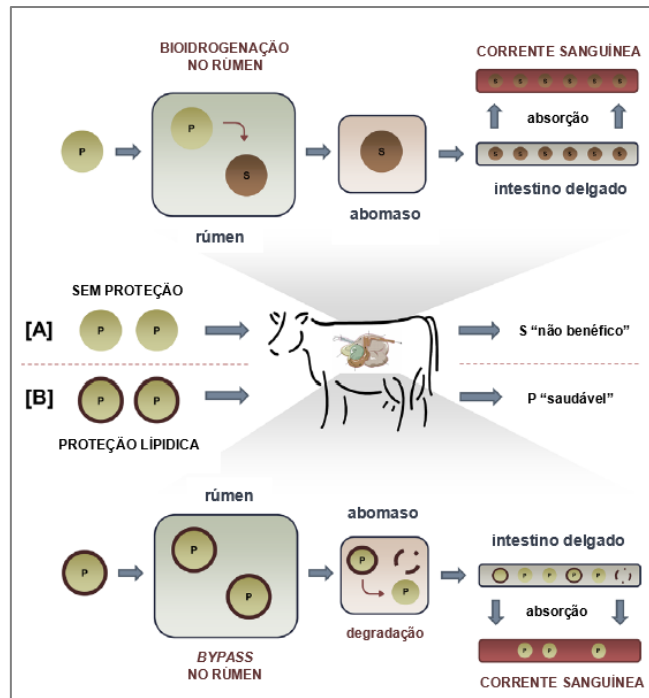


Figura 3. Comparação entre o efeito da biohidrogenação ruminal numa fonte lipídica não protegida [A] e utilizando uma tecnologia de proteção lipídica [B]; em que P representa os AGPI e S representa os AGS. [Adaptado de Gadeyne et al. (2017)]

#### 4.1. Alteração da estrutura

A alteração da estrutura dos AG consiste em impedir que as enzimas microbianas ataquem o grupo carboxílico livre. Este grupo pode ser bloqueado através de ligações iónicas com o cálcio (sais de cálcio) ou através da reação dos AG com amidas, sendo que ambos sofrem uma degradação depois da passagem pelo rúmen para os AGI serem libertados e absorvidos (Jenkins and Bridges 2007).

##### 4.1.1. Sais cálcicos

Os sais de cálcio (Ca) são sabões formados a partir da ligação iónica entre o grupo carboxílico livre e os iões de Ca (Gadeyne et al. 2017). O estudo de Palmquist e Jenkins (1987) defende que o carácter insolúvel dos iões de Ca permite o eficiente *bypass* no rúmen, protegendo os sais de cálcio de AG contra a BI. Estes sais dissociam-se depois no abomaso quando o pH baixa, uma vez que a constante de dissociação (pKa) do Ca varia entre 4,5 e 6 (Sukhija and Palmquist 1990), permitindo a absorção dos AG no intestino delgado. Porém, a formação destes sais, quando incompleta, pode deixar AGI livres que ficaram por reagir e levar à formação de massas que coagulam devido ao seu baixo ponto de fusão (Strohmaier et al. 2005). Outra desvantagem está relacionada com o número de insaturações dos AG ser limitante, uma vez que o pKa depende deste, isto

é, quanto maior for o número de insaturações, maior dissociação pode ocorrer (Sukhija and Palmquist 1990). Adicionalmente, a dissociação também poderá ocorrer quando o pH é inferior a 6,3 (Van Nevel and Demeyer 1996), expondo os AG às isomerasas bacterianas. O facto de os sais de cálcio requererem AG livres contribui, também, negativamente pois acresce o valor da sua obtenção, tornando o processo mais dispendioso a nível económico.

#### 4.1.2. **Amidas**

Outro método que envolve a alteração da estrutura dos lípidos é a ligação de uma fonte de AGI a amidas que, à semelhança da formação de sais de Ca, necessitam de AG livres. Esta ligação resiste à degradação microbiana, permitindo a passagem dos AGI pelo rúmen sem perderem a insaturação. Tal acontece, devido ao impedimento estérico em torno da ligação com o grupo amida que impede o acesso às enzimas microbianas (Jenkins and Bridges 2007).

Posto isto, apesar da utilização de sais de Ca e amidas poder ser uma solução para contornar o ataque microbiano no rúmen, ambos apresentam inconvenientes que têm de ser considerados.

#### 4.2. **Encapsulação**

Nas técnicas de encapsulação, tal como o nome indica, os AGI são revestidos por uma camada protetora que impede o acesso das bactérias responsáveis pela BI aos AG. Um dos métodos utilizados é a encapsulação dos AGI utilizando aldeídos, emulsificando previamente os lípidos com proteínas (Scott and Hills 1975). A degradação dos lípidos é impedida devido à matriz de proteínas cruzadas que se forma, sendo depois permitida quando chega ao abomaso, libertando os lípidos protegidos para que estes consigam ser digeridos e absorvidos no intestino. O aldeído mais comumente utilizado é o formaldeído, no entanto, é considerado pela União Europeia como um produto nocivo e a sua utilização está proibida (Regulamento de execução (UE) nº 2018/183 da Comissão de 7 de fevereiro de 2018), uma vez que, é uma substância tóxica podendo provocar lesões graves. Para além deste facto, o resultado da utilização do formaldeído é difícil de prever porque este pode reagir com outros nutrientes para além das proteínas, pois, a sua ação não é direcionada (Jones 1972). Assim, e apesar do tratamento com formaldeído ser considerado dos mais eficientes, o elevado custo, as suas limitações de utilização e a presença de possíveis resíduos nos produtos animais, limitam fortemente a sua aplicação (Doreau et al. 2016).

Para além da utilização da encapsulação com aldeídos, utilizam-se ainda a encapsulação com cápsulas de gel de matriz proteica, a encapsulação em matriz lipídica de alto ponto de fusão ou a encapsulação em matriz proteica-fenólica.

Rosenberg e Depeters (2010) descreveram uma técnica de encapsulação com cápsulas de gel de matriz proteica. Esta técnica consiste na emulsão de lípidos numa matriz proteica, que quando aquecida a temperaturas entre 80-125°C produzem um gel com efeito protetor contra a degradação no rúmen. Contudo, as emulsões, por conterem grandes quantidades de água, apresentam um tempo de vida útil baixo que pode pôr em causa a qualidade do produto, limitando a sua utilização e produção em grande escala (van Vuuren et al. 2010).

A encapsulação em matriz lipídica de alto ponto de fusão incorpora AG com alto ponto de fusão, geralmente superiores ao da própria matriz. Todavia este método tem baixa carga útil de material ativo e a sua libertação e absorção após a passagem no rúmen é limitada, sendo inversamente proporcional ao seu grau de proteção (Wu and Papas 1997). Quanto à encapsulação em matriz proteica-fenólica, a proteção dos AGI requer pequenas quantidades de proteína para cobrir as emulsões lipídicas, no entanto, um mediador fenólico pode ser necessário para aumentar estabilidade do processo (Gadeyne et al. 2017).

#### **4.3. Outras tecnologias estudadas**

Para além das tecnologias mais descritas na literatura e acima enunciadas, diversas outras tecnologias têm vindo a ser estudadas com o objetivo de aumentar a concentração de AGI absorvidos. No entanto, por apresentarem baixos níveis de proteção, terem sido pouco estudadas ou apenas terem sido realizados estudos *in vitro*, o seu grau de eficiência necessita de comprovação adicional.

Um método proposto por Richardsnon (1992), baseou-se na proteção dos AGPI através de cápsulas proteicas onde as proteínas se ligam a açúcares redutores. Mais recentemente, Vanvolsem (2010) propôs a extrusão de sementes de linhaça na presença de um açúcar redutor como forma de aumentar a concentração de AGPI no leite. Outras técnicas de encapsulação como a utilização de microesferas de polímeros (Jenkins and Bridges 2007), encapsulação utilizando óleo de linhaça (Gawad et al. 2015) ou a nano encapsulação de CLA (Heo et al. 2016) foram estudadas como forma de contornar a BI, demonstrando algum potencial de evolução, embora apresentem, também, os seus inconvenientes.

#### 4.4. Efeito das diferentes tecnologias na alteração do perfil lipídico do leite

De acordo com uma revisão das tecnologias de proteção de lípidos realizada por Gadeyne et al. (2017), salientam-se dois métodos de encapsulação como sendo os mais promissores: a utilização de formaldeídos e as cápsulas de gel de matriz proteica (Quadro 5). Segundo um estudo de Gulati et al. (2005), utilizando sementes de oleaginosas protegidas com formaldeído, obteve-se uma percentagem entre 25-44% de ácido linoleico (C18:2n-6) e uma percentagem entre 19-24% de ácido linolénico (C18:3n-3) transferidos da dieta para o leite. Outro estudo, onde se forneceu semente de colza tratada com formaldeído a vacas Holstein, verificou-se que a proporção de AGMI e AGPI C18 aumentou significativamente (cerca de 54%), nomeadamente o ácido oleico (de 23,8 para 29,2%), enquanto que a proporção de AGS reduziu significativamente (Ashes et al. 1992).

Num estudo comparativo entre a utilização de CLA protegidos com formaldeído e CLA protegidos com sais de cálcio, observou-se que a transferência da dieta para o leite de CLA *trans*-10, *cis*-12 foi de 7% no caso do formaldeído e de 3,2% no caso dos sais de cálcio (De Veth et al. 2005). No entanto, como já referido, devido à sua toxicidade a utilização de formaldeídos é bastante limitada e até restrita na UE, o que impede fortemente a utilização deste composto como forma de proteção dos AG contra a degradação no rúmen.

Posto isto, a utilização de cápsulas de gel de matriz proteica surge como melhor alternativa, apresentando valores semelhantes e com menos limitações. Num estudo efetuado por Carroll et al. (2006) em bovinos leiteiros, utilizando óleo de soja encapsulado numa matriz proteica, obteve-se uma percentagem de eficiência de transferência para o leite de 30,1% para o C18:2n-6, após apenas uma semana de administração do suplemento e comparando com óleo de soja sem proteção. O efeito da proteção lipídica a longo prazo foi demonstrado por van Vuuren et al. (2010), após administração durante 10 semanas de um suplemento com óleo de soja e linho protegidos, onde o teor de AG C18 na gordura do leite aumentou e a eficiência da transferência de C18:3n-3 da dieta para o leite foi cerca de 19%. Adicionalmente, Heguy et al. (2006) alcançaram uma percentagem de 43% de eficiência de transferência para o C18:3n-3 quando introduziu soro de proteína isolada de óleo de soja/linho.

Estas tecnologias, quando comparadas com a utilização de sais de cálcio, amidas ou encapsulação em matriz lipídica de alto ponto de fusão, apresentam valores muito superiores de transferência de AGPI da dieta para o leite. De facto, no estudo de Chouinard et al. (1998), verificou-se que ao fornecer sais de cálcio de óleo de soja (rico em ácido linoleico) ou de óleo de linho (rico em ácido linolénico), a bovinos leiteiros, não se verificou um efeito significativo desses AG no leite. Adicionalmente, Theurer et al.

(2009), apuraram que ao fornecer sais de cálcio de óleo de palma ricos em AGPI houve um aumento limitado de AL, porém não se verificou um aumento no teor de ALN ou de ácido oleico, quando comparado com animais aos quais não foi administrado o suplemento.

Num estudo onde foram utilizados simultaneamente sais de cálcio e amidas (Lundy et al. 2004), as amidas provaram ser mais eficientes do que os sais de cálcio no aumento do fluxo de AG pós-ruminal, em particular do ácido oleico. Perfield et al. (2004), verificaram eficiências semelhantes na transferência para o leite de *trans*-10, *cis*-12 CLA em suplementos protegidos com amidas (7,1%) e encapsulação em matriz lipídica (7,9%).

