



UNIVERSIDADE DE LISBOA



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**Metabolismo lipídico como determinante da
qualidade nutricional da carne e leite de
ruminantes**

RUI JOSÉ BRANQUINHO DE BESSA

Lisboa

abril de 2023

Sumário pormenorizado da lição a que se refere
a alínea c) do artigo 5 do Decreto Lei nº
239/2007, de 19 de junho, para obtenção do
título de Agregado pela Universidade de Lisboa

Metabolismo lipídico como determinante da qualidade nutricional da carne e leite de ruminantes

Índice

1. Objetivos	2
2. O ecossistema ruminal	2
3. Visão integrada do metabolismo dos lípidos no rúmen	3
3.1. Ingestão de lípidos	3
3.2. Lipólise e o destino do ácidos gordos não esterificados	4
3.3. Biohidrogenação dos ácidos gordos insaturados	4
3.4. Lípidos microbianos	5
4. Metabolismo lipídico pós-ruminal e transferência para os produtos	6
4.1. Absorção de lípidos no intestino delgado	6
4.2. Deposição dos ácidos gordos nos tecidos	7
4.3. Transferência para o leite	7
4.4. Rastreabilidade e diagnóstico	8
5. Modulação do metabolismo lipídico ruminal	8
5.1. Aumento do fluxo de PUFA para o abomaso – inibição da biohidrogenação	8
5.2. Modulação da completude da Biohidrogenação	9
5.3. Modulação do tipo de intermediários	10
6. A biohidrogenação alterada “o trans-10 shift”	10
6.1. Vias metabólicas e microrganismos responsáveis	10
6.2. Fatores predisponentes do t10-shift	11
6.3. Implicações na produção e na qualidade dos produtos	12
6.4. Prevenção do t10-shift – Presente e perspectivas futuras	12
7. Considerações finais	13
8. Referencias Recomendadas	13

1. Objetivos

Pretende-se que os estudantes sejam expostos a uma visão integrada do metabolismo lipídico em ruminantes e como o aprofundamento do seu estudo tem potencial de gerar conceitos e ferramentas aplicáveis na produção e na qualidade nutricional do leite e carne e consequentemente na saúde dos consumidores. Partindo de uma visão integrada e geral para o detalhe de alguns aspetos críticos e limitantes ainda mal compreendidos, pretende-se expor os estudantes ao processo científico que está na base da geração do conhecimento e das subseqüentes potenciais aplicações práticas. Este exemplo em concreto, foi escolhido por permitir interligar desenvolvimentos recentes provenientes das atividades de investigação em curso no CIISA/FMV com aplicações práticas na produção e qualidade da carne e leite de ruminantes, realçando assim a importância da investigação científica no ensino veterinário. Assim, esta pretende ser uma lição com características próprias de um seminário no mestrado integrado em medicina veterinária ou de um segundo ciclo em zootecnia onde se assume que os alunos tenham as noções básicas de bioquímica e nutrição.

2. O ecossistema ruminal

Os ruminantes são animais altamente diferenciados no que respeita às suas adaptações digestivas e metabólicas. De facto, os ruminantes levaram a um extremo a simbiose com a comunidade microbiana anaeróbia indispensável a todos os herbívoros para extrair energia das armazenada nas parede vegetais, já que todo o alimento ingerido é em primeira mão oferecido à comunidade microbiana simbiótica. Este tipo de fermentação digestiva pré-gástrica não é exclusiva dos ruminantes, mas a escala e diferenciação que assume, é. O estomago dos ruminantes apresenta-se dividido em compartimentos gástricos que incluem uma extensa câmara de fermentação, o retículo-rúmen, um crivo e concentrador, o omaso, e finalmente a indispensável digestão ácida gástrica que ocorre no abomaso. No retículo-rúmen, são estabelecidas as condições ótimas para a instalação de um dos ecossistemas microbianos anaeróbios mais densos e complexos que se conhece. As condições asseguradas pelo hospedeiro incluem o fornecimento regular de alimentos, o tamponamento e humedecimento contínuo do meio, a ação mecânica de mistura e agitação por via da motilidade ruminal, e diversos mecanismos eficientes de remoção dos produtos finais, como os gases (eructação), e ácidos gordos voláteis (AGV) e amónia (absorção e diluição). O fluxo constante de conteúdo ruminal para o omaso permite manter a sustentabilidade do ecossistema ruminal, que assim pode manter uma população sempre em crescimento, fornecendo ao hospedeiro uma fonte contínua de matéria orgânica, de alta digestibilidade, e muito rica em proteínas, lípidos e vitaminas - a biomassa microbiana. Sendo este ecossistema microbiano anaeróbio, muitos dos produtos finais fermentativos (como os AGV) podem, depois de absorvidos, ser oxidados pelo metabolismo aeróbio dos hospedeiros, constituindo a principal fonte energética dos ruminantes. Por outro lado, uma das consequências da anaerobiose para os microrganismos é o baixo rendimento em ATP das reações fermentativas e a necessidade constante de regenerarem os cofatores NADH, NADPH e FADH, libertando-se dos H⁺ gerados, de modo a poderem prosseguir a atividade fermentativa. O problema do escoamento do excesso de H⁺ é

resolvido com a assistência de uma comunidade de arqueas especialistas em formar metano (CH₄).

