

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Substituição de sabões cálcicos de ácidos gordos de óleo de
palma por uma mistura de óleos de linhaça e de girassol na
dieta de vacas leiteiras:
Efeitos na produção e na composição do leite**

Luís Miguel Tavares Ferreira

Orientador:
Prof. Doutor António José Mira da Fonseca

Co-Orientador:
Eng.^a Ana da Conceição Moreira Gomes

Porto 2012

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

**Substituição de sabões cálcicos de ácidos gordos de óleo de
palma por uma mistura de óleos de linhaça e de girassol na
dieta de vacas leiteiras:
Efeitos na produção e na composição do leite**

Luís Miguel Tavares Ferreira

Orientador:

Prof. Doutor António José Mira da Fonseca

Co-Orientador:

Eng.^a Ana da Conceição Moreira Gomes

Porto 2012

Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da substituição de sabões cálcicos de ácidos gordos de óleo de palma do regime alimentar de vacas leiteiras por uma mistura de óleos de linhaça e de girassol na produção e na composição do leite, bem como no perfil em ácidos gordos do leite ao nível da exploração. O ensaio envolveu 53 animais Holstein-Friesian de uma exploração do Concelho de Vila do Conde e teve a duração de 6 semanas, sendo este período dividido em três períodos de duas semanas cada. No primeiro período, os animais foram alimentados com a dieta em uso na exploração, constituída por 30 kg de silagem de milho, 1.5 kg de palha de trigo e 9.4 kg de uma mistura de matérias-primas (dieta controlo), no segundo período, foram oferecidas as mesmas quantidades dos ingredientes da dieta, tendo contudo a mistura de matérias-primas sido reformulada, substituindo a totalidade (30 kg/tonelada) de sabões cálcicos de ácidos gordos de palma por 27 kg de uma mistura de óleo de linho (2/3) e de óleo de girassol (1/3) e 3 kg de carbonato de cálcio (dieta experimental). No terceiro período a dieta controlo foi novamente oferecida. A mistura de óleos mostrou ser eficaz na alteração do perfil em ácidos gordos do leite, promovendo uma redução do teor em ácidos gordos saturados e um aumento dos ácidos mono- e polinsaturados. O aumento da ingestão de ácidos gordos polinsaturados, resultou na elevação dos níveis de 18:0, *cis*-9 18:1, assim como dos ácidos gordos intermediários da bioidrogenação, nomeadamente o *trans*-11 18:1. Da mesma forma, a concentração em ácido linoleico conjugado, *cis*-9, *trans*-11 18:2, aumentou durante a suplementação com óleos. Observou-se um aumento do teor em 18:3 *n*-3 no leite, enquanto o teor em 18:2 *n*-6 não foi afetado, tendo sido promovida uma redução do rácio *n*-6/*n*-3. A inclusão de óleos de linhaça e de girassol na dieta de vacas leiteiras à base de silagem de milho, por substituição de sabões cálcicos de ácidos gordos de óleo de palma, mostrou ser eficaz na alteração da composição da gordura do leite, tornando-a do ponto de vista nutricional mais benéfica para a saúde humana.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Presidente da Cooperativa Agrícola de Vila do Conde, Sr. Fernando Capela, o fato de ter permitido a realização do meu estágio curricular nesta Instituição.

Um agradecimento especial ao Prof. Doutor António Mira da Fonseca pela orientação do presente trabalho e por todo o apoio prestado ao longo do mesmo.

Gostaria de agradecer à Eng.^a Ana Gomes, Eng.^o André Carvalho, Eng.^a Célia Silva e Eng.^a Isabel Ramos por toda a disponibilidade, simpatia e amabilidade com que me receberam. Um agradecimento que se estende aos restantes funcionários da Cooperativa Agrícola de Vila do Conde.

O meu muito obrigado à Doutora Margarida Maia e à Mestre Vanessa Silva pela ajuda prestada em todo o trabalho analítico das amostras recolhidas, ao Laboratório de Análises de Alimentos para Animais, do Campus Agrário de Vairão, Agros/UP, nas pessoas da Eng.^a Ana Lage e da Eng.^a Sílvia Azevedo, pela análise da composição química das amostras de alimentos, ao Prof. Doutor Rui Bessa e à Doutora Susana Alves, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Técnica de Lisboa, pela ajuda na determinação do perfil em ácidos gordos e à Prof. Doutora Ana Rita Cabrita, da Faculdade de Ciências da UP, pela ajuda no delineamento do ensaio e na interpretação dos resultados.