Quadro 5. Principais tecnologias de proteção de lípidos referidas na literatura e o seu papel na transferência de AGPI da dieta para o leite. [Adaptado de Gadeyne et al. (2017)]

Tecnologia de proteção	Fonte de Lípidos	AGPI Testado	% Transf. Suplemento <sup>1</sup>	%Transf. Controle <sup>2</sup>	Referência
Sais de cálcio	Óleo de linho	C18:3n-3	0,67	-	Chouinard et al. (1998)
	Óleo de palma	C18:2n-6	13,2	-	Theurer et al. (2009)
	CLA	CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	3,2	n.d.	De Veth et al. (2005)
	Óleo de soja	C18:2n-6	6,5	6,9	Lundy et al. (2004)
Amidas	Óleo de soja	C18:2n-6	5,5	6,9	Lundy et al. (2004)
	CLA	CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	7,1	n.d.	Perfield et al. (2004)
Formaldeído	Óleo de colza/soja	C18:2n-6	25-44	-	Gulati et al. (2005)
	Óleo de soja/linho	C18:3n-3	19-24	-	Gulati et al. (2005)
	CLA	CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	7,0	n.d.	De Veth et al. (2005)
Cápsulas de matriz lipídica de alto ponto de fusão	CLA	CLA <i>trans</i> -10, <i>cis</i> -12	7,9	n.d.	Perfield et al. (2004)
Cápsulas de gel de matriz proteica	Óleo de soja	C18:2n-6	46-69	22-37	Carroll et al. (2006)
	Óleo de soja/linho	C18:3n-3	13-19	-	van Vuuren et al. (2010)

<sup>1</sup>Percentagem de AG protegidos transferidos para o leite calculada através da fórmula: [g AGPI no leite] / [g AGPI na dieta] × 100;

<sup>2</sup>Percentagem de AG não protegidos transferidos para o leite; n.d. – não detetado



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente estudo foi realizado no âmbito do projeto NAT- Omega3, coordenado pela FMV – ULisboa (CIISA) e tendo como parceiros uma cooperativa leiteira (VIVALEITE – Cooperativa de Produtores de Leite, Crl), uma fábrica de alimentos compostos para animais (EUROCEREAL – Comercialização de Produtos Agro-Pecuários S.A.) e uma empresa de produção e distribuição de laticínios (TERRA ALEGRE LACTICÍNIOS S.A., grupo Jerónimo Martins). O principal objetivo do projeto passa pelo desenvolvimento de produtos lácteos (leite e seus derivados) naturalmente enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados (cadeia ómega-3), por via da alimentação das vacas leiteiras.

Numa fase inicial do projeto, realizaram-se ensaios preliminares *in vitro* onde se testou a eficácia na proteção contra a bioidrogenação de vários protótipos de produtos. Concluiu-se que um desses produtos testados era promissor e esse produto foi, então, selecionado para ser testado *in vivo* no presente estudo.

### **1. Animais e delineamento experimental**

O procedimento experimental realizou-se na exploração pecuária Barão & Barão, Lda, localizada na região de Benavente, especializada na produção de leite de vaca e cabra. A exploração conta com um efetivo de cerca de 1000 bovinos da raça Holstein-Frísia, dos quais 550 em produção, e de 2000 caprinos das raças Saanen e Alpine (1300 em produção). A produção de forragens, destinadas à alimentação do efetivo, tem lugar nos 600 hectares de área regada inerentes à exploração. Deste modo, todo o processo produtivo do leite tem lugar nas próprias instalações, desde a recria dos animais, à produção de forragens e transporte do leite. Para além da produção leiteira esta exploração, dedica-se desde 2014, à produção de bovinos aleitantes cruzados de Limousine, em regime extensivo, contando atualmente com um efetivo de cerca de 500 animais. Os valores da empresa passam pela preocupação com o bem-estar animal, sustentabilidade, qualidade dos produtos e inovação.

Os animais que participaram no estudo foram selecionados do grupo das 550 vacas Holstein-Frísia em produção. Este grupo está inserido num sistema de produção intensivo, no qual se realizam três ordenhas diárias e a média de produção de leite ronda os 13800L/vaca/305 dias de lactação.

Selecionaram-se 60 vacas no período pós-parto sem condições clínicas a registar, isto é, que não manifestaram sinais de doenças puerperais após o parto. As vacas que sofreram distocia, retenção de membranas fetais, mamites, metrites, hipocalcemia, cetose ou claudicação, após o parto, não integraram o estudo. Os animais entraram no

estudo aos  $11 \pm 0,3$  dias em lactação (DEL) e foram divididos em dois grupos distintos (grupo 1- controlo; grupo 2- NatOmega-3), onde ambos incluíram igual número de vacas primíparas e múltiparas. Ao grupo de controlo administrou-se um suplemento com AGS e ao outro grupo um suplemento com uma fonte de óleo de linho encapsulada (NatOmega-3). O período de suplementação teve uma duração de 9 semanas.

### 1.1. **Composição e administração dos suplementos**

Os dois grupos de animais foram colocados no mesmo parque durante o período do estudo, onde tinham acesso livre ao sistema de alimentação automático, através do qual o suplemento era fornecido. Nos 11 dias posteriores ao parto, todos os animais receberam a mesma dieta completa, formulada no TMR (Total Mixed Ration), com uma ingestão de matéria seca (MS) de 26,8 kg (vaca/dia). Após este período, iniciou-se a administração individual dos suplementos através do sistema automático DairyFeed C-8000 (GEA Farm Technologies, Bönen, Germany), que permite a identificação eletrónica de cada vaca e a medição do seu consumo de suplemento. O Quadro 6 apresenta a composição química da dieta do TMR, bem como, dos dois suplementos fornecidos aos animais.

Cada vaca recebeu, na totalidade, 1,2 kg/dia do respetivo suplemento, distribuído em quatro doses de 0,3 kg. O grupo que recebeu o suplemento enriquecido em ómega-3 teve um fornecimento de 102 g/dia de ácido  $\alpha$ -linolénico (38 g provenientes do TMR e 64 g do suplemento), enquanto o grupo de controlo recebeu apenas os 38 g do TMR.

Quadro 6. Composição química do TMR e dos suplementos (controlo e NatOmega-3).

	TMR	Controlo	NatOmega-3
Ingredientes kg/dia			
Silagem de milho	24	-	-
Silagem de azevém	8	-	-
Farinha de cevada	8	-	-
Levedura de cerveja	4	-	-
Bagaço de soja	3,9	-	-
Melaço de beterraba	1	-	-
Farelo de arroz	1	-	-
Farinha de palma	1,07	-	-
Ácido palmítico 98%	0,285	-	-
Minerais e vitaminas	0,75	-	-
Perfil nutricional % de MS			
% MS	51,6	90,7	91
Proteína bruta	16,85	14,7	13,45
Gordura bruta	4,3	15,6	14,6
Amido	26,4	18,4	20,6
Fibra neutro-detergente (NDF)	32,5	21,4	20
Fibra ácido-detergente (ADF)	18,9	-	-
Lenhina ácido-detergente (ADL)	2,9	-	-
Cinza	8,6	10,2	11,4
Conteúdo de ácidos gordos (g/100 g de gordura bruta)			
C14:0	0,91	1,5	0,1
C16:0	43,42	46,5	5,3
C18:0	3,63	47,5	30,8
C18:1 cis-9	17,83	4,5	11,8
C18:1 cis-11	1,38	-	0,4
C18:2n-6	28,54	-	10,5
C18:3n-3	3,32	-	40
C20:0	0,38	-	0,6
Outros	0,59	-	0,5

## **1.2. Recolha e processamento das amostras**

O estudo teve início no dia 11 pós-parto, sendo cada vaca suplementada durante 9 semanas, período durante o qual foram recolhidas duas amostras de leite semanalmente por vaca. As amostras recolheram-se automaticamente na sala de ordenha, pela equipa envolvida no estudo, após se efetuar o procedimento pré-ordenha e corresponderam à ordenha da tarde (2ª ordenha). Esta recolha fez-se para tubos de 50 mL, com conservante em bronopol (0,043 mL/tubo), para posterior análise da composição do leite. Após obtenção das duas amostras de leite por animal, uma das amostras foi encaminhada para a ALIP – Associação Interprofissional do Leite e Lacticínios (Lousada, Portugal) onde se fez uma análise química, focando-se nos seguintes dados: teor de matéria gorda, matéria proteica, extrato seco desengordurado, contagem de células somáticas e lactose. A outra amostra do respetivo animal, foi utilizada para análise do perfil de ácidos gordos no laboratório de Sistemas de Produção Animal (CIISA, FMV U-Lisboa).

Para além da recolha de amostras de leite obteve-se também informação, através do software utilizado na gestão da exploração, da produção e ingestão individual diária de suplementos de cada vaca, de modo a obter a respetiva produção e ingestão semanal.

## **2. Análise das amostras**

Para efetuar a análise do perfil de AG no leite, as amostras recolhidas na exploração foram encaminhadas para o laboratório do CIISA, devidamente acondicionadas. Os procedimentos efetuados passaram por: centrifugação, transesterificação da gordura do leite e cromatografia gasosa.

### **2.1. Centrifugação**

A centrifugação das amostras teve como objetivo a separação entre o soro e a nata do leite, por forma a retirar-se a nata. Os tubos com as amostras foram colocados numa centrífuga (Shingh 2014 JDS) a 3000 g, durante 30 minutos, a uma temperatura de 4°C. Após a centrifugação, com a ajuda de uma espátula, transferiu-se a nata do leite para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL devidamente identificados com o número do código correspondente a cada animal e o número da semana em que a amostra foi recolhida. Armazenou-se depois os tubos microcentrífuga a -80°C até nova análise.

### **2.2. Transesterificação da gordura do leite**

Os ácidos gordos foram metilados através do procedimento de transesterificação direta da gordura do leite (Anexo 1) e de acordo com o método descrito por Rego et al. (2009).

Começou-se por retirar os tubos de microcentrífuga do congelador, para que pudessem atingir uma temperatura ambiente que permitisse manipular a amostra. Para cada amostra atribuiu-se um tubo de ensaio identificado com o código correspondente ao animal e à semana de recolha da amostra. Pesou-se numa balança analítica (Kern AEJ, Balingen, Germany) 50 mg de gordura de leite, dentro do tubo de ensaio correspondente à amostra e fechou-se com uma tampa. De seguida, adicionou-se 2 mL de n-hexano e 0,2 mL de solução de hidróxido de potássio (2N em metanol) a cada tubo e agitou-se em vortex (Heidolph multi-tube, Heidolph Instruments GmbH & CO. KG) durante 1 hora. Passado o período de agitação, com uma pipeta de Pasteur adicionou-se duas gotas de ácido acético glacial e agitou-se novamente durante 10 segundos no vortex. Com o auxílio de uma colher adicionou-se, aproximadamente, 0,5 g de sulfato de sódio anidro e agitou-se mais uma vez no vortex por 30 segundos para secar a fase orgânica. Em seguida, centrifugou-se durante 5 minutos e retirou-se a fase de n-hexano (sobrenadante) com uma pipeta de Pasteur, cautelosamente de forma a não ressuspender o sulfato de sódio. Transferiu-se o conteúdo da pipeta para um recipiente (igualmente identificado) de cromatografia gasosa (CG) e fechou-se bem para evitar a evaporação dos ácidos gordos de cadeia curta. Conservou-se os recipientes devidamente acondicionados numa arca frigorífica a -20°C até posterior análise por cromatografia gasosa.

### 2.3. Cromatografia gasosa

Os ácidos gordos na forma de ésteres metílicos foram analisados por cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID) no equipamento Shimadzu QP2010-plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna capilar de sílica-fundida (SP-2560, 100 m × 0,25 mm × 0,20 µm, Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Durante a análise o injetor foi mantido a 220°C e o detetor a 250°C. Utilizou-se hélio como gás de arraste a fluxo constante de 1 mL/min e injetou-se 1 µL de amostra. A temperatura do forno foi programada para iniciar a 50°C, mantendo-se a esta temperatura durante 1 min, subindo posteriormente até aos 175°C a 50°C/min. Manteve-se a esta temperatura durante 35 min e finalmente aumentou-se a 2°C/min até aos 220°C onde se manteve durante 30 minutos. A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação com padrões comerciais (FAME mix 37 components, Supelco Inc., Bellefont, PA, USA). As áreas dos picos foram corrigidas pela utilização de fatores de correção teóricos de acordo com Ackman (2002). Por fim, os ácidos gordos foram expressos em percentagem do total de ácidos gordos identificados (g/100 g total AG). Recorreu-se, ainda, ao programa GCsolution (Version 2.41.00, Shimadzu, 2000-2011) para analisar os cromatogramas (Anexo 2).