A atividade mais nobre que se desenvolve neste ecossistema é a degradação dos hidratos de carbono estruturais das paredes celulares vegetais (vulgo “fibra”). Os microrganismos ruminais colonizam os tecidos vegetais previamente hidratados e lacerados pela mastigação e ruminação, formando biofilmes onde se concentram as potentes enzimas fibrolíticas. Nos animais alimentados de forma mais intensiva, a disponibilidade no rúmen de amido e outros hidratos de carbono facilmente fermentescíveis aumenta, alterando os equilíbrios microbianos com predomínio da micropopulação amilolítica sobre a fibrolítica. Em rigor, a complexidade e plasticidade e redundância funcional da micropopulação ruminal é tal que quaisquer modificações, mesmo que ligeiras, da dieta, do nível de ingestão, do comportamento alimentar, da regulação fisiológica do hospedeiro (i.e. motilidade ruminal, salivação), tem potencial de alterar os equilíbrios microbianos prevalentes no rúmen. Estas alterações traduzem-se em diferenças no metabolismo lipídico ruminal e que podem ser acompanhadas pela monitorização dos produtos formados e depositados nos tecidos ou transferidos para o leite. Consequentemente, o ecossistema ruminal poderá determinar de forma favorável ou desfavorável a composição lipídica dos produtos derivados dos ruminantes, como a carne e o leite. Assim, irão rever-se as principais características do metabolismo lipídico ruminal e as potenciais estratégias para o modular por forma a melhorar a qualidade nutricional das gorduras edíveis dos ruminantes.

3. Visão integrada do metabolismo dos lípidos no rúmen

3.1 Ingestão de lípidos

Os lípidos dos alimentos, são na sua maioria galactolípidos, triacilgliceróis (TAG) e fosfolípidos (PL), onde estão esterificados ácidos gordos predominantemente insaturados. Os galactolípidos e PL são lípidos estruturais das membranas vegetais e predominam nas folhas das forragens e pastagens, enquanto que os TAG são na maioria lípidos de reserva e presentes nas sementes e frutos dos vegetais. As dietas convencionais apresentam geralmente teores de ácidos gordos entre 10 a 40 g/kg matéria seca (MS) consoante a proporção e tipo de forragens incluídas. Contudo, já há décadas que as dietas de ruminantes de alta produção incluem óleos, gorduras, sabões cálcicos ou ingredientes com conteúdo com elevado teor em lípidos que podem elevar a ingestão de lípidos nas dietas até 50 a 70 g/kg MS. O enriquecimento das dietas em lípidos permite aumentar a densidade energéticas das dietas, mas há medida que se aumenta o nível de inclusão de lípidos na dieta dos ruminantes, aumentam-se as probabilidades de ocorrerem reduções na digestibilidade da fibra e reduções de ingestão voluntária. Isto, juntamente com o elevado custo relativo dos suplementos lipídicos, limita na prática, o nível de inclusão de lípidos na dieta.

3.2 Lipólise e o destino dos ácidos gordos não esterificados libertados

Os lípidos alimentares são e rapidamente hidrolisados no rúmen (lipólise) por ação de lípases de origem vegetal e microbiana. A lipólise é em geral muito completa e rápida, não se encontrando intermediários como mono- e di-acilgliceróis ou liso-fosfolípidos em quantidades relevantes. Não obstante, sabe-se que fatores como o tipo de lípido, acessibilidade dos lípidos à ação das enzimas lipolíticas, pH do rúmen e notavelmente a presença do enzima polifenol oxidase nalgumas forragens (por exemplo no trevo branco) afetam a lipólise no rúmen. Estima-se que 85 a 95% dos lípidos não protegidos ingeridos são rapidamente hidrolisados nas primeiras 1 a 3 horas.

Os ácidos gordos libertados durante as reações lipolíticas são geralmente insaturados e dependendo da sua estrutura e das condições ruminais (pH, concentrações de cálcio e magnésio, tipo e quantidade de partículas) poderão ser hidrogenados, saponificados, emulsionados ou adsorvidos nas partículas alimentares e nos biofilmes que as colonizam, ou mesmo incorporados na biomassa microbiana.

Ao contrário dos AGV, os ácidos gordos de cadeia longa libertados tendem a persistir no ecossistema ruminal até fluir para o omaso, já que não são fermentáveis pelas bactérias ruminais anaeróbias, nem são absorvíveis pela mucosa ruminal. Além do mais, a baixa densidade dos ácidos gordos, e em particular as emulsões espumosas que estes promovem no rúmen não favorecem o seu trânsito no rúmen. Assim as concentrações de ácidos gordos no conteúdo ruminal atingem com facilidade cerca de 10% a 15% da MS nos animais alimentados com dietas com 4 a 6 % MS de ácidos gordos.

No líquido ruminal os ácidos gordos apresentam-se num equilíbrio entre formas ionizadas (R-COO-) e protonadas (R-COOH) cuja proporção varia com o pH do meio e a constante de dissociação (pKa) de cada composto. Na forma ionizada os ácidos gordos associam-se a aniões e catiões presentes no rúmen formando sais, designados por sabões. Como o pH ruminal pode variar entre 5,5 e 7,0, a proporção de ácidos gordos livres que se encontram protonados ou saponificados também é variável. Na sua forma saponificada os ácidos gordos não estão disponíveis para ser biohidrogenados nem para se adsorver às membranas microbianas, apresentando-se assim menos reativos. A presença de elevadas concentrações de ácidos gordos não esterificados têm um forte impacto no ecossistema ruminal, como será abordado mais à frente.

3.3 Biohidrogenação dos ácidos gordos insaturados

Apesar da fermentação dos ácidos gordos de cadeia longa não ser viável nas condições de anaerobiose e elevadas taxas de passagem prevalentes no rúmen, observa-se no entanto um extenso metabolismo dos ácidos gordos insaturados não esterificados, que incluem reações de isomerização das duplas ligações com mudança de geometria (e.g. *cis* em *trans*) e configuração (posição das duplas ligações na cadeia carbonada), para além de reduções, hidratações e formação de substituintes oxo. Este diverso conjunto de reações conduzido pela microbiota ruminal sobre os ácidos gordos insaturados não esterificados, é designado como biohidrogenação ruminal, e ocorre maioritariamente nas partículas vegetais colonizadas por microrganismos. Na sua forma mais simples a biohidrogenação dos ácidos gordos insaturados inicia-se com uma isomerização, formando um intermediário conjugado, seguindo-se passos redutivos

(hidrogenação) sequenciais até se formar um ácido gordo totalmente saturado. Na verdade, muitos ácidos gordos não chegam a formar o ácido gordo totalmente saturado e são só isomerizados e/ou incompletamente hidrogenados, gerando-se uma grande diversidade de intermediários da biohidrogenação, a maioria dos quais com duplas ligações *trans*. Assim no caso dos ruminantes, os ácidos gordos provenientes da dieta que atingem o intestino delgado, são ácidos gordos *trans* ou saturados e encontram-se maioritariamente sob a forma livre.