Agradeço ainda ao Sr. Vítor Maia e à Sra. Adalgisa Maia a simpatia e a disponibilidade com que me receberam ao longo do período de estudo na sua exploração leiteira em Tougues.

Aos meus pais e à minha irmã, por todo o apoio, força, paciência e carinho.

A todos os meus amigos um eterno obrigado pelo apoio, amizade que têm demonstrado ao longo destes anos.

Lista de abreviaturas

Abreviaturas

C18 - ácido gordo com 18 carbonos

CLA - ácido linoleico conjugado

EPM – erro padrão da média

GB - gordura bruta¹

MS - matéria seca

NDF - fibra de detergente neutro

PB - proteína bruta

TMR- total mixed ration

Ácidos Gordos

10:0 - ácido cáprico

12:0 - ácido láurico

14:0 - ácido mirístico

16:0 - ácido palmítico

18:0 - ácido esteárico

trans-11 18:1 - ácido vacénico

cis-9 18:1 - ácido oleico

cis-9,*cis*-12 18:2 *n*-6 - ácido linoleico

cis-9,*trans*-11 18:2 - ácido ruménico

cis-9,*cis*-12,*cis*-15 18:3 *n*-3 - ácido linolénico

Índice Geral

Resumo	iii
Agradecimentos.....	iv
Lista de abreviaturas.....	v
Apresentação.....	1
1. Introdução.....	3
1.1. Situação atual do sector leiteiro português	3
1.2. Estratégias de modificação da composição do leite	5
1.3. Composição da gordura do leite	5
1.3.1. Ácidos gordos saturados	7
1.3.2. Ácidos gordos <i>trans</i>	7
1.3.3. Ácidos gordos insaturados	8
1.3.4. Ácido linoleico conjugado (CLA)	9
1.3.4.1. Produção de CLA	9
1.3.4.2. Propriedades dos CLA.....	10
1.4. Metabolismo ruminal	11
1.4.1. Lipólise.....	11
1.4.2. Biohidrogenação	12
1.5. Alteração do perfil em ácidos gordos do leite.....	14
2. TRABALHO EXPERIMENTAL.....	16
2.1. Objetivos	16
2.2. Material e métodos	17
2.2.1. Exploração.....	17
2.2.2. Delineamento experimental, dietas e manejo.....	17
2.2.3. Análise da composição química dos alimentos	18
2.2.4. Análise dos ácidos gordos do leite e alimentos.....	19
2.2.5. Análise Estatística.....	20
2.3. Resultados e Discussão.....	21
2.3.1. Composição química dos alimentos experimentais	21
2.3.2. Produção e composição do leite	22
2.3.3. Ácidos gordos de cadeia curta e média	24
2.3.4. Ácidos gordos ímpares e ramificados.....	26
2.3.5. Ácidos gordos de cadeia longa	27
2.3.6. Ácido linoleico conjugado (CLA)	28
2.3.7. Análise dos somatários	29
2.4. Conclusão.....	30
Bibliografia	31

Apresentação

Dado a nutrição animal representar nos dias de hoje um verdadeiro desafio ao nível dos sistemas de produção animal, quer na otimização da eficiência da produção, quer pelo peso económico que cada vez mais representa, decidi realizar o meu estágio final do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, na área de nutrição animal, mais especificamente na área da nutrição e alimentação de bovinos de leite.

O concelho de Vila do Conde, conhecido por ser uma das principais áreas de produção leiteira a nível nacional, reúne na sua Cooperativa Agrícola, CAVC, a maior parte dos produtores leiteiros do concelho e ainda alguns de concelhos limítrofes. Esta cooperativa possui uma unidade de fabrico de misturas de matérias-primas, com uma produção mensal de cerca de 2000 toneladas, apoiada num gabinete técnico especializado. Por estas razões, pareceu-me o local adequado para tomar contacto com a realidade da produção leiteira e para desenvolver um projeto na área da nutrição e alimentação animal.