### 3. Análise Estatística

Todos os dados recolhidos foram organizados em folhas de Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA). Os dados dos ácidos gordos do leite foram analisados utilizando o Procedimento Mixed do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) com um modelo de medidas repetidas no animal, ao longo das 9 semanas, utilizando a estrutura de covariância AR(1) e incluindo o efeito do dia de lactação (DEL) e da ingestão de suplemento (ING) como variáveis independentes contínuas e o efeito da paridade (PM, primípara vs. múltipara) e do tratamento (TRAT, tipo de suplemento, Controlo vs. NatOmega-3) como variáveis independentes categóricas e respetivas interações. Dada a grande variabilidade na ingestão dos suplementos, o efeito do tipo de suplemento confundia-se com o efeito da quantidade de suplemento ingerida, pelo que, foi a interação entre estas duas variáveis que melhor captou o efeito em estudo na presente experiência. As restantes interações, incluindo DEL\*DEL (efeito quadrático do dia de lactação) não foram significativas e saíram dos modelos. Assim, os modelos foram simplificados utilizando apenas os efeitos DEL, PM e ING\*TRAT. As médias ajustadas (LSMEANS) para os 2 níveis do efeito fixo PM e os declives para os efeitos do DEL e ING\*TRAT, respetivos erros padrão e valores de P foram apresentados em tabela.

Os modelos utilizados para os dados de produção de leite e de gordura do leite foram semelhantes, mas incluíram o efeito DEL\*DEL. Para o modelo da gordura do leite, o efeito isolado do TRAT manteve-se no modelo, uma vez que era significativo ( $P < 0,05$ ). Calcularam-se ainda os índices da delta 9 dessaturase (SCD) através da seguinte fórmula: [produto da delta-9 dessaturase] / [produto da delta-9 dessaturase + substrato da delta-9 dessaturase].

## RESULTADOS

### 1. Produção de Leite

No Quadro 7 apresentam-se os resultados obtidos para a produção de leite. Verificou-se um efeito significativo ( $P < 0,001$ ) da paridade na produção de leite, expressa em litros por semana, sendo superior nas múltiparas, quando comparada com as primíparas. Os efeitos linear e quadrático dos dias em lactação foram também significativos (ambos  $P < 0,001$ ), sendo o declive linear positivo e o quadrático negativo. Quanto ao efeito da interação dos tratamentos e da ingestão (Trat\*Ing), não foi significativo ( $P = 0,155$ ) na produção de leite.

Quadro 7. Efeito da paridade (P\_M), dos dias em lactação (Dia) e da interação entre os diferentes tratamentos e a ingestão (Trat\*Ing), na produção de leite semanal.

	Paridade		Dia	Dia*Dia	Trat*Ing		Valor P			
	Primíparas	Múltiparas			Controlo	NatOmega-3	P_M	Dia	Dia*Dia	Trat*Ing
Produção de leite	297,47	382,41	4,368	-0,036	0,236	0,988	<0,001	<0,001	<0,001	0,155

### 2. Teor de gordura no leite

O teor de gordura do leite (Quadro 8) não diferiu significativamente ( $P > 0,05$ ) entre primíparas e múltiparas apresentando um valor médio de 3,84 % no leite. Observaram-se efeitos linear e quadrático significativos ( $P < 0,05$ ) dos dias em lactação na percentagem de gordura do leite, sendo que ao contrário do que se observou para a produção de leite, o declive linear é negativo moderado por um declive quadrático positivo. A interação entre a ingestão do suplemento e o tipo de suplemento não foi significativa, mas observou-se um efeito significativo do tratamento, independentemente da sua ingestão, sendo superior com o NatOmega-3 em comparação com o Controlo (3,96 vs. 3,71%).

Quadro 8. Efeito da paridade (P\_M), dos dias em lactação (Dia), do efeito isolado do tratamento (Trat) e da interação entre os diferentes tratamentos e a ingestão (Trat\*Ing), no teor de gordura do leite.

	Paridade		Dia	Dia*Dia	Trat		Trat*Ing		Valor P				
	P	M			Controlo	NatOmega-3	Controlo	NatOmega-3	P_M	Dia	Dia*Dia	Trat	Trat*Ing
Gordura do leite	3,78	3,89	-0,039	0,0003	3,71	3,96	0,015	-0,022	0,331	0,005	0,049	0,023	0,580

### 3. Perfil de ácidos gordos

Os resultados obtidos relativos aos ácidos gordos do leite apresentam-se no Quadro 9. Para cada ácido gordo, avaliou-se o efeito da paridade (primíparas vs. múltiparas), o efeito dos dias em lactação (Dia) e o efeito da ingestão dos diferentes suplementos (Trat\*Ing, Controlo vs. NatOmega-3). Calcularam-se os índices dessaturase para os pares C12:0/C12:1c9, C14:0/C14:1c9, C16:0/C16:1c9 e C17:0/C17:1c9, por forma a compreender a atividade da delta-9 dessaturase.

#### 3.1. Efeito da paridade

Em relação ao efeito da paridade, do total de sessenta e seis ácidos gordos analisados, verificou-se um efeito significativo ( $P < 0,05$ ) para trinta, sendo que desses, 18 AG apresentaram valores mais reduzidos nas primíparas em relação às múltiparas e os restantes 12 AG o oposto.

As amostras de leite das primíparas apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) percentagem de C4:0, i-C14:0, i-C15:0, i-C16:0, i-C18:0, C18:0, C18:1t11, C18:1t16/c14, CLA-c9t11, C18:3n-3, C20:0 e C22:0 do que o leites da múltiparas. Por sua vez o C9:0, C11:0/C10:1c9, C12:0, C12:1c9, C13:0, C14:0, C14:1c9, C15:0, C16:1c7, C16:1c9, C17:1c9, C18:1t10, C18:1c11, C18:1c13, C18:2t8c13/c9t15, C18:2c9t12, C18:2t9c12, e CLA-tt, apresentaram maior percentagem nas múltiparas que nas primíparas.

Verificou-se um efeito significativo da paridade em todos os índices da delta-9 dessaturase, sendo superior nas múltiparas para todos.

#### 3.2. Efeito dos dias em lactação

Quanto ao efeito dos dias em lactação (DEL) no perfil de ácidos gordos no leite, observou-se que dos 66 AG identificados 16 aumentaram e 18 reduziram as suas proporções com os DEL. Dos AG que aumentaram com os DEL destacam-se o C10:0, C11:0/C10:1c9, C12:0, a-C13:0, C12:1c9, C13:0, C14:0, i-C15:0, a-C15:0, C14:1c9, C15:0, C16:0, C16:1c9, C18:1t13/t14, C20:1c9 e CLA-tt. Quanto aos AG que reduziram as suas proporções temos o C4:0, C17:0, i-C18:0, C17:1c9, C18:0, C18:1t11, C18:1t12, C18:1c9, C18:1c11, C18:1c12, C18:1c13, C18:1t16/c14, C18:1c16, C18:2n-6, C18:2c9c15, C20:0, C20:1c11 e C20:4n-6.

O efeito dos dias em lactação nos índices da delta-9 dessaturase não foram consistentes tendo SCD14 aumentado e o SCD17 diminuído. Quanto ao SCD12 e SCD16, mostraram-se inalterados ao longo do período da lactação estudado.



### 3.3. Efeito da ingestão dos diferentes tratamentos

O efeito da interação entre a ingestão do suplemento e o tipo de suplemento (Controlo ou NatOmega-3) permite-nos evidenciar de que forma variam os AG do leite com a ingestão de cada suplemento. Esta interação foi significativa para 16 AG, sendo que desses apenas 6 AG (a-C13:0, i-C18:0, C18:2c9t12, C18:1c16 , CLAc9t11 e C22:0) aumentaram com a ingestão do suplemento de controlo; 7 AG (i-C18:0, C18:1t9, C19:0, C18:2c9t15, C18:2c9t12, C18:3n-3 e CLAc9t11) aumentaram com a ingestão de NatOmega-3; e 5 AG (C18:2t9c12, C20:2n-6, C18:3c9t11c15/C20:3n-9, C20:3n-3 e C24:0) diminuíram com a ingestão de NatOmega-3. Identificou-se uma tendência para o C18:0 ( $P=0,056$ ) que diminuiu significativamente com a ingestão do suplemento de controlo. Em relação aos índices da delta-9 dessaturase, observou-se um efeito significativo para o SCD12 e SCD14.

Quadro 9. Efeito da paridade (P\_M), dos dias em lactação (Dia) e da interação entre a ingestão e os diferentes tratamentos (Trat\*Ing) no perfil de ácidos gordos do leite.

	Paridade		Dia	Trat*Ing		Valor P		
	Primíparas	Multíparas		Controlo	NatOmega-3	P_M	Dia	Trat*Ing
Ácidos Gordos Saturados								
C4:0	2,31	2,00	-0,0066	-0,0009	0,0023	0,024	0,0002	0,965
C6:0	1,64	1,55	-0,0006	0,0074	-0,0066	0,243	0,568	0,306
C8:0	1,01	1,01	0,0013	0,0051	-0,0044	1,000	0,088	0,308
C9:0	0,04	0,06	0,0001	0,0003	0,0003	<0,001	0,099	0,718
C10:0	2,37	2,57	0,0078	0,0100	-0,0148	0,164	0,0003	0,323
C11:0/C10:1c9	0,22	0,27	0,0020	0,0034	0,0009	0,0003	<0,001	0,142
C12:0	3,07	3,43	0,0145	0,0021	-0,0141	0,032	<0,001	0,632
C13:0	0,05	0,07	0,0006	-0,0015	-0,0006	0,0001	<0,001	0,280
C14:0	10,2	11,1	0,001	-0,0015	-0,0006	0,0001	<0,001	0,280
C15:0	0,87	1,01	0,0046	0,0012	0,0135	0,002	<0,001	0,077
C16:0	33,75	34,34	0,0890	0,1007	-0,0487	0,401	<0,001	0,107
C17:0	0,50	0,52	-0,0010	0,00005	0,0024	0,183	<0,001	0,238
C18:0	11,1	8,44	-0,0694	-0,1150*	-0,0352	<0,001	<0,001	0,056
C19:0	0,09	0,09	-0,0001	-0,0012	0,0051*	0,982	0,829	<0,001
C20:0	0,12	0,10	-0,0004	0,0003	-0,0006	<0,001	<0,001	0,576
C22:0	0,032	0,025	-0,00002	0,0021*	-0,00002	0,001	0,662	<0,001
C24:0	0,02	0,02	0,00001	0,0006	-0,0006*	0,083	0,670	0,001
Ácidos Gordos Ramificados								
i-C13:0	0,02	0,01	0,00004	0,0005	0,0003	0,200	0,212	0,224
a-C13:0	0,05	0,06	0,0006	0,0014*	0,0007	0,084	<0,001	0,041
i-C14:0	0,05	0,04	0,00005	0,0008	-0,0001	<0,001	0,407	0,321
i-C15:0	0,13	0,11	0,0003	0,0011	0,0010	<0,001	0,002	0,112

Quadro 9. (Continuação) Efeito da paridade (P\_M), dos dias em lactação (Dia) e da interação entre a ingestão e os diferentes tratamentos (Trat\*Ing) no perfil de ácidos gordos do leite.