A biohidrogenação dos ácidos gordos insaturados que ocorre no rúmen é um processo fundamentalmente bacteriano e supostamente limitado às chamadas bactérias biohidrogenadoras. Muitas bactérias têm vindo a ser identificadas com capacidade de isomerizar e hidrogenar os ácidos gordos insaturados, por exemplo algumas estirpes de *Butyrivibrios*, *Ruminococcus*, *Eggerthella*, *Borrelia*, *Propionibacterium*, *Treponema*, *Bacteroides*, *Megasphaera*, *Clostridium* e *Lactobacilus*. Contudo, apenas muito poucas estirpes cultivadas (todas filogeneticamente relacionadas com género *Butyrivibro*) são capazes de hidrogenar os ácidos gordos insaturados completamente até ácido esteárico (18:0). As bactérias conhecidas com capacidade relevante de biohidrogenação ruminal foram inicialmente classificadas em dois grandes grupos. O Grupo A, mais numeroso, constituído por bactérias capazes de hidrogenar incompletamente o ácido linoleico (18:2n-6) e linolénico (18:3n-3), produzindo apenas isómeros 18:1, e o Grupo B, muito mais restrito, capaz de hidrogenar os ácidos C18 insaturados completamente até 18:0. Estas classificações em dois grupos tem vindo a ser refinada considerando quer a relações filogenética baseadas na sequenciação do gene 16S rRNA quer com base em características fenotípicas, em particular a sensibilidade ao efeito tóxico (inibidor do crescimento) do 18:2n-6, do mecanismo pelo qual formam butirato na sua atividade fermentativa, e dos produtos originados na biohidrogenação deste ácido. No entanto, muitos dos intermediários da biohidrogenação encontrados no rúmen e nas gorduras dos ruminantes não se enquadram nas vias de biohidrogenação das bactérias biohidrogenantes que se conhecem, e que foram estabelecidas *in vitro*, sobretudo com culturas puras. Além do mais, a abundancia de dados de microbioma que vêm sendo produzidos sugerem fortemente que outras bactérias ainda não cultivadas possam desempenhar um papel relevante no processo da biohidrogenação ruminal dos ácidos gordos polinsaturados (PUFA).

3.4 Lípidos microbianos

Para além das modificações que a microbiota ruminal introduz nos ácidos gordos provenientes da dieta, existe uma intensa atividade lipogénica no rúmen inerente ao metabolismo e crescimento microbiano, que se traduz na ocorrência de uma grande diversidade de lípidos microbianos.

Os microrganismos ruminais sintetizam maioritariamente ácidos gordos saturados com cadeias carbonadas de 15, 16, 17 e 18 átomos, gerando tanto ácidos gordos de cadeia par ou impar e de cadeia linear ou ramificada, consoante os *primers* utilizados. Havendo abundancia de ácidos gordos pré-formados no rúmen, os microrganismos podem incorporá-los nos seus lípidos microbianos ou armazená-los como ácidos gordos livres em inclusões citoplasmáticas. No rúmen não há síntese de novo de PUFA, mas existe alguma capacidade de sintetizar ácidos gordos monoinsaturados, em particular o *cis*-11 18:1.

A síntese lipídica microbiana é favorecida em ambiente com forte pressão redutora presente no rúmen e em ruminantes alimentados com dietas não suplementadas e em que o fluxo de lípidos para o abomaso seja superior à ingestão de lípidos na dieta. A quantidade de lípidos microbianos sintetizados no rúmen é estimada em 9 g/kg de MS ingerida contribuindo assim para 30 a 40% dos lípidos que fluem para o duodeno.

Os lípidos estruturais dos microrganismos ruminais, muitos deles peculiares e característicos de determinados géneros microbianos, atingem também o intestino delgado onde são hidrolisados e absorvidos, ficando disponíveis para deposição nos tecidos ou transferência para o leite, contribuindo assim para o complexo perfil de ácidos gordos das gorduras dos ruminantes.

4. Metabolismo lipídico pós-ruminal e transferência para os produtos

A visão integrada do metabolismo lipídico no rúmen que foi apresentada anteriormente é importante para se perceber os desafios que se enfrenta quando se pretende a melhorar a composição em ácidos gordos da carne e leite dos ruminantes. O que se entende por um perfil melhorado de ácidos gordos do leite ou carne tem variado, mas na generalidade dos casos envolve o enriquecimento em PUFA e intermediários da biohidrogenação com reconhecido efeito benéfico à saúde humana, como o ácido ruménico (*cis-9,trans-11-18:2*, CLA) e o ácido vacénico (*trans-11 18:1*), com redução da generalidade dos restantes ácidos gordos *trans* e dos ácidos gordos saturados.

4.1 Absorção de lípidos no intestino delgado

Devido ao metabolismo dos lípidos no rúmen, os lípidos disponíveis para absorção no intestino delgado são notavelmente distintos dos lípidos presentes nas dietas dos animais. Assim, os lípidos que atingem o duodeno são constituídos com cerca de: i) 55 a 65% de ácidos gordos livres, na sua maioria saturados ou intermediários da biohidrogenação contendo duplas ligações *trans*; ii) 30 a 40 % de lípidos microbianos incluindo plasmalogénios, éter lípidos e outros lípidos estruturais que contêm uma abundância de ácidos gordos saturados de cadeia ímpar; e iii) 5 a 15% de lípidos diretamente provenientes dos alimentos.

O 18:2n-6 e o 18:3n-3, que na maioria das situações constituem os principais ácidos gordos das dietas dos ruminantes, representam apenas uma pequena proporção (menos que 3%) dos ácidos gordos que atingem o duodeno.