Ao longo de 16 semanas, integrado no gabinete da Subsecção de Nutrição Animal da CAVC, sob a orientação da Eng.^a Ana Gomes, tive oportunidade de observar e executar vários procedimentos relacionados com a nutrição e a alimentação de bovinos de leite.

Entre as atividades desenvolvidas saliento:

- As deslocações de rotina às diversas explorações associadas à Cooperativa, de forma a acompanhar o maneio alimentar que estava a ser executado, ou seja, avaliar se os procedimentos estavam a ser adequados e fazer eventuais correções quando justificadas;
- O acompanhamento dos técnicos nas recolhas de amostras de silagem de milho e de silagem de erva para posterior análise química, de forma a conseguir otimizar a mistura de matérias-primas elaborada na cooperativa para uma máxima produção de leite, de acordo com os resultados da composição química;
- A possibilidade de aprender algumas noções de formulação de regimes alimentares através da utilização de programas informáticos específicos;
- Conseguir perceber a dinâmica de uma unidade de produção de misturas de matérias-primas, além de ficar a conhecer as diversas matérias-primas que são usadas na elaboração dos alimentos complementares;
- O reconhecimento da importância da vertente comercial e da sua dependência da qualidade do apoio técnico prestado pela Subsecção de Nutrição Animal.
- A possibilidade de acompanhar novos clientes da cooperativa e avaliar a eficácia das medidas propostas para melhorar a eficiência produtiva (esta atividade exige uma

adequada percepção e interpretação das dificuldades apresentadas pelos produtores);

- Perceber alguns dos impactos que a nutrição animal tem na saúde dos animais.

Através do acompanhamento dos vários técnicos da Cooperativa tive a possibilidade de contactar mais de perto com a realidade do sector leiteiro português, tomando consciência dos principais problemas na área da nutrição e alimentação animal e das suas implicações. Tive ainda a oportunidade de fazer alguns dias de clínica de reprodução com o Dr. Miguel Costa, o que deu para perceber que alguns problemas reprodutivos estão ligados com o manejo nutricional.

Em simultâneo colaborei no projeto " LeiteSaudável - Desenvolvimento de leites inovadores naturalmente enriquecidos em componentes benéficos à saúde" , Nº 5343, Projectos em Co-promoção, QREN – Sistema de Incentivos à Investigação e Desenvolvimento Tecnológico (SI I&DT), promovido pela Cooperativa Agrícola de Vila do Conde, em parceria com o REQUIMTE/ICETA, da Universidade do Porto.

1. Introdução

Nos últimos anos, a investigação científica na área da nutrição e alimentação tem vindo a identificar componentes fisiologicamente ativos, nos alimentos de origem vegetal e animal, que podem reduzir potencialmente o risco de várias doenças crónicas. Os consumidores consideram hoje a alimentação uma importante “ferramenta” na defesa e prevenção de doenças crónicas associadas ao avanço da idade, como cancro, doenças cardiovasculares, osteoporose, artrites, entre outras (Hasler 2002). Surge assim, o conceito de alimento funcional, ou seja, alimentos que para além da sua função nutricional possuem certos componentes capazes de modular processos metabólicos que podem resultar numa melhoria das condições de saúde, bem-estar e prevenção do aparecimento de certas doenças (Sgarbieri & Pacheco 1999). O interesse crescente dos consumidores por este tipo de produtos, poderá constituir uma ótima oportunidade comercial para o sector da produção de leite. Sabe-se que o leite possui certos compostos com ação benéfica na prevenção de doenças vasculares, cardíacas e neoplásicas, nomeadamente o ácido linoleico conjugado (CLA) e os ácidos gordos da série ómega-3 (McGuire & McGuire 1999). Sabe-se, ainda, que é possível alterar o perfil em ácidos gordos do leite através da manipulação da dieta da vaca leiteira (Bauman & Lock 2010), sendo, assim, possível, através da alimentação, produzir leite ao nível da exploração com características nutricionais distintas, permitindo ao produtor vender à indústria um produto de possível valor acrescentado.