	Paridade		Dia	Trat*Ing		Valor P		
	Primíparas	Multíparas		Controlo	NatOmega-3	P_M	Dia	Trat*Ing
a-C15:0	0,28	0,26	0,0008	0,0021	0,0016	0,053	<0,001	0,090
i-C16:0	0,15	0,11	-0,0001	0,0002	0,0005	<0,001	0,529	0,793
i-C17:0	0,25	0,25	0,0001	0,0004	0,0020	0,903	0,665	0,148
a-C17:0	0,32	0,30	-0,0003	0,0009	0,0015	0,168	0,069	0,262
i-C18:0	0,035	0,029	-0,0003	0,0018*	0,0008*	0,036	<0,001	0,006
<b>Ácidos Gordos Monoinsaturados <i>cis</i></b>								
C12:1c9	0,11	0,13	0,0005	-0,0005	0,0024	0,002	0,001	0,072
C14:1c9	0,56	0,83	0,0079	0,0070	0,0020	<0,001	<0,001	0,291
C16:1c7	0,16	0,18	-0,0002	0,0010	0,0011	0,001	0,052	0,239
C16:1c9	1,27	1,75	0,0028	0,0142	0,0052	<0,001	0,035	0,184
C17:1c9	0,18	0,23	-0,0008	0,0013	0,0021	0,0001	<0,001	0,178
C18:1c9	21,52	21,15	-0,0889	0,0163	0,0790	0,613	<0,001	0,525
C18:1c11	0,68	0,78	-0,0023	-0,0015	0,0027	0,005	<0,001	0,531
C18:1c12	0,28	0,26	-0,0013	-0,0012	0,0030	0,103	<0,001	0,075
C18:1c13	0,09	0,11	-0,0005	0,0005	0,0012	<0,001	<0,001	0,274
C18:1c15	0,09	0,11	-0,0001	-0,0027	0,0024	0,174	0,707	0,067
C18:1c16	0,02	0,02	-0,0001	0,0007*	-0,0004	0,793	0,034	0,009
C19:1c9/c11	0,02	0,02	0,00003	0,0006	0,0001	0,199	0,425	0,297
C20:1c9	0,07	0,06	0,0003	0,0005	0,0002	0,281	0,005	0,772
C20:1c11	0,05	0,05	-0,0002	-0,0001	0,0003	0,977	0,001	0,705
<b>Ácidos Gordos Monoinsaturados <i>trans</i></b>								
C18:1t6/t7/t8	0,26	0,29	-0,0006	-0,0044	0,0016	0,139	0,063	0,135
C18:1t9	0,23	0,24	0,00004	0,0009	0,0032*	0,287	0,795	0,031

Quadro 9. (Continuação) Efeito da paridade (P\_M), dos dias em lactação (Dia) e da interação entre a ingestão e os diferentes tratamentos (Trat\*Ing) no perfil de ácidos gordos do leite.

	Paridade		Dia	Trat*Ing		Valor P		
	Primíparas	Múltiparas		Controlo	NatOmega-3	P_M	Dia	Trat*Ing
C18:1t10	0,69	1,21	0,0033	-0,0205	0,0130	0,004	0,204	0,322
C18:1t11	0,55	0,33	-0,0041	-0,0055	-0,0024	<0,001	<0,001	0,499
C18:1t12	0,31	0,29	-0,0007	0,0010	0,0013	0,051	0,000	0,548
C18:1t13/t14	0,53	0,56	0,0011	0,0007	0,0059	0,142	0,022	0,201
C18:1t16/c14	0,25	0,20	-0,0008	-0,0004	0,0019	<0,001	<0,001	0,209
Ácidos Gordos Polinsaturados								
C18:2c9t13/c9t14/ciclo-17/t9t12	0,23	0,26	0,0004	0,0008	0,0011	0,053	0,130	0,654
C18:2t8c13/c9t15	0,08	0,09	0,0001	0,0014	0,0016*	0,008	0,173	0,039
C18:2c9t12	0,05	0,06	-0,00004	0,0021*	0,0013*	0,009	0,563	0,001
C18:2t9c12	0,02	0,03	-0,00001	-0,0008	-0,0011*	0,001	0,846	0,008
C18:2t11c15/t10c15	0,04	0,06	0,0001	-0,0019	0,0024*	0,199	0,798	0,022
C18:2n-6	2,04	1,98	-0,0040	-0,0021	0,0018	0,242	<0,001	0,892
C18:2c9c15	0,028	0,032	-0,0001	0,0006	0,0001	0,057	0,007	0,537
C18:2c12c15	0,02	0,01	-0,00002	0,0001	-0,0003	0,383	0,600	0,470
C18:3n-6	0,03	0,03	-0,00004	0,0007	-0,0002	0,804	0,423	0,244
C18:3n-3	0,25	0,23	0,0002	0,00002	0,0042*	<0,001	0,149	<0,001
CLA-c9t11	0,27	0,24	-0,0003	0,0033*	0,0029*	0,002	0,128	0,021
CLA-tt	0,02	0,03	0,0001	0,0004	0,0007	0,003	0,074	0,318
C20:2n-6	0,02	0,02	0,0001	0,0006	-0,0006*	0,383	0,151	0,007
C18:3c9t11c15/C20:3n-9	0,02	0,02	0,00002	-0,00002	-0,0009*	0,589	0,617	0,029
C20:3n-6	0,09	0,10	0,0001	0,0008	-0,0004	0,462	0,337	0,427
C20:3n-3	0,01	0,01	3.929E-7	-0,0001	-0,0006*	0,974	0,991	0,041
C20:4n-6	0,16	0,15	-0,0001	0,0001	-0,0006	0,188	<0,001	0,572

Quadro 9. (Continuação) Efeito da paridade (P\_M), dos dias em lactação (Dia) e da interação entre a ingestão e os diferentes tratamentos (Trat\*Ing) no perfil de ácidos gordos do leite.

	Paridade		Dia	Trat*Ing		Valor P		
	Primíparas	Múltiparas		Controlo	NatOmega-3	P_M	Dia	Trat*Ing
C20:5n-3	0,02	0,02	4.624E-6	0,0003	0,0002	0,303	0,905	0,735
C22:5n-3	0,04	0,03	-0,00002	0,0003	-0,0004	0,254	0,753	0,754
index desaturase								
C12:0/C12:1c9	0,03	0,04	-6.35E-6	-0,0002	0,0008*	0,036	0,877	0,008
C14:0/C14:1c9	0,05	0,07	0,0003	0,0006*	0,0004	<0,001	<0,001	0,038
C16:0/C16:1c9	0,04	0,05	-0,00004	0,0003	0,0003	<0,001	0,291	0,180
C17:0/C17:1c9	0,27	0,30	-0,0004	0,0016	0,0010	<0,001	0,022	0,441

\*efeito significativo

## DISCUSSÃO DE RESULTADOS

### 1. Produção e teor de gordura no leite

Analisando os resultados, observou-se que as multíparas apresentaram, em relação às primíparas, maior produção de leite e semelhante teor de gordura. É bem sabido que a produção de leite aumenta com o número de partos, até cerca da 6ª lactação, e que a maior diferença se observa entre as primíparas e as vacas na segunda lactação. Assim, a generalidade dos estudos, incluindo como exemplo o recentemente publicado por Van et al. (2020), confirmam que as primíparas têm produções de leite mais baixas, quando comparadas com vacas com dois ou mais partos. Quanto ao efeito da paridade no teor de gordura no leite, poderia ser expectável que os animais que produzem menos leite, como as primíparas, pudessem ter um leite mais concentrado. No entanto, a ausência de efeito da paridade no teor butíroso aqui observada, tem sido frequentemente reportada (Palmquist 1984; Stanton et al. 1997; Kelsey et al. 2003).

Em relação aos dias em lactação, afetaram significativamente a produção de leite, que atingiu o pico perto dos 60 dias (máximo aos 60,83 dias, calculado a partir da derivada da função), começando depois a decrescer (Figura 4), o que é confirmado pelo declive quadrático negativo obtido. No estudo de Van et al. (2020), o valor mais elevado para a produção de leite foi observado no intervalo entre os 51-99 dias em lactação, diminuindo a partir dos 100 dias em lactação.

Diversos estudos sobre o efeito da suplementação de gordura na produção de leite afirmam que a produção de leite geralmente aumenta quando se adiciona gordura às dietas (Gagliostro and Chilliard 1992) e, adicionalmente, que esta resposta à suplementação é superior em vacas no início da lactação face a vacas a meio da lactação (Palmquist 1984). No presente estudo, a ingestão dos suplementos não afetou significativamente a produção de leite, talvez pela quantidade de suplemento efetivamente ingerida pela maioria dos animais ter sido pequena.

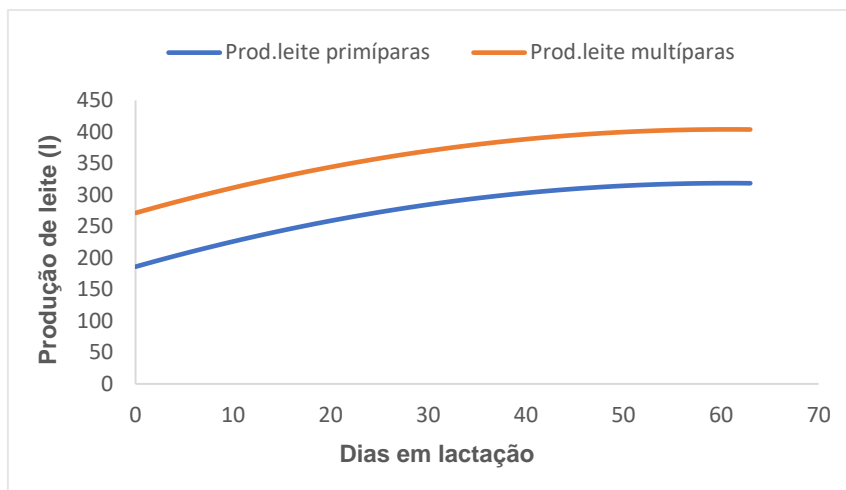


Figura 4. Representação gráfica da variação da produção de leite ao longo dos dias em lactação para as vacas primíparas e múltíparas. As respetivas retas das funções são  $y=186,38+4,36x-0,03584x^2$  para as primíparas e  $y=271,32+4,36x-0,03584x^2$  para as múltíparas; onde  $y$  – produção de leite em litros e  $x$  – dias em lactação.

Quanto à gordura do leite, foi significativamente afetada pelos dias em lactação, seguindo uma curva inversa à produção de leite, diminuindo linearmente 0,039 pontos percentuais por cada dia a mais de lactação que, no entanto, é mitigado por um declive quadrático positivo. Na figura 5 apresenta-se o gráfico obtido para a variação do teor de gordura com a ingestão dos dois suplementos. O teor de gordura do leite atingiu o seu valor mínimo aos 64,35 dias (calculado a partir da derivada da função), o que coincide, aproximadamente, com a altura em que se verificou o pico de lactação no gráfico anterior.

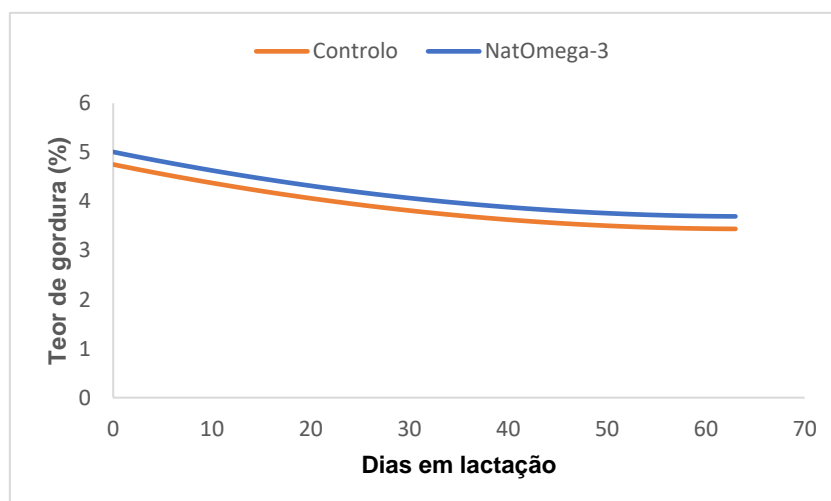


Figura 5. Representação gráfica da variação do teor de gordura com a ingestão do suplemento controlo e com a ingestão do suplemento NatOmega-3. As respetivas equações das funções são  $y=4,75-0,0408x+0,000634x^2$  para o controlo e  $y=5,01-0,0408x+0,000634x^2$  para o NatOmega-3; onde  $y$  – teor de gordura do leite (%) e  $x$  – dias em lactação.