Após o processo digestivo intestinal, com emulsão e ação lipolítica, os ácidos gordos são absorvidos nos enterócitos na mucosa intestinal, reesterificados em TAG e incorporados nos quilomicrons. É nesta forma que são transportados pela via linfática até à veia porta e fígado antes da sua redistribuição sistémica. Como adaptação à baixa absorção de PUFA, estes são preferencialmente esterificados em ésteres de colesterol e PL, e redistribuídos de forma criteriosa pelos tecidos. Logo ainda nos enterócitos, parte do ácido 18:0 absorvido, é transformado em ácido oleico (*cis-9 18:1*) por ação do enzima esteroil CoA dessaturase (SCD) ou delta-9 dessaturase.

4.2 Deposição dos ácidos gordos nos tecidos

Apesar da diversidade em intermediários da biohidrogenação, e ácidos gordos ímpares e/ou ramificados originados no rúmen, e que são absorvidos, transportados e incorporados nos tecidos, a sua concentração nos tecidos é diluída e condicionada pela lipogénese endógena. De facto, a maioria dos ácidos gordos depositados nos tecidos, encontra-se geralmente sob a forma de TAG sintetizados endogenamente a partir do acetado ou glucose através de vias de lipogénese, e são maioritariamente os ácidos gordos 16:0 e *cis*-9 18:1. Os ácidos gordos de origem alimentar e ruminal ficam tanto mais diluídos quanto maior for a intensidade da lipogénese e quanto menor for a sua absorção. Por regra, o principal ácido gordo absorvido no intestino é o produto final das vias de biohidrogenação, ou seja o 18:0, que por sua vez, é extensamente dessaturado em *cis*-9 18:1 nos tecidos. No entanto, ao aumentar a ingestão de lípidos, a absorção e disponibilidade metabólica de ácidos gordos pré-formados também aumenta, o que reduz a síntese de novo de ácidos gordos.

Estes “*drives*” (i.e. intensidade da lipogénese; atividade da SCD; disponibilidade metabólica de AG preformados) são particularmente evidentes quando se interpreta a composição em ácidos gordos do tecido adiposo. Contudo, em tecidos em que os lípidos membranares predominam, como o músculo, estes fatores são ainda sujeitos aos fortes mecanismos regulatórios que determinam a composição de ácidos gordos dos PL. É nos PL que se concentram preferencialmente os PUFA, enquanto que a maioria dos intermediários da biohidrogenação são preferencialmente incorporados nos TAG. Os PUFA de cadeia muito longa com 20 ou 22 átomos de carbonos podem ser sintetizados a partir dos 18:2n-6 e 18:3n-3, mas estes últimos são sempre de origem alimentar.

Os tecidos, e notavelmente o músculo, apresentam uma concentração de lípidos membranares relativamente constante, no entanto quando se observa o aumento de gordura no músculo estes derivam essencialmente da deposição de TAG.

4.3 Transferência para o leite

A transferência de ácidos gordos provenientes da absorção intestinal segue igualmente os *drives* descritos acima, mas com algumas particularidades relevantes e que introduzem uma maior complexidade interpretativa. A lipogénese endógena e seu efeito diluidor é obtido através de vias que geram uma diversidade de ácidos gordos de cadeia curta e média com cadeias carbonadas entre 4 e 16 átomos carbonos. O 16:0 presente no leite é cerca de 50% de síntese endógena nas células do epitélio alveolar mamário e os restantes 50% são pré-formados e disponibilizados por via sanguínea. Os ácidos gordos de cadeia C18 presentes no leite são pré-formados e provenientes da circulação sanguínea, sendo que se observa uma alta atividade da SCD na glândula mamária. O outro nível de complexidade presente é que os ácidos gordos pré-formados que chegam por via sanguínea podem ter duas origens distintas. Assim parte dos ácidos gordos são provenientes da absorção intestinal e parte provenientes da mobilização das reservas corporais. Estes últimos são preponderantes nas fase inicial da lactação onde os animais se encontram em balanço energético negativo. Os ácidos gordos proveniente das

reservas foram em grande parte determinados pelas condições alimentares prevalentes na fase em que os animais estavam a constituir as reservas.

Por outro lado, a gordura do leite é constituída em 99% por TAG, pelo que, na prática, se pode desprezar a contribuição dos lípidos polares para efeitos da interpretação da sua composição em ácidos gordos. Isto sem prejuízo de se reconhecer a relevância biológica de alguns destes lípidos polares do leite.

4.4 Rastreabilidade e diagnóstico

O metabolismo microbiano ruminal é assim determinante para o perfil de ácidos gordos que atinge o duodeno e fica disponível para absorção. Este perfil, mesmo que mitigado pelo metabolismo do hospedeiro, irá refletir-se no perfil de ácidos gordos dos tecidos do hospedeiro e do leite. A extrema complexidade e adaptabilidade do ecossistema microbiano ruminal e a consequente diversidade biológica e metabólica vai gerar também uma grande diversidade de produtos e intermediários lipídicos que no seu conjunto formam padrões complexos, mesmo que o ponto de partida sejam dietas com perfis de ácidos gordos simples e monótonos.

Sendo estes complexos padrões de ácidos gordos gerados de forma distinta pelas condições prevalentes no rúmen, em certas circunstâncias têm todo o potencial teórico para serem utilizados para monitorizar o funcionamento ruminal e tentar aferir quais os principais fatores que podem ter condicionado o ambiente ruminal. Assim, tem-se trabalhado no pressuposto de que havendo competência analítica suficiente, é possível deter e reconhecer nos tecidos e no leite com algum detalhe toda a complexidade de ácidos gordos formados no rúmen. Esta abordagem permite “ler” o rúmen olhando para o leite, sangue, carne ou mesmo as fezes. O potencial de aplicações práticas na produção e clínica é vasto e óbvio. Assim, no campo da nutrição esta abordagem tem vindo a ser explorada para estimar o fornecimento de proteína microbiana para o hospedeiro e a produção de AGV no rúmen e diagnosticar a acidose ruminal sub-aguda. Outra área de aplicação é a utilização dos padrões de ácidos gordos nos produtos como método de discriminação do sistema alimentar utilizado e aferir conformidade com os cadernos de especificações dos produtos diferenciados.