1.1. Situação atual do sector leiteiro português

Segundo um memorando conjunto da Federação Nacional das Cooperativas de Produtores de Leite e da Associação Nacional dos Industriais de Lacticínios, o sector do leite e produtos lácteos possui atualmente um volume médio de negócio em torno dos dois mil milhões de euros, o que equivale a 1.3% do PIB (ANIL 2011). Além disso, representa cerca de 11,5% da produção agrícola nacional (MADRP 2007). Dados que refletem a importância socioeconómica que a produção de leite representa para o país.

Traçando um breve retrato da situação atual, na última década é visível uma diminuição do número de explorações de leite de ano para ano. De acordo com os dados do Diagnóstico Sectorial do Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas, em 2005 existiam 14.700 explorações face às 23.869 em 2000 (MADRP 2007). Por sua vez, o número de animais também se encontra em tendência negativa, passando dos 335.000 em 2000, para os 330.000 em 2005. Contudo, ao contrário do que seria de esperar, a produção não caiu, conseguindo manter níveis quase constantes. A manutenção da produção face ao decréscimo

do número de animais e de explorações fica a dever-se, principalmente, ao aumento da profissionalização do sector. As explorações tradicionais têm dado lugar a explorações com orientação técnico-económica especializadas em leite, representando cerca de 90% do efetivo (MADRP 2007). O uso de animais de elevado mérito genético e as melhorias do manejo alimentar, das infraestruturas e dos cuidados de saúde traduziram-se no aumento de produção, ou seja, menos vacas mas mais leite.

Relativamente à quantidade de leite produzido, na última década a produção não tem sofrido grandes variações. Tal deve-se ao Regime de Quotas imposto pela Política Agrícola Comum (PAC), com o objetivo de travar o crescimento da oferta de leite e favorecer a estabilidade dos mercados. Como podemos observar na Figura 1., a produção de leite apresentou uma tendência crescente até à campanha de 1999/2000, altura em que a quota atribuída a Portugal foi ultrapassada. (Ferreira 2008). A partir daí a produção manteve-se constante, na ordem das 1.800.000 toneladas de leite/ano.

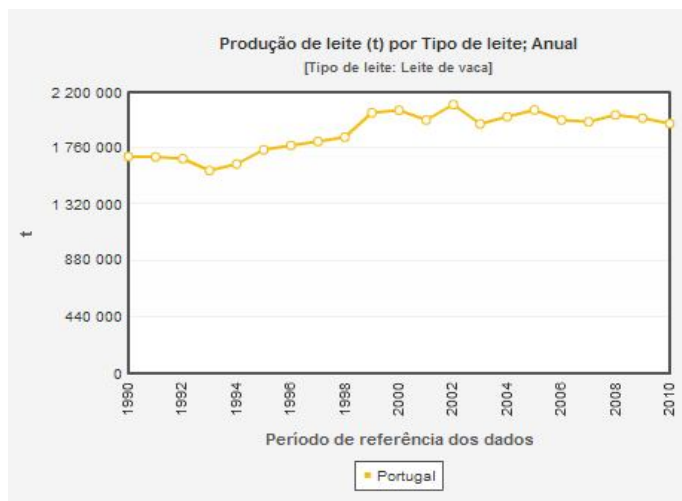


Figura 1. Produção de leite em Portugal entre 1990 e 2010
 Fonte: Instituto Nacional de Estatística. Disponível em www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_indicadores&indOcorrCod=0000919&selTab=tab2.

Atualmente, o sector enfrenta tempos de incerteza. Em 2010 a produção de leite decresceu 57.380 toneladas relativamente ao ano 2008. Ocorreu ainda uma variação negativa do preço do leite (-3,7%; INE 2010). A justificação apresentada pelo INE para explicar a situação é a seguinte: “Em 2010 o volume de produção nacional de leite de vaca foi inferior em cerca de 2,1%, face a 2009. Esta situação resultou essencialmente da manutenção da conjuntura negativa para o sector leiteiro nacional, com a previsão do fim do regime de quotas em 2015, a aplicação do Regime do Exercício da Atividade Pecuária (REAP) que implica dificuldades adicionais no licenciamento/manutenção das explorações agrícolas e o aumento dos custos dos fatores de produção, sem contrapartida favorável no que diz respeito aos preços do leite na produção. Como consequência, assistiu-se à diminuição do número de produtores, a um ponto em que começa a ser visível a intenção de abandono da atividade de explorações já com alguma dimensão, fato que pode vir a colocar um problema futuro de escassez da matéria-prima.”