Os animais entraram no estudo no período pós-parto, altura em que as vacas leiteiras se encontram normalmente em balanço energético negativo (BEN) e, por isso, podem mobilizar gordura das reservas corporais. Uma hipótese para explicar a diminuição da gordura do leite com os dias poderá estar relacionada com o BEN no início da lactação e, à medida que a lactação progride e o balanço energético melhora, o teor de gordura volta a aumentar ligeiramente (efeito quadrático positivo). Gross et al. (2011) estudaram o efeito do balanço energético do perfil de AG do leite em vacas leiteiras e obteve resultados semelhantes, verificando uma diminuição nos teores de gordura e proteína nas primeiras semanas (semana 1-6), com uma subida ligeira com o avanço da lactação e com o aumento da ingestão.

A ingestão dos suplementos não se traduziu num efeito significativo em relação à produção de leite, o que poderá ser explicado pelos suplementos serem iso-energéticos. Em relação à gordura do leite, verificou-se um acréscimo superior quando o tratamento administrado foi o suplemento NatOmega-3.

## **2. Composição em ácidos gordos do leite**

O estágio da lactação, juntamente com BEN, têm uma influência significativa na composição em ácidos gordos do leite (Kay et al. 2005). Neste ensaio, os AGS C10:0, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0 e, principalmente o C16:0, aumentaram as suas proporções ao longo da lactação, enquanto que os AGMI (em especial o C18:1c9) diminuíram para o mesmo período, resultado da melhoria do balanço energético. Estes resultados vão de encontro aos obtidos por Gross et al. (2011). Com o avanço da lactação, aumentam as proporções de ácidos gordos provenientes da síntese *de novo* na glândula mamária, uma vez que, deixa de haver uma inibição proveniente da mobilização adiposa (Palmquist et al. 1993) e a ingestão aumenta. Esta síntese *de novo* de ácidos gordos acontece na glândula mamária a partir de acetato produzido no rúmen. De facto, o efeito dos dias em lactação foi significativo para estes AG (ex: C10:0, C12:0, C14:0, C16:0), verificando-se um aumento na sua proporção. Verificou-se, no entanto, uma exceção para o C4:0, que sofreu uma diminuição ao longo do tempo, e que pode ser explicada pelo facto de este AG poder ter origem em duas vias metabólicas independentes (Palmquist et al. 1993). Aumentaram, também, as proporções de AG de origem microbiana, como o a-C13:0, C13:0, i-C15:0, a-C15:0, devido possivelmente ao aumento de ingestão ao longo do tempo que levou à prosperidade das bactérias no rúmen.

Durante a fase de BEN, o principal AGI nos adipócitos e libertado na lipólise é o C18:1c9, o que pode explicar o decréscimo observado na proporção deste AG à medida em que



umentam os dias em lactação. Adicionalmente, com o progresso da lactação observou-se, também, um decréscimo significativo na proporção do C18:0 e dos isómeros C18:1 *cis* e *trans*. O ácido linoleico sofreu igualmente um decréscimo na sua proporção, assim como, o C20:4n-6 proveniente deste. No entanto, apesar da proporção de ácido linoleico diminuir, os CLA-tt (soma dos CLA com duas ligações *trans*) aumentaram, o que sugere que parte destes CLA poderão ser fruto da biohidrogenação incompleta do AL.

Quanto à influência da paridade, Berry et al. (2006) concluiu que o balanço energético negativo foi mais prolongado em vacas primíparas do que em vacas múltíparas, no entanto, Friggens et al. (2007) verificou uma mobilização de reservas significativamente menor em primíparas do que em múltíparas, pelo que os resultados encontrados na literatura são algo inconclusivos.

A proporção de AGS de cadeia média (C9:0, C12:0, e C14:0) sintetizados de novo na glândula mamária foi inferior nas primíparas, enquanto, a proporção de C18:0 foi superior sugerindo que poderá, de facto, ter ocorrido uma maior mobilização das reservas corporais nas primíparas e conseqüente inibição da síntese de novo.

Observou-se, igualmente, uma proporção de isómeros intermédios C18:1 e C18:2 da biohidrogenação superior nas múltíparas, apesar da proporção de ácido linolénico ser superior nas primíparas. Algumas das diferenças observadas entre primíparas e múltíparas poderiam ser explicadas pela alteração das vias metabólicas de biohidrogenação. Estas alterações são geralmente motivadas pelo tipo dieta ingerida, mas como receberam a mesma, o motivo poderá passar pela maior quantidade de suplemento ingerido pelas primíparas quando comparada com as múltíparas.

Os AG sintetizados pela enzima delta-9 dessaturase (C12:1c9, C14:1c9, C16:1c9 e C17:1c9) apresentaram maiores proporções nas múltíparas do que nas primíparas. De facto, as primíparas apresentaram consistentemente menores índices da atividade da delta-9 dessaturase do que as múltíparas. Esta aparente menor atividade da delta-9 dessaturase nas primíparas poderia ser explicada pela maior ingestão do suplemento NatOmega-3 por parte das primíparas, uma vez que, dietas ricas em AGI diminuem a expressão desta enzima (Brock et al. 2006). Contudo, a ingestão de NatOmega-3 não apresentou associação consistente com os índices da delta-9 dessaturase.

Nas primíparas, as proporções de C18:1t11 e de CLA-c9t11 são mais significativas e poderão também ser explicadas pela maior ingestão de suplemento NatOmega-3. A maior proporção de AG *iso* (i-C14:0, i-C15:0, i-C16:0, i-C:18:0) nas primíparas poderá também estar relacionado com as maiores proporções de C18:1t11, CLA-c9t11 e outros intermediários da biohidrogenação já que estes ácidos têm sido associados às bactérias com atividade na biohidrogenação (Bauman et al. 2001). O efeito da paridade na

proporção de C18:0 foi superior nas vacas com apenas um parto, o que sugere uma inibição da delta-9 dessaturase na conversão de C18:0 em C18:1c9.

### **3. Efeito do tipo de suplemento**

A ingestão do suplemento de controlo e do suplemento NatOmega-3 teve efeitos apenas num número restrito de ácidos gordos (16 num total de 66 AG), possivelmente, devido à reduzida ingestão de ambos os suplementos por parte da maioria dos animais, chegando mesmo, em alguns casos, a ser nula para alguns animais em determinados períodos de tempo.

O C18:1t9 e os AGPI C18:2c9t15, C18:2c9t12, C18:3n-3 e CLAc9t11 aumentaram com a ingestão do suplemento NatOmega-3. O aumento na proporção destes AG é expectável, uma vez que, o suplemento é rico em ALN (40 g/100g de gordura bruta) e faz aumentar os produtos intermédios da sua biohidrogenação. No entanto, para o C19:0 verificou-se um aumento significativo com o NatOmega-3 o que não era de prever. Este aumento pode ser explicado pelo facto de, nos cromatogramas, o C19:0 eluir numa zona onde surgem vários intermédios da biohidrogenação tornando difícil a distinção entre os picos de cada AG.

#### **3.1. Eficácia do suplemento NatOmega-3**

O principal objetivo do tratamento NatOmega-3 foi avaliar a sua eficácia no aumento da proporção de ácido linolénico no leite. Assim, para o ALN observou-se um ligeiro, mas significativo ( $P < 0,001$ ), aumento com a ingestão do suplemento NatOmega-3. A análise efetuada para outros AGPI n-3, nomeadamente, o C20:3n-3, C20:5n-3 (EPA) e C22:5n-3 (DPA) não demonstrou efeitos significativos para nenhum deles. Para os animais do controlo, observou-se que a inclinação não diferiu de zero ( $P = 0,91$ ) pelo que a concentração de C18:3n-3 não foi afetada por este suplemento. Adicionalmente, as primíparas apresentam uma concentração deste AG ligeiramente superior às múltiparas (25 e 23%, respetivamente).

No quadro 9, verifica-se que por cada kg de NatOmega-3 ingerido, por semana, ocorreu uma subida de 0,0042 pontos percentuais de C18:3n-3 no leite. Nas primíparas, o nível base de C18:3n-3 foi de 0,25% do total de ácidos gordos, pelo que, se ingerissem 10 kg de NatOmega-3 por semana passaria a 0,29% ( $(0,0042 \cdot 10) + 0,25$ ) do total de AG o que apesar de não ser um grande aumento, é significativo.

Sabendo que o suplemento fornecido tinha 91% MS, 14,6% EE e 40% dos ácidos gordos era C18:3n-3, temos cerca de 53 g de ALN por kg de suplemento NatOmega-3. Posto isto, se os animais ingerissem a totalidade do suplemento (1200 g/d) teriam uma

ingestão de 64 g/d de ALN. Como a ingestão no modelo utilizado foi por semanas, para se ver o efeito da ingestão de 1 kg/dia multiplica-se por 7, isto é,  $0,0042 \times 7 = 0,0294$  kg/dia. Dividindo esses 0,0294 pelos 53 g de C18:3n-3 por kg de suplemento obtém-se um valor de 0,00055 pontos percentuais. As retas obtidas no modelo com estes dados apresentam as seguintes equações:  $Y=0,25+0,00055X$  para as primíparas e  $Y=0,23+0,00055X$  no caso das múltiparas. Tem-se, então, uma subida no leite de 0,00055 pontos percentuais por cada g de C18:3n-3 ingerida.

Comparando os resultados da utilização do suplemento NatOmega-3 com resultados obtidos com a utilização de semente de linho extrudido, observa-se que o aumento obtido com o NatOmega-3 foi inferior e pouco significativo. De facto, analisando a Figura 6, retirada de uma revisão realizada por Doreau e Ferlay (2015), o linho extrudido foi mais eficaz no aumento da concentração de C18:3n-3 no leite. No entanto, os valores de ingestão do suplemento de NatOmega-3 foram bastante inferiores (64 g/d nos animais que ingeriram a totalidade) face aos registados abaixo (200 a 800 g/d).

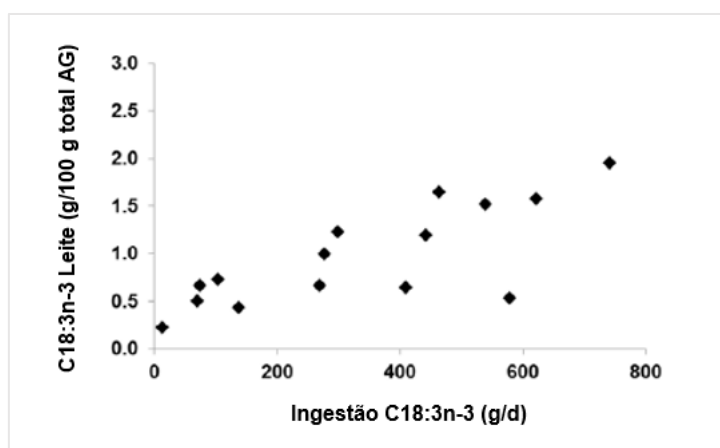


Figura 6. Efeito do aumento da ingestão de C18:3n-3 com sementes de linho no leite. Equação de regressão linear:  $y=0,0018x + 0,38$  ( $R^2=0,59$ ); Onde: y - proporção de C18:3n-3 (g/100 g dos AG totais) e x - ingestão de C18:3n-3 (g/d). [Adaptado de Doreau and Ferlay (2015)]

O aumento por cada g de C18:3n-3 ingerida, neste caso, foi de 0,0018 pontos percentuais o que é cerca de 3,3 vezes superior ao obtido com o NatOmega-3 (0,00055 pontos percentuais). Conclui-se então que, comparando com a semente de linho extrudido, o NatOmega-3 teve um menor grau de proteção da biohidrogenação. Apesar de se ter verificado um aumento com a utilização do NatOmega-3, esse aumento não tem relevância prática.

## CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A biohidrogenação dos ácidos gordos no rúmen afeta fortemente o perfil lipídico dos produtos provenientes de animais ruminantes. O principal objetivo da utilização de fontes de lípidos insaturados protegidas na dieta de bovinos leiteiros passa por contornar essa extensa biohidrogenação ruminal, especialmente dos AGPI ómega-3. Neste estudo, a utilização do suplemento com semente de linho protegida (NatOmega-3) provocou um ligeiro aumento na concentração de ácido linolénico, no entanto, face a outras tecnologias estudadas na literatura, esse aumento não provou ter relevância prática. Para além disso, não se detetou o efeito do suplemento nos restantes AGPI ómega-3, isto é, no EPA e no DHA, responsáveis por inúmeros efeitos benéficos ao nível da saúde humana.