5. Modulação do metabolismo lipídico ruminal

Só depois de entendidos os aspetos gerais sobre o metabolismo lipídico do rúmen é possível explorar as abordagens para o manipular de forma a melhorar a saúde animal ou a qualidade nutricional da carne e do leite. Para tal é possível sistematizar as abordagens consoante o principal objetivo pretendido como será apresentado nas próximas alíneas.

5.1 Aumento do fluxo de PUFA para o abomaso – inibição da biohidrogenação

Em geral cerca de 83% do 18:2n-6 e 88% do 18:3n-3 da dieta desaparecem durante a sua passagem pelo rúmen, sendo convertidos em intermediários da biohidrogenação ou em 18:0.

Curiosamente se aumentarmos a ingestão de PUFA a biohidrogenação aparente (i.e. desaparecimento dos PUFA no rúmen) tende a aumentar. Assim, a inibição da biohidrogenação poderá ser uma forma de aumentar a concentração de PUFA que chega ao duodeno e permitir a sua absorção. Este tem sido um objetivo perseguido desde que ficou bem estabelecida a existência da biohidrogenação ruminal, nos anos 60 do século XX. De facto, desde cedo se percebeu que o aumento da disponibilidade metabólica de PUFA permitia enriquecer o leite e carne com PUFA, e mais recentemente ficou também evidente que se poderia melhorar a fertilidade e modular a resposta imunitária.

Dado a natureza extensa e generalizada da biohidrogenação no rúmen a sua inibição completa é irrealista. As estratégias seguidas para impedir que os PUFA de origem alimentar possam ser hidrogenados tem passado maioritariamente pela tentativa de prevenir o contacto físico com a micropopulação ruminal através de técnicas de protecção. Estas técnicas podem passar pelo encapsulamento dos lípidos ou ácidos gordos em diversas matrizes, ou por redução da sua solubilidade de modo a minimizar a exposição dos PUFA à acção microbiana. Existem na literatura resultados muito impressionantes, obtidos nos anos 70 do século XX, com encapsulações de óleo em caseína tratada com formaldeído, mas que foram perdendo importância à medida que se substituiu a caseína por bagaços de oleaginosas e se reduziu a quantidade de formaldeído utilizada. Outras estratégias de encapsulamento têm vindo a ser testadas e introduzidas no mercado, mas aparentemente nenhuma com protecções consistentemente demonstradas na prática. Alguns compostos secundários das plantas como os taninos têm mostrado propriedades inibidoras da biohidrogenação, mas os resultados são demasiado inconsistentes.

Outras potenciais estratégias tiram partido do facto de que para a biohidrogenação ocorrer os ácidos gordos necessitam de ter o grupo carboxílico livre. Especificamente, esta estratégia passa por reduzir a concentração de PUFA livres, fornecendo-os na forma esterificada na dieta prevenindo assim a sua lipólise no rúmen, ou alternativamente fornecendo os PUFA já em forma saponificada ou esterificados em amidas. A inibição da hidrólise dos lípidos no rúmen, é em si em desafio tão grande como a inibição da biohidrogenação. No entanto, sabe-se que o baixo pH ruminal reduz a lipólise, e também que outras actividades metabólicas como a actividade fibrolítica, pode ser inibida pelo enzima polifenol oxidase presente com elevada actividade em algumas forragens, como já referido anteriormente.

5.2 Modulação da completude da Biohidrogenação

Em condições normais de funcionamento ruminal apenas cerca de 60% dos ácidos gordos insaturados (UFA) de cadeia C18 que são biohidrogenados são recuperados na forma de 18:0, sendo os restantes 40% recuperados como intermediários da BH, na sua maioria *trans*-octadecenóicos (*trans*-18:1). A completude da biohidrogenação (i.e. proporção de C18-UFA biohidrogenados que são recuperados como 18:0) pode ser determinada directamente pela condução de balanços ruminais de ácidos gordos ou indirectamente pelo enriquecimento em 18:0 entre a dieta e o conteúdo ruminal ou abomasal e, apesar de ser geralmente 60%, pode variar entre 15% a 90%.

Assim, se o objetivo for aumentar o rendimento em intermediários da biohidrogenação ruminal, como o *t11-18:1* e o *c9,t11-18:2* (com conhecidas propriedades benéficas à saúde humana), existe a possibilidade de intervir no sistema. Neste caso interessa aumentar a quantidade de UFA que são submetidos ao processo de biohidrogenação, e assegurar que esta não prossiga até à sua completude de forma a aumentar o rendimento em intermediários desejáveis. A inibição dos últimos passos da biohidrogenação é facilmente atingida aumentando a concentração de UFA no rúmen, e em particular a concentração de PUFA de cadeia muito longa, como o EPA (ácido eicosapentaenóico) e DHA (ácido docosahexaenóico) de origem predominante marinha. Além disso, condições de baixo pH no rúmen, elevadas concentrações de taninos e potencialmente outras fontes que induzam stress no ecossistema ruminal, tendem a inibir o último passo da biohidrogenação e consequentemente aumentar a concentração de *trans-18:1*.

Por outro lado, se a opção for reduzir a acumulação de ácidos gordos *trans*, pode ser desejado aumentar a completude da biohidrogenação. Os fatores que aumentam a completude da biohidrogenação são menos conhecidos, mas hipoteticamente serão os que promovem uma maior estabilidade no ecossistema ruminal. Em todo caso, deve-se limitar a ingestão de PUFA, dada a estreita relação entre o aumento de ingestão de PUFA e redução da completude da biohidrogenação.