Os três principais obstáculos que a produção de leite irá enfrentar futuramente são:

- o despertar das chamadas economias emergentes, Brasil, Rússia, Índia e China, e a

consequente procura de matérias-primas para sustentar o seu crescimento, fizeram com que os preços dos fatores de produção aumentassem abruptamente; esta situação seria sustentável para sector leiteiro caso o preço pago pelo leite refletisse esses aumentos (o que não tem acontecido);

-o peso cada vez maior da grande distribuição no que toca à definição de preços;

-o fim previsto do sistema de quotas, em 2015, o que poderá inundar o mercado português com leite de países grandes produtores a preços competitivos.

A produção de leite em Portugal está assim perante novos desafios. Apesar de ser um sector bem estruturado, encontra-se inserido numa economia muito frágil e muito exposta a variações de mercado. É necessário assim, arrojar este sector com estratégias que o permitam resistir às incertezas do futuro. O aumento da produção, novas formas de produção (produção biológica) e a valorização de determinados compostos do leite poderão constituir oportunidades futuras.

1.2. Estratégias de modificação da composição do leite

Atualmente, os únicos nutrientes que valorizam o leite para efeitos de pagamento à produção são a gordura e a proteína. O produtor tenta assim maximizar estes componentes através da incorporação de certos alimentos no regime alimentar dos animais.

Contudo, face à situação difícil que o sector leiteiro português pode vir a passar, é necessário criar novas formas de valorização do produto final de uma exploração. Temos como exemplo a produção biológica, cada vez mais valorizada pelos consumidores. Outra forma, poderá passar pela valorização de outros componentes do leite, tais como os ácidos gordos insaturados. Nos últimos anos, vários estudos em torno desta temática têm vindo a mostrar que é possível alterar o perfil de ácidos gordos no leite recorrendo a alterações no manejo nutricional, nomeadamente através da adição de suplementos lipídicos (Jenkins & McGuire 2006). Para além disso, a descoberta dos benéficos do CLA, ácido gordo polinsaturado encontrado em elevadas concentrações nos leites e carnes de origem de animais ruminantes, na prevenção de determinadas doenças humanas, reforçou ainda mais a vantagem de conseguir alcançar estas modificações (Jenkins & McGuire 2006).

1.3. Composição da gordura do leite

O leite é um fluido biológico composto essencialmente por 87% de água, 4,6% de lactose, 3,4% de proteína, 4,2% de gordura, 0,8% de minerais e 0,1% de vitaminas (Mansson 2008). Tais valores não são fixos, podendo variar consoante diversos fatores, como, por exemplo, o

genótipo, a fase de lactação, a qualidade nutricional do alimento, a frequência de ordenha e a presença de doenças, como mamites (Mannaers & Craven 2003).

Em relação à gordura, esta apresenta-se sob a forma de glóbulos emulsificados na fase aquosa do leite. Estes glóbulos são compostos maioritariamente por triglicerídeos (98%), seguido pelos diglicerídeos, fosfolípidos, colesterol e ácidos gordos livres (Mansson 2008).

Os triglicerídeos, moléculas compostas pela união de três ácidos gordos com uma molécula de glicerol, são sintetizados a partir de mais de 400 tipos diferentes de ácidos gordos, diferindo no comprimento (4-24 átomos de carbono) e saturação. Tal fato, torna a gordura do leite a mais complexa de todas as gorduras naturais (Otter 2003). Contudo, apenas 15 ácidos gordos têm concentrações iguais ou superiores a 1%, os restantes encontram-se em concentrações vestigiais (Quadro 1.; Jensen 2002). Os ácidos gordos mais abundantes são ácido mirístico, (14:0), o ácido palmítico (16:0), o ácido esteárico (18:0) e o ácido oléico (*cis*-9 18:1; Otter 2003).

Quadro 1. Composição dos principais ácidos gordos na gordura do leite.

Nº de carbonos : nº de insaturações	Nome do ácido gordo	Percentagem média (%)
4:0	Butírico	2-5
6:0