Relativamente à tecnologia utilizada, a encapsulação em matriz lipídica de alto ponto de fusão, apresenta limitações como a baixa libertação e absorção de AG após a passagem no rúmen o que poderá explicar a reduzida transferência de C18:3n-3 para o leite. Adicionalmente, existem poucos estudos onde se utilizou esta tecnologia tendo a semente de linho como fonte lipídica e se avaliou a proteção em relação ao ácido linolénico. No entanto, quando comparada com outras tecnologias de proteção de lípidos, conclui-se que esta tecnologia não é a mais eficaz e que a utilização de formaldeídos ou cápsulas de gel de matriz proteica poderão ser tecnologias mais eficazes na proteção do C18:3n-3 e restantes AG n-3. A utilização de óleos vegetais como o óleo de soja ou linho (ricos em AGPI) poderão, também, ser fontes lipídicas com maior potencial de transferência para o leite.

Compreender o metabolismo lipídico dos ruminantes permite criar estratégias que alterem o perfil de ácidos gordos e, conseqüentemente, melhorem o valor nutricional do leite. Estudos realizados, ao longo dos anos, abordando temas como as diferentes vias possíveis de biohidrogenação, produtos intermédios obtidos, diversas tecnologias de proteção de lípidos e a adição de gordura nas dietas dos animais permitem compreender que há um enorme potencial de evolução nesta área. Porém, existem ainda vários pontos interessantes de estudo, nomeadamente, o impacto da suplementação lipídica na saúde e bem-estar dos animais, os custos económicos da suplementação para as explorações, as possíveis conseqüências do aumento do teor de gordura na qualidade/validade dos produtos animais ou a disposição por parte do consumidor para pagar um produto nutricionalmente mais interessante mas mais dispendioso, são apenas alguns exemplos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackman RG. 2002. The gas chromatograph in practical analyses of common and uncommon fatty acids for the 21st century. *Anal Chim Acta*. 465(1–2):175–192. doi:10.1016/S0003-2670(02)00098-3.
- Albuquerque T. 2009. Composição em ácidos gordos de batatas fritas de pacote comercializadas em Portugal e a sua importância na nutrição. [dissertação de mestrado]. Coimbra: Faculdade de Medicina - Universidade de Coimbra.
- Alves SP, Bessa RJB. 2014. The trans-10,cis-15 18:2: A missing intermediate of trans-10 shifted rumen biohydrogenation pathway? *Lipids*. 49(6):527–541. doi:10.1007/s11745-014-3897-4.
- Ander BP, Dupasquier CM, Prociuk MA, Pierce FACC FAHA GN. 2003. Polyunsaturated fatty acids and their effects on cardiovascular disease. *Experimental and clinical cardiology*. 8(4):164-172.
- Ashes JR, Vincent Welch PS, Gulati SK, Scott TW, Brown GH, Blakeley S. 1992. Manipulation of the Fatty Acid Composition of Milk by Feeding Protected Canola Seeds. *J Dairy Sci*. 75(4):1090–1096. doi:10.3168/jds.S0022-0302(92)77853-9.
- Bauman DE, Peterson BA, Corl BA, Baumgard LH, Perfield II JW. 2001. Update on conjugated linoleic acids (CLA). *Proc Cornell Nutr Conf*.(May 2014):170–178.
- Bauman DE, Griinari JM. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu Rev Nutr*. 23:203–227. doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408.
- Bauman DE, Perfield II JW, De Veth MJ, Lock AL. 2003. New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants. *Proc Cornell Nutr Conf*.(March):175–189.
- Beam TM, Jenkins TC, Moate PJ, Kohn RA, Palmquist DL. 2000. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *J Dairy Sci*. 83(11):2564–2573. doi:10.3168/jds.S0022-0302(00)75149-6.
- Belury MA. 1995. Conjugated Dienoic Linoleate: A Polyunsaturated Fatty Acid with Unique Chemoprotective Properties. *Nutr Rev*. 53(4):83–89. doi:10.1111/j.1753-4887.1995.tb01525.x.
- Bernal-Santos G, O'Donnell AM, Vicini JL, Hartnell GF, Bauman DE. 2010. Hot topic: Enhancing omega-3 fatty acids in milk fat of dairy cows by using stearidonic acid-enriched soybean oil from genetically modified soybeans. *J Dairy Sci*. 93(1):32–37. doi:10.3168/jds.2009-2711.
- Berry DP, Veerkamp RF, Dillon P. 2006. Phenotypic profiles for body weight, body condition score, energy intake, and energy balance across different parities and concentrate feeding levels. *Livest Sci*. 104(1–2):1–12. doi:10.1016/j.livsci.2006.02.012.
- Bessa RJB. 1999. Revalorização Nutricional das Gorduras dos Ruminantes. In: *Symposium Europeo Alimentación en el siglo XXI*. Bajadoz: Colégio Oficial de Veterinários de Bajadoz. p. 283–313.

- Bessa RJB, Santos-Silva J, Ribeiro JMR, Portugal A V. 2000. Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livest Prod Sci.* 63(3):201–211. doi:10.1016/S0301-6226(99)00117-7.
- Brock TJ, Browse J, Watts JL. 2006. Genetic regulation of unsaturated fatty acid composition in *C. elegans*. *PLoS Genet.* 2(7):0997–1005. doi:10.1371/journal.pgen.0020108.
- Buccioni A, Decandia M, Minieri S, Molle G, Cabiddu A. 2012. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. *Anim Feed Sci Technol.* 174(1–2):1–25. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.02.009.
- Candeias V, Nunes E, Morais C, Cabbral M, Silva PR. 2005. Princípios para uma alimentação saudável. Direção Geral da Saúde, editor. Lisboa.
- Carroll SM, DePeters EJ, Rosenberg M. 2006. Efficacy of a novel whey protein gel complex to increase the unsaturated fatty acid composition of bovine milk fat. *J Dairy Sci.* 89(2):640–650. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72128-2.
- Chilliard Y, Ferlay A, Mansbridge RM, Doreau M. 2000. Ruminant milk fat plasticity: Nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Anim Res.* 49(3):181–205. doi:10.1051/animres:2000117.
- Chilliard Y, Glasser F, Ferlay A, Bernard L, Rouel J, Doreau M. 2007. Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Eur J Lipid Sci Technol.* 109(8):828–855. doi:10.1002/ejlt.200700080.
- Chouinard PY, Girard V, Brisson GJ. 1998. Fatty acid profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturation. *J Dairy Sci.* 81(2):471–481. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75599-7.
- Christie WW. 2019. Lipids: Definitions, Classification and Nomenclature. [accessed 2020 Dec10]. [https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb\\_html/lipids/basics/Name/index.htm](https://www.lipidmaps.org/resources/lipidweb/lipidweb_html/lipids/basics/Name/index.htm).
- Connor WE. 2000. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 71(1 SUPPL.). doi:10.1093/ajcn/71.1.171s.
- Covington MB. 2004. Omega-3 Fatty Acids. *American family physician.* 70(1):133–140.
- Cuvelier C, Cabaraux JF, Dufrasne I, Hornick JL, Istasse L. 2004. Acides gras: Nomenclature et sources alimentaires. *Ann Med Vet.* 148(3):133–140.
- Dawson RMC, Hemington N. 1974. Digestion of grass lipids and pigments in the sheep rumen. *Br J Nutr.* 32(2):327–340. doi:10.1079/bjn19740086.
- Dawson RMC, Hemington N, Hazlewood GP. 1977. On the role of higher plant and microbial lipases in the ruminal hydrolysis of grass lipids. *Br J Nutr.* 38(2):225–232. doi:10.1079/bjn19770082.

- Dewhurst RJ, Shingfield KJ, Lee MRF, Scollan ND. 2006. Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems. *Anim Feed Sci Technol.* 131(3–4):168–206. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.04.016.
- Doreau M, Ferlay A. 2015. Linseed: A valuable feedstuff for ruminants. *OCL - Oilseeds fats.* 22(6). doi:10.1051/ocl/2015042.
- Doreau M, Troegeler-Meynadier A, Fievez V, Ferlay A. 2015. Fatty Acids. In: Watson RR, De Meester F, editors. *Handbook of lipids in human function.* San Diego, CA: AOCS Press. p. 521–542.
- Doreau M, Meynadier A, Fievez V, Ferlay A. 2016. Ruminant Metabolism of Fatty Acids: Modulation of Polyunsaturated, Conjugated, and Trans Fatty Acids in Meat and Milk. In: Watson RR, de Meester F, editors. *Handbook of lipids in human function: fatty acids.* San Diego, USA: Academic Press Inc. and AOC Press. p. 521–542.
- EFSA. 2009. Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to labelling reference intake values for n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *EFSA J.* 1176:1–11.
- EFSA. 2010. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J.* 8(3):1–107. doi:10.2903/j.efsa.2010.1461.
- Fahy E, Subramaniam S, Brown HA, Glass CK, Merrill AH, Murphy RC, Raetz CRH, Russell DW, Seyama Y, Shaw W, et al. 2005. A comprehensive classification system for lipids. *Eur J Lipid Sci Technol.* 107(5):337–364. doi:10.1002/ejlt.200405001.
- Fahy E, Subramaniam S, Murphy RC, Nishijima M, Raetz CRH, Shimizu T, Spener F, Van Meer G, Wakelam MJO, Dennis EA. 2009. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. *J Lipid Res.* 50(SUPPL.):9–14. doi:10.1194/jlr.R800095-JLR200.
- Ferlay A, Bernard L, Meynadier A, Malpuech-Brugère C. 2017. Production of trans and conjugated fatty acids in dairy ruminants and their putative effects on human health: A review. *Biochimie.* 141:107–120. doi:10.1016/j.biochi.2017.08.006.
- Friggens NC, Berg P, Theilgaard P, Korsgaard IR, Ingvarsen KL, Løvendahl P, Jensen J. 2007. Breed and parity effects on energy balance profiles through lactation: Evidence of genetically driven body energy change. *J Dairy Sci.* 90(11):5291–5305. doi:10.3168/jds.2007-0173.
- Fritsche J, Steinhart H. 1998. Analysis, occurrence, and physiological properties of trans fatty acids (TFA) with particular emphasis on conjugated linoleic acid isomers (CLA) – a review. *Lipid - Fett.* 100(6):190–210. doi:10.1002/(sici)1521-4133(199806)100:6<190::aid-lipi190>3.3.co;2-x.
- Gadeyne F, De Neve N, Vlaeminck B, Fievez V. 2017. State of the art in rumen lipid protection technologies and emerging interfacial protein cross-linking methods. *Eur J Lipid Sci Technol.* 119(5):1–22. doi:10.1002/ejlt.201600345.