5.3 Modulação do tipo de intermediários

A obtenção de biohidrogenações incompletas de modo a promover o enriquecimento do leite e da carne com os intermediários da biohidrogenação pode ser contraproducente se o tipo de intermediários formados não for o desejado. Na maioria das situações o principal intermediário formado no rúmen é o *t11-18:1*, sendo que depois de absorvido pode ser convertido em *c9,t11-18:2* por ação da enzima SCD. Contudo, em animais produzidos intensivamente e alimentados com dietas pobres em fibra é frequente ocorrer uma alteração nas vias de biohidrogenação em que o principal intermediário passa a ser o *t10-18:1*. Esta situação, designa-se por “*t10-shift*”, e apesar de estar fortemente associada ao síndrome de depressão da gordura de leite (“síndrome do leite magro”) em ruminantes e afetar a qualidade nutricional dos produtos dos ruminantes, é ainda muito pouco compreendida. O grupo de investigação em que me incluo tem vindo a desenvolver trabalhos para tentar aumentar a compreensão sobre o *t10-shift* e de que forma é possível mitigar a sua ocorrência, o que nos fornece a oportunidade para aprofundar este assunto nas secções seguintes.

6. A biohidrogenação alterada - “*trans-10 shift*”

6.1 Vias metabólicas e microrganismos responsáveis

A razão entre o *t10-18:1* e o *t11-18:1* (*t10/t11R*) nos conteúdos digestivos ou nos tecidos é utilizada para objetivar a ocorrência do *t10-shift*. Em condições normais o *t11-18:1* predomina de forma muito clara, de modo que geralmente se observa $t10/t11R < 0,5$. A ocorrência do *t10-shift* é assumida quando o *t10-18:1* passa a ser o principal intermediário da biohidrogenação em

substituição do $t_{11-18:1}$, observando-se $t_{10}/t_{11R} > 1$, e em situações extremas esta razão pode ser superior a 20 ou 30.

As vias metabólicas da biohidrogenação normal dos C18 UFA, caracterizada pela acumulação de $t_{11-18:1}$ como intermediário, foram estabelecidas nas décadas de 60 e 70 do século XX, e por analogia as vias da biohidrogenação alterada foram postuladas por Dale Bauman no final do século e têm vindo desde então a ser confirmadas. Outras vias alternativas, encontradas noutros ambientes, têm vindo a ser propostas, e existe ainda um debate sobre qual a importância relativa de cada uma delas. Apesar de haver demonstração de vias metabólicas que partindo dos $18:3n-3$, $18:2n-6$ e $18:1n-9$ geram $t_{10-18:1}$, aparentemente a principal via metabólica será a que utiliza o $18:2n-6$ como substrato. É também claro que a ocorrência do t_{10} -shift está frequentemente associada à ocorrência de biohidrogenações incompletas resultando em exuberantes acumulações de $t_{10-18:1}$ e pouco rendimento em $18:0$ (ou seja, baixa completude).

É notável que apesar da exuberância da ocorrência do t_{10} -shift em muito animais, ainda pouco ou nada se sabe sobre os microrganismos responsáveis por estas vias ou mesmo se são os mesmos microrganismos responsáveis pelas vias de biohidrogenação normal, mas que alteram estas vias face a determinados fatores. Dos microrganismos com ocorrência ruminal com atividade biohidrogenante caracterizada, apenas um, ou talvez dois, manifestam de forma sistemática a formação dos intermediários previstos nas vias de biohidrogenação alteradas. Além do mais não tem sido possível correlacionar a sua ocorrência com a acumulação de $t_{10-18:1}$ no rúmen. Estudos com técnicas não cultiváveis, como a sequenciação do gene do 16S-RNA, têm vindo a encontrar associações entre as concentrações de $t_{10-18:1}$ (ou t_{10}/t_{11R}) com OTU mal caracterizadas, mas em geral pertencentes às famílias *Eubacteriaceae*, *Muribaculaceae* e *Lachnospiraceae*.

6.2 Fatores predisponentes do t_{10} -shift

É claro que a ocorrência do t_{10} -shift está associada à produção intensiva em ruminantes com uso de dietas ricas em concentrados e pobres em fibras, em particular, se suplementadas com PUFA. Dietas com elevada concentração de amidos e/ou hidratos de carbono altamente fermentescíveis e suplementadas com PUFA claramente predispõem à sua ocorrência. A presença de elevadas concentrações de UFA e de amido, não são contudo, indispensáveis já que foi possível induzir o t_{10} -shift com dietas pobres em UFA e amido. Aparentemente, o pH ruminal será o fator mais determinante, e assim tudo o que predisponha a baixo pH ruminal parece favorecer a ocorrência do t_{10} -shift, apesar de a presença de amido e PUFA exacerbar a ocorrência do t_{10} -shift. Nós propomos que o t_{10} -shift poderá ser considerado mais uma alteração do vasto e irregular conjunto de alterações associados ao fornecimento de dietas ricas em concentrado a ruminantes, que de uma forma mais estrita inclui a acidose ruminal, mas que de forma mais lata se pode designar como *High-Concentrate Syndrome*.

Uma característica notável do t_{10} -shift é que a sua ocorrência pode variar grandemente entre animais sujeitos aos mesmos estímulos indutores. Assim, os ruminantes alimentados com dietas ricas em concentrado diferem grandemente na intensidade com que induzem o t_{10} -shift, havendo animais altamente suscetíveis e outros claramente resistentes. Não se percebe o que

determina esta variabilidade individual, mas a sua existência demonstra claramente as interações entre a genética do hospedeiro e o microbioma e metabolismo ruminal.

6.3 Implicações na produção e na qualidade dos produtos

A ocorrência do t_{10} -shift em ruminantes não parece afetar os indicadores produtivos quantitativos, com a notável exceção da redução do teor e rendimento em gordura do leite. A clara associação do t_{10} -shift com a clássica depressão da gordura de leite observada em vacas leiteiras alimentadas com dietas deficientes em fibra efetiva, foi estabelecida no final dos anos 90 do sec. XX, e tem sido intensamente estudada desde então. Já nos ruminantes destinados à produção de carne, e devido à ausência de efeitos negativos no crescimento e características da carcaça o estudo da ocorrência do t_{10} -shift tem sido muito menos intenso. Contudo, o impacto na qualidade nutricional da carne é muito relevante. Ao contrário do $t_{11-18:1}$, que pode ser convertido em $c_{9,t_{11-18:2}}$, o $t_{10-18:1}$ tem efeitos deletérios na saúde humana. Como a ocorrência do t_{10} -shift está associado a biohidrogenações incompletas, não é invulgar encontrar peças de carne com níveis de $t_{10-18:1}$ que permitem ingestões de ácidos trans superiores aos limites máximos recomendados (de salientar que as recomendações são, para já, limitadas aos ácidos gordos *trans* de origem industrial). Ironicamente, se não se conseguir prevenir a ocorrência do t_{10} -shift, as estratégias delineadas para enriquecer a carne com CLA podem resultar em carnes enriquecidas em $t_{10-18:1}$, logo com um perfil em ácidos gordos *trans* mais semelhante aos das gorduras parcialmente hidrogenadas industrialmente.

6.4 Prevenção do t_{10} -shift – Presente e perspectivas futuras

A ocorrência do t_{10} -shift pode ser totalmente evitada utilizando pastoreio ou dietas constituídas exclusivamente por forragens, contudo este tipo de dietas não é compatível como os níveis de produtividade praticado nos sistemas produtivos atuais. Para tal, será necessário, compreender melhor a biologia do t_{10} -shift para poder desenvolver estratégias que minimizem a sua ocorrência nos sistemas intensivos. O problema é ainda mais complicado se se quiser tirar partido das vantagens da utilização de dietas enriquecidas em PUFA, como estratégia para melhorar a qualidade nutricional dos produtos; a redução da produção de metano ruminal; ou a modulação da reprodução e imunidade. O nosso grupo de investigação tem explorado os efeitos de diversas estratégias nutricionais que possam mitigar a ocorrência do t_{10} -shift utilizando sempre dietas suplementadas com óleos vegetais ricos em PUFA. Assim, tem-se testado a utilização de dietas com diferentes níveis de amido/cereais e fibra/forragem, e diferentes tipos de amidos e de fibra, assim como a utilização de moduladores da biohidrogenação, como os taninos. Os resultados têm sido algo variáveis entre ensaios e prejudicados pela grande variabilidade individual, mas permitiram obter bons resultados com dietas completas com 35 a 50% de forragem.

Outra abordagem consiste em compreender melhor a grande variabilidade individual quanto à suscetibilidade à ocorrência do t_{10} -shift. Encontra-se em curso um projeto (GENE2RUMEN financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia) que permitirá realizar o estudo de

associação genómica (GWAS) necessário para permitir a identificação de marcadores genéticos que possibilitem classificar os animais em suscetíveis ou resistentes ao t10-shift. Se estes esforços forem bem sucedidos, será possível refinar os ensaios sobre os fatores nutricionais que determinam a ocorrência do t10-shift, e permitirá a utilização de marcadores de resistência ao t10-shift na seleção de animais destinados a ser terminados intensivamente nos confinamentos.

7. Considerações finais

Nesta lição foi apresentado o conhecimento geral sobre o metabolismo lipídico em ruminantes. No entanto, dada a sua complexidade, é claro que a total compreensão e controlo do metabolismo lipídico em ruminantes é ainda um desafio e que ainda existem muitas perguntas sem resposta. Dado o seu impacto na produção e saúde animal, e também na saúde dos humanos pelo consumo dos produtos derivados dos ruminantes, a investigação do metabolismo dos lípidos em ruminantes continua a ser um tema que requer atenção com novas investigações e novos desafios pela frente.

8. Referencias recomendadas

Inclui-se literatura de suporte para permitir o aprofundamento e contextualização dos conceitos invocados.

8.1. Literatura recomendada sobre funcionamento geral do ecossistema *ruminal* e *fisiologia digestiva dos ruminantes*.

Czerkawski, J. W. (1986). *An introduction to rumen studies*. Oxford, UK: Pergamon Press Ltd.

Hobson, P. N., & Stewart, C. S. (1997). *The Rumen Microbial Ecosystem*. London: Chapman & Hall.

Hungate, R. E. (1966). *The rumen and its microbes*. New York: Academic Press.

Preston, T. R., & Leng, R. A. (1987). *Matching ruminant production systems with available resources in the tropics and sub-tropics*. Armidale, Australia: Penambul Books.

Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional Ecology of the Ruminant*. Ithaca, N.Y., USA: Comstock Publishing Associates.

8.2. Literatura recomendada especificamente sobre o metabolismo lipídico no *rumen*

Bessa, R. J. B., Santos-Silva, J., Ribeiro, J. M. R., & Portugal, A. V. (2000). Reticulo-rumen biohydrogenation and the enrichment of ruminant edible products with linoleic acid conjugated isomers. *Livestock Production Science*, 63(3), 201-211. doi:10.1016/S0301-6226(99)00117-7

- 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. *Animal Feed Science and Technology*, 174(1–2), 1-25. doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.02.009
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., & Doreau, M. (2007). Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(8), 828-855. doi:10.1002/ejlt.200700080
- Doreau, M., & Ferlay, A. (1994). Digestion and utilization of fatty acids by ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 45(3-4), 379-396. doi:10.1016/0377-8401(94)90039-6
- Doreau, M., Fievez, V., Troegeler-Maynadier, A., & Glasser, F. (2012). Ruminal metabolism and digestion of long chain fatty acids in ruminants: recent advances in knowledge. *Inra Productions Animales*, 25(4), 361-373.
- Fievez, V., Vlaeminck, B., Jenkins, T., Enjalbert, F., & Doreau, M. (2007). Assessing rumen biohydrogenation and its manipulation *in vivo*, *in vitro* and *in situ*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(8), 740-756. doi:10.1002/ejlt.200700033
- Lourenco, M., Ramos-Morales, E., & Wallace, R. J. (2010). The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*, 4(7), 1008-1023. doi:10.1017/S175173111000042x
- Harfoot, C. G., & Hazlewood, G. P. (1997). Lipid metabolism in the rumen. In P. N. Hobson (Ed.), *The Rumen Microbial Ecosystem* (pp. 382-426). London: Elsevier.
- Jenkins, T. C., Wallace, R. J., Moate, P. J., & Mosley, E. E. (2008). Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Science*, 86(2), 397-412. doi:10.2527/jas.2007-0588
- Shingfield, K. J., & Wallace, R. J. (2014). Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. In B. Sels & A. Philippaerts (Eds.), *Conjugated Linoleic Acids and Conjugated Vegetable Oils* (pp. 1-65). London, UK.: The Royal Society of Chemistry.