- Gagliostro GA, Chilliard Y. 1992. Utilizacion de lipidos protegidos en la nutricion de vacas lecheras. I. Efectos sobre la produccion y la composicion de la leche, y sobre la ingestion de materia seca y energia. *Rev Argentina Prod Anim.* 12(1):1–15.
- Gawad RMA, Strabel M, Abo El-Nor SA, Kattab HM. 2015. Encapsulation Method to Protect Unsaturated Fatty Acids from Rumen Biohydrogenation In Vitro. *Jipbs.* 2(3):240–251.
- Givens I. 2009. Animal nutrition and lipids in animal products and their contribution to human intake and health. *Nutrients.* 1(1):71–82. doi:10.3390/nu1010071.
- Givens DI. 2010. Milk and meat in our diet: Good or bad for health? *Animal.* 4(12):1941–1952. doi:10.1017/S1751731110001503.
- Glatz JFC. 2015. Lipids and lipid binding proteins: A perfect match. *Prostaglandins Leukot Essent Fat Acids.* 93:45–49. doi:10.1016/j.plefa.2014.07.011.
- Griinari JM, Dwyer DA, Mcguire MA, Bauman DE, Palmquist DL, Nurmela KVV. 1998. Trans-Octadecenoic Acids and Milk Fat Depression in Lactating Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 81(5):1251–1261. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75686-3.
- Gross J, Van Dorland HA, Bruckmaier RM, Schwarz FJ. 2011. Milk fatty acid profile related to energy balance in dairy cows. *J Dairy Res.* 78(4):479–488. doi:10.1017/S0022029911000550.
- Gulati SK, Garg MR, Scott TW. 2005. Rumen protected protein and fat produced from oilseeds and/or meals by formaldehyde treatment; their role in ruminant production and product quality: A review. *Aust J Exp Agric.* 45(10):1189–1203. doi:10.1071/EA04131.
- Gulliver CE, Friend MA, King BJ, Clayton EH. 2012. The role of omega-3 polyunsaturated fatty acids in reproduction of sheep and cattle. *Anim Reprod Sci.* 131(1–2):9–22. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.02.002.
- Harfoot CG. 1981. Lipid metabolism in the rumen. In: Christie WW, editor. *Lipid Metabolism in ruminant animals.* 1st ed. Oxford, UK. p. 21–55.
- Harfoot CG, Hazlewood GP. 1997. Lipid Metabolism in the rumen. In: Hobson CG, Stewart CS, editors. *The Rumen Microbial Ecosystem.* London, UK. p. 382–426.
- Heguy JM, Juchem SO, DePeters EJ, Rosenberg M, Santos JEP, Taylor SJ. 2006. Whey protein gel composites of soybean and linseed oils as a dietary method to modify the unsaturated fatty acid composition of milk lipids. *Anim Feed Sci Technol.* 131(3–4):370–388. doi:10.1016/j.anifeedsci.2006.06.016.
- Heo W, Kim ET, Cho S Do, Kim JH, Kwon SM, Jeong HY, Ki KS, Yoon HB, Ahn YD, Lee SS, et al. 2016. The in vitro effects of nano-encapsulated conjugated linoleic acid on stability of conjugated linoleic acid and fermentation profiles in the Rumen. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 29(3):365–371. doi:10.5713/ajas.15.0626.
- Houseknecht KL, Heuvel JPV, Moya-Camarena SY, Portocarrero CP, Peck LW, Nickel KP, Belury MA. 1998. Dietary conjugated linoleic acid normalizes impaired glucose tolerance in the Zucker diabetic fatty fa/fa rat. *Biochem Biophys Res Commun.* 244(3):678–682. doi:10.1006/bbrc.1998.8303.



- Hulshof KFAM, Van Erp-Baart MA, Anttolainen M, Becker W, Church SM, Couet C, Hermann-Kunz E, Kesteloot H, Leth T, Martins I, et al. 1999. Intake of fatty acids in Western Europe with emphasis on trans fatty acids: The TRANSFAIR study. *Eur J Clin Nutr.* 53(2):143–157. doi:10.1038/sj.ejcn.1600692.
- Huws SA, Scott MB, Tweed JKS, Lee MRF. 2013. Fatty acid oxidation products ('green odour') released from perennial ryegrass following biotic and abiotic stress, potentially have antimicrobial properties against the rumen microbiota resulting in decreased biohydrogenation. *J Appl Microbiol.* 115(5):1081–1090. doi:10.1111/jam.12314.
- Jenkins TC. 1993. Lipid Metabolism in the Rumen. *J Dairy Sci.* 76(12):3851–3863. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77727-9.
- Jenkins TC, Bridges WC. 2007. Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle. *Eur J Lipid Sci Technol.* 109(8):778–789. doi:10.1002/ejlt.200700022.
- Jenkins TC, Wallace RJ, Moate PJ, Mosley EE. 2008. Board-Invited Review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J Anim Sci.* 86(2):397–412. doi:10.2527/jas.2007-0588.
- Jensen RG. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *J Dairy Sci.* 85(2):295–350. doi:10.3168/jds.S0022-0302(02)74079-4.
- Jones D. 1972. Reactions of aldehydes with unsaturated fatty acids during histological fixation. *Histochem J.* 4(5):421–465. doi:10.1007/BF01012533.
- Kay JK, Weber WJ, Moore CE, Bauman DE, Hansen LB, Chester-Jones H, Crooker BA, Baumgard LH. 2005. Effects of week of lactation and genetic selection for milk yield on milk fatty acid composition in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 88(11):3886–3893. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)73074-5.
- Kelsey JA, Corl BA, Collier RJ, Bauman DE. 2003. The effect of breed, parity, and stage of lactation on conjugated linoleic acid (CLA) in milk fat from dairy cows. *J Dairy Sci.* 86(8):2588–2597. doi:10.3168/jds.S0022-0302(03)73854-5.
- Kemp P, Lander DJ. 1984. Hydrogenation in vitro of alpha-linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. *Journal of General Microbiology.* 130(3):527–533.
- Kemp P, Lander DJ, Gunstone FD. 1984. The hydrogenation of some cis - and trans - octadecenoic acids to stearic acid by a rumen *Fusocillus* sp. . *Br J Nutr.* 52(1):165–170. doi:10.1079/bjn19840083.
- Keys A. 1997. Coronary heart disease in seven countries. 1970. *Nutrition.* 13(3):3–4.
- Kliem KE, Givens DI. 2011. Dairy products in the food chain: their impact on health. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2:21–36. doi:10.1146/annurev-food-022510-133734.
- Kromhout D, Bloemberg B, Feskens E, Menotti A, Nissinen A. 2000. Saturated fat, vitamin C and smoking predict long-term population all-cause mortality rates in the Seven Countries Study. *Int J Epidemiol.* 29(2):260–265. doi:10.1093/ije/29.2.260.

- Lawson RE, Moss AR, Ian Givens D. 2001. The role of dairy products in supplying conjugated linoleic acid to man's diet: a review. *Nutr Res Rev.* 14(1):153–172. doi:10.1079/095442201108729178.
- Legrand P, Rioux V. 2010. The complex and important cellular and metabolic functions of saturated fatty acids. *Lipids.* 45(10):941–946. doi:10.1007/s11745-010-3444-x.
- Lobb K, Chow CK. 2007. *Fatty Acids in Foods and their Health Implications.* 3rd ed. Chow Ching Kuang, editor. CRC Press.
- Lock AL, Bauman DE. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids.* 39(12):1197–1206. doi:10.1007/s11745-004-1348-6.
- Lock AL, Shingfield KJ. 2004. Optimising Milk Composition. *BSAP Occas Publ.* 29:107–188. doi:10.1017/s0263967x00040076.
- Lourenço M, Ramos-Morales E, Wallace RJ. 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal.* 4(7):1008–1023. doi:10.1017/S175173111000042X.
- Lundy FP, Block E, Bridges WC, Bertrand JA, Jenkins TC. 2004. Ruminal biohydrogenation in Holstein cows fed soybean fatty acids as amides or calcium salts. *J Dairy Sci.* 87(4):1038–1046. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73249-X.
- Maia MR, Chaudhary LC, Bestwick CS, Richardson AJ, McKain N, Larson TR, Graham IA, Wallace RJ. 2010. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. *BMC Microbiol.* 10:8–10. doi:10.1186/1471-2180-10-52.
- Martin JC, Valeille K. 2002. Conjugated linoleic acids: All the same or to everyone its own function? *Reprod Nutr Dev.* 42(6):525–536. doi:10.1051/rnd:2002042.
- Moghadasian MH, Shahidi F. 2016. Fatty Acids. *Int Encycl Public Heal.* 3(Cvd):114–122. doi:10.1016/B978-0-12-803678-5.00157-0.
- Moreira NX, Curi R, Mancini Filho J. 2002. Ácidos Graxos: Uma Revisão. *Nutr Rev Soc Bras Aliment Nutr.* 24:105–123.
- Nam IS, Garnsworthy PC. 2007. Biohydrogenation pathways for linoleic and linolenic acids by *Orpinomyces rumen fungus*. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 20(11):1694–1698. doi:10.5713/ajas.2007.1694.
- Van Nevel CJ, Demeyer DI. 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents in vitro. *Reprod Nutr Dev.* 36(1):53–63. doi:10.1051/rnd:19960105.
- O'Donnell JA. 1993. Future of Milk Fat Modification by Production or Processing: Integration of Nutrition, Food Science, and Animal Science. *J Dairy Sci.* 76(6):1797–1801. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77511-6.
- Palmquist DL. 1984. Use of fats in diets for lactating dairy cows donald. *Fat Anim Nutr.*:357–381. US patent 4642 317 A.

Palmquist DL, Denise Beaulieu A, Barbano DM. 1993. Feed and Animal Factors Influencing Milk Fat Composition. *J Dairy Sci.* 76(6):1753–1771. doi:10.3168/jds.S0022-0302(93)77508-6.

Palmquist DL, Jenkins TC. 1987. Process for feeding ruminant animals and composition for use therein. (19). US patent 4642 317 A.

Palmquist DL, Lock AL, Shingfield KJ, Bauman DE. 2005. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid in Ruminants and Humans. *Adv Food Nutr Res.* 50:179–217. doi:10.1016/S1043-4526(05)50006-8.

Pariza MW. 2004. Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *Am J Clin Nutr.* 79(6 Suppl):1132–1136. doi:10.1093/ajcn/79.6.1132s.

Perfield JW, Lock AL, Pfeiffer AM, Bauman DE. 2004. Effects of amide-protected and lipid-encapsulated Conjugated Linoleic Acid (CLA) supplements on milk fat synthesis. *J Dairy Sci.* 87(9):3010–3016. doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73432-3.

Petit H V., Twagiramungu H. 2006. Conception rate and reproductive function of dairy cows fed different fat sources. *Theriogenology.* 66(5):1316–1324. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.04.029.

Rego OA, Alves SP, Antunes LMS, Rosa HJD, Alfaia CFM, Prates JAM, Cabrita ARJ, Fonseca AJM, Bessa RJB. 2009. Rumen biohydrogenation-derived fatty acids in milk fat from grazing dairy cows supplemented with rapeseed, sunflower, or linseed oils. *J Dairy Sci.* 92(9):4530–4540. doi:10.3168/jds.2009-2060.

Regulamento de execução (UE) nº 2018/183 da Comissão de 7 de fevereiro de 2018. *Jornal Oficial da Comissão Europeia.*

Richardson T. 1992. Method to produce unsaturated milk fat and meat from ruminant animals. (19). US patent 5143 737 A.

Roche HM. 1999. Unsaturated fatty acids. In: *Proceedings of the Nutrition Society.* Vol. 58. CAB International. p. 397–401.

Rosenberg M, Depeters EJ. 2010. Method and compositions for preparing and delivering rumen protected lipids, other nutrients and medicaments. 2(12). US patent 7700 127 B2.

Scott TW, Hills GDL. 1975. Feed supplements for ruminants comprising lipid encapsulated with protein-aldehyde reaction product. (19). US patent 3925 560 A.

Simopoulos AP. 2002. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 56(8):365–379. doi:10.1016/S0753-3322(02)00253-6.

Smith A. 2000. *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology.* 2nd ed. Oxford, UK: Oxford University Press.

Smith SB, Lunt DK, Chung KY, Choi CB, Tume RK, Zembayashi M. 2006. Adiposity, fatty acid composition, and delta-9 desaturase activity during growth in beef cattle. *Anim Sci J.* 77(5):478–486. doi:10.1111/j.1740-0929.2006.00375.x.

Spector AA. 1999. Essentiality of fatty acids. *Lipids.* 34(1). doi:10.1007/bf02562220.