8.3. Literatura recomendada sobre o enquadramento geral da absorção, metabolismo e deposição dos lípidos nos tecidos e leite e impacto dos ácidos gordos na qualidade nutricional dos produtos

- Bessa, R. J. B., Alves, S. P., & Santos-Silva, J. (2015). Constraints and potentials for the nutritional modulation of the fatty acid composition of ruminant meat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(9), 1325-1344. doi:10.1002/ejlt.201400468
- Christie, W. W. (1981). *Lipid Metabolism in Ruminant Animals*: Pergamon Press.
- Demeyer, D., & Doreau, M. (1999). Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(3), 593-607. doi:10.1017/S0029665199000786
- Doreau, M., Bauchart, D., & Chilliard, Y. (2011). Enhancing fatty acid composition of milk and meat through animal feeding. *Animal Production Science*, 51(1), 19-29. doi:10.1071/An10043
- Drackley, J. K. (2000). Lipid Metabolism. In J. P. F. D’Mello (Ed.), *Farm Animal Metabolism and Nutrition* (pp. 97-119). Wallingford, Oxon, UK: CABI.
- Palmquist, D. L., & Jenkins, T. C. (2017). A 100-Year Review: Fat feeding of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 10061-10077. doi:10.3168/jds.2017-12924
- Pethick, D. W., Harper, G. S., & Oddy, V. H. (2004). Growth, development and nutritional manipulation of marbling in cattle: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44(7), 705-715. doi:10.1071/Ea02165

- Vahmani, P., Ponnampalam, E. N., Kraft, J., Mapiye, C., Bermingham, E. N., Watkins, P. J., . . . Dugan, M. E. R. (2020). Bioactivity and health effects of ruminant meat lipids. Invited Review. *Meat Science*, *165*, 108114. doi:10.1016/j.meatsci.2020.108114
- Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., . . . Whittington, F. M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, *78*(4), 343-358. doi:DOI 10.1016/j.meatsci.2007.07.019

8.4. Literatura recomendada especificamente sobre a alteração da biohidrogenação designada “t10-shift”, e suas relações com a depressão de gordura do leite e acidose ruminal.

- Aldai, N., de Renobales, M., Barron, L. J. R., & Kramer, J. K. G. (2013). What are the *trans* fatty acids issues in foods after discontinuation of industrially produced *trans* fats? Ruminant products, vegetable oils, and synthetic supplements. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *115*(12), 1378-1401. doi:10.1002/ejlt.201300072
- Alves, S. P., & Bessa, R. J. B. (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
- Alves, S. P., Vahmani, P., Mapiye, C., McAllister, T. A., Bessa, R. J. B., & Dugan, M. E. R. (2021). *Trans*-10 18:1 in ruminant meats: A review. *Lipids*, *56*(6), 539-562. doi:10.1002/lipd.12324
- Bessa, R. J. B., Alves, S. P., & Santos-Silva, J. (2015). Constraints and potentials for the nutritional modulation of the fatty acid composition of ruminant meat. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *117*(9), 1325-1344. doi:10.1002/ejlt.201400468
- Bauman, D. E., & Griinari, J. M. (2003). Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annual Review of Nutrition*, *23*, 203-227. doi:10.1146/annurev.nutr.23.011702.073408
- Calsamiglia, S., Blanch, M., Ferret, A., & Moya, D. (2012). Is subacute ruminal acidosis a pH related problem? Causes and tools for its control. *Animal Feed Science and Technology*, *172*(1-2), 42-50. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2011.12.007
- Dewanckele, L., Toral, P. G., Vlaeminck, B., & Fievez, V. (2020). Invited review: Role of rumen biohydrogenation intermediates and rumen microbes in diet-induced milk fat depression: An update. *Journal of Dairy Science*, *103*(9), 7655-7681. doi:10.3168/jds.2019-17662
- Elmhadi, M. E., Ali, D. K., Khogali, M. K., & Wang, H. (2022). Subacute ruminal acidosis in dairy herds: Microbiological and nutritional causes, consequences, and prevention strategies. *Animal Nutrition*, *10*, 148-155. doi: 10.1016/j.aninu.2021.12.008
- Griinari, J. M., & Bauman, D. E. (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In M. P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. C. Kramer, G. Nelson, & M. W. Pariza (Eds.), *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research Vol. 1* (pp. 180-200). Champaign, IL: AOCS Press.
- Jenkins, T. C., & Harvatine, K. J. (2014). Lipid feeding and milk fat depression. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*, *30*, 623-642. doi: 10.1016/j.cvfa.2014.07.006
- Jing, L., Dewanckele, L., Vlaeminck, B., Van Straalen, W. M., Koopmans, A., & Fievez, V. (2018). Susceptibility of dairy cows to subacute ruminal acidosis is reflected in milk fatty acid proportions, with C18:1 *trans*-10 as primary and C15:0 and C18:1 *trans*-11 as secondary indicators. *Journal of Dairy Science*, *101*(11), 9827-9840. doi:10.3168/jds.2018-14903
- Khiaosa-ard, R., & Zebeli, Q. (2014). Cattle's variation in rumen ecology and metabolism and its contributions to feed efficiency. *Livestock Science*, *162*, 66-75. doi:DOI 10.1016/j.livsci.2014.01.005

Shingfield, K. J., & Griinari, J. M. (2007). Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(8), 799-816. doi:10.1002/ejlt.200700026