- Stanton C, Lawless F, Kjellmer G, Harrington D, Devery R, Connolly JF, Murphy J. 1997. Dietary influences on bovine milk cis-9,trans-11-conjugated linoleic acid content. *J Food Sci.* 62(5):1083–1086. doi:10.1111/j.1365-2621.1997.tb15043.x.
- Staples CR, Burke JM, Thatcher WW. 1998. Influence of Supplemental Fats on Reproductive Tissues and Performance of Lactating Cows. *J Dairy Sci.* 81(3):856–871. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75644-9.
- Strohmaier GK, Frederiksen ED, Luchini ND. 2005. Rumen bypass calcium salts of C18:1 and C18:2 fatty acids. 2(12):5–8. US patent 6924 382 B2.
- Sukhija PS, Palmquist DL. 1990. Dissociation of Calcium Soaps of Long-Chain Fatty Acids in Rumen Fluid. *J Dairy Sci.* 73(7):1784–1787. doi:10.3168/jds.S0022-0302(90)78858-3.
- Theurer ML, Block E, Sanchez WK, McGuire MA. 2009. Calcium salts of polyunsaturated fatty acids deliver more essential fatty acids to the lactating dairy cow. *J Dairy Sci.* 92(5):2051–2056. doi:10.3168/jds.2008-1276.
- Van QCD, Knapp E, Hornick JL, Dufresne I. 2020. Influence of days in milk and parity on milk and blood fatty acid concentrations, blood metabolites and hormones in early lactation holstein cows. *Animals.* 10(11):1–13. doi:10.3390/ani10112081.
- Vanvolsem T. 2010 Feb 11. Feed for milk-producing animals, method for the production thereof, use thereof and milk produced. US patent EP 2330 922 B1.
- De Veth MJ, Gulati SK, Luchini ND, Bauman DE. 2005. Comparison of calcium salts and formaldehyde-protected conjugated linoleic acid in inducing milk fat depression. *J Dairy Sci.* 88(5):1685–1693. doi:10.3168/jds.S0022-0302(05)72840-X.
- Viladomiu M, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J. 2016. Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *Eur J Pharmacol.* 785:87–95. doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.095.
- van Vuuren AM, van Wikselaar PG, van Riel JW, Klop A, Bastiaans JAHP. 2010. Persistency of the effect of long-term administration of a whey protein gel composite of soybean and linseed oils on performance and milk fatty acid composition of dairy cows. *Livest Sci.* 129(1–3):213–222. doi:10.1016/j.livsci.2010.02.002.
- Watkins PA. 2012. Fatty acids: Metabolism. *Encycl Hum Nutr.* 2–4:220–230. doi:10.1016/B978-0-12-375083-9.00103-3.
- Whigham LD, Cook ME, Atkinson RL. 2000. Conjugated linoleic acid: Implications for human health. *Pharmacol Res.* 42(6):503–510. doi:10.1006/phrs.2000.0735.
- WHO | Fats and fatty acids in human nutrition. 2010. Rome: World Health Organization.
- Williams AG, Coleman GS. 1992. *The Rumen Protozoa.* Springer-Verlag New York.
- Williams CM. 2000. Dietary fatty acids and human health. *Anim Res.* 49(3):165–180. doi:10.1051/animres:2000116.
- Woods VB, Fearon AM. 2009. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and

their transfer into meat, milk and eggs: A review. *Livest Sci.* 126(1–3):1–20. doi:10.1016/j.livsci.2009.07.002.

Wu SHW, Papas A. 1997. Rumen-stable delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 28(3):323–334. doi:10.1016/S0169-409X(97)00087-2.

Yashodhara BM, Umakanth S, Pappachan JM, Bhat SK, Kamath R, Choo BH. 2009. Omega-3 fatty acids: A comprehensive review of their role in health and disease. *Postgrad Med J.* 85(1000):84–90. doi:10.1136/pgmj.2008.073338.

## ANEXOS

### Anexo 1. Procedimento Transesterificação de gordura de leite

(adaptado de Molquentin and Precht, 2000)

Ultima alteração:

Método: LSPA-L1.1

24-02-2019

#### Reagentes e soluções:

- Metanol;
- Hidróxido de potássio (KOH);
- n-Hexano;
- Preparar solução KOH 2M em metanol, por **adição muito lenta e com agitação** do metanol ao KOH (reação exotérmica);

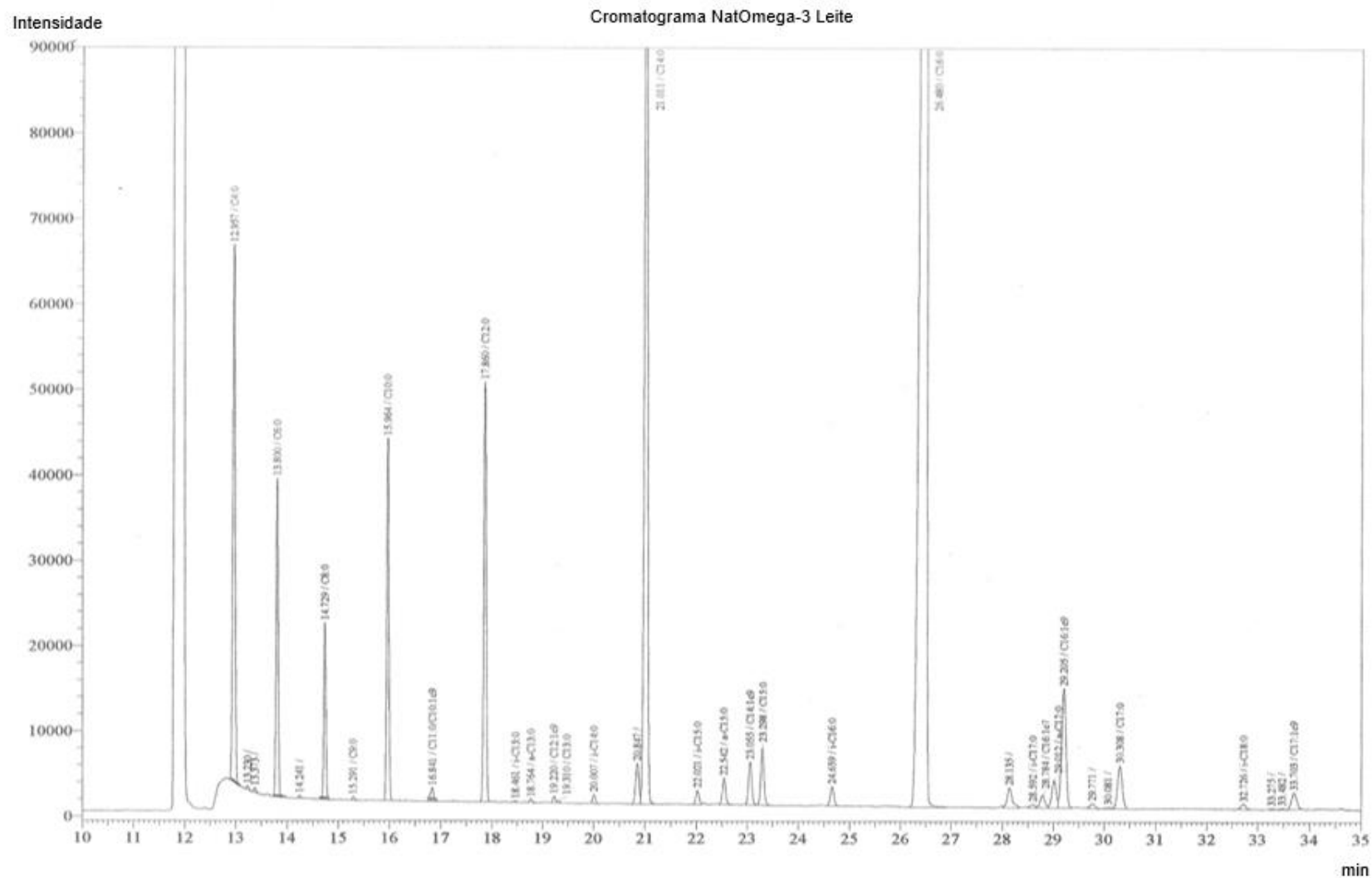
Nota: Método para análise de ácidos gordos em percentagem do total de ácidos gordos em amostras de gordura de leite que não tenham sido armazenadas por longos períodos (i.e. que não estejam sujeitas a hidrólise).

#### Procedimento:

1. Pesar 50 mg de gordura de leite para um tubo de ensaio;
2. Adicionar 2 mL de n-hexano (ou apenas 1 mL, no caso de se adicionar também 1 mL de padrão interno) e 0,2 mL de solução KOH em metanol;
3. Agitar em vortex durante 1 hora;
4. Adicionar com uma pipeta de pasteur 2 gotas de ácido acético glacial e agitar em vortex (10 seg);
5. Adicionar aproximadamente 0,5 g de sulfato de sódio anidro;
6. Agitar em vortex durante 30 seg e centrifugar durante 5 min;
7. Retirar a fase de n-hexano com uma pipeta de pasteur (com bastante cuidado para não ressuspender o sulfato de sódio) para um vial de GC;
8. Fechar bem o vial para não ocorrer evaporação dos ácidos gordos de cadeia curta e guardar no congelador.

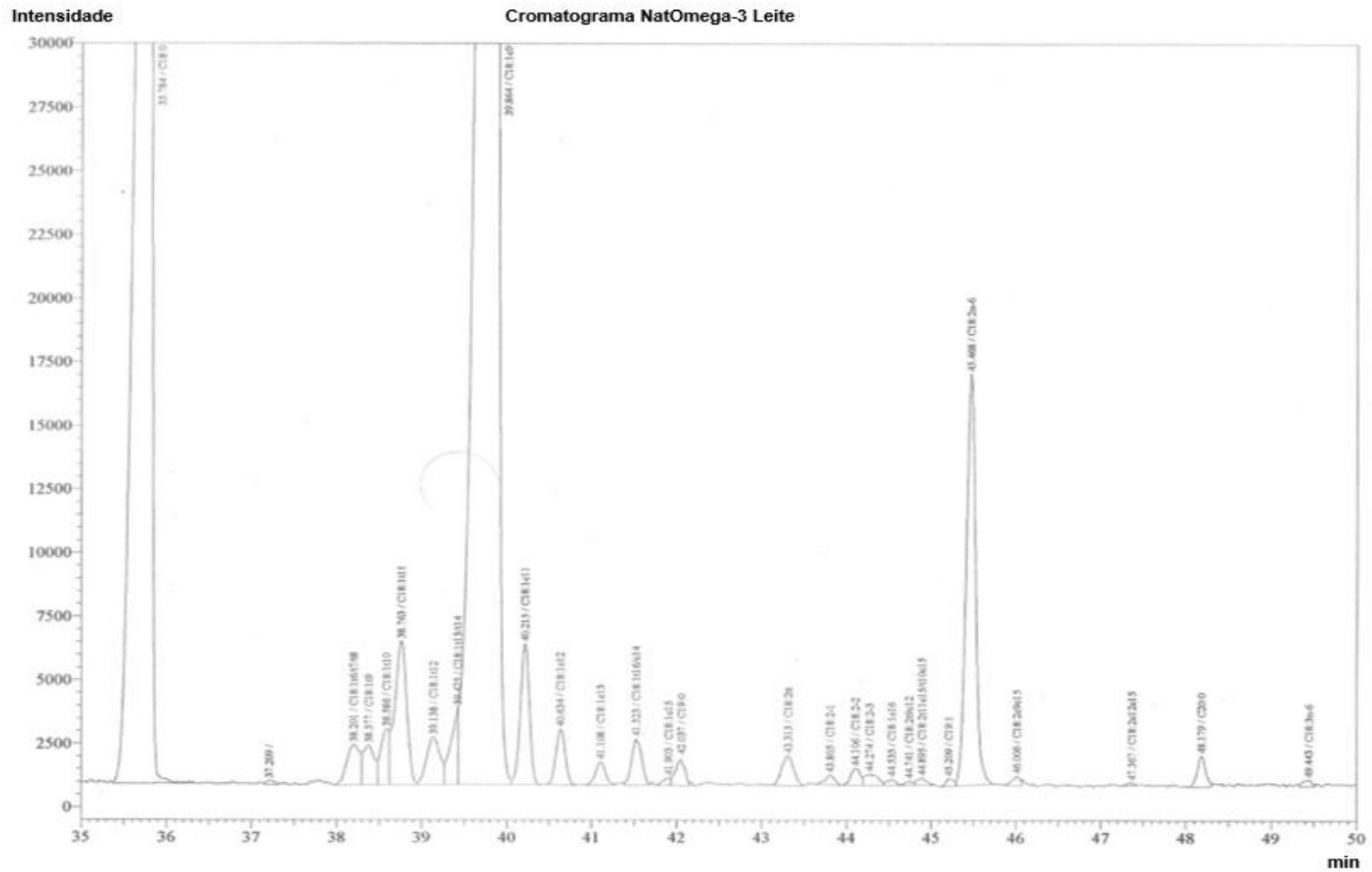


## Anexo 2. Exemplo de um cromatograma





## Anexo 2. Exemplo de um cromatograma (continuação)



## Anexo 2. Exemplo de um cromatograma (continuação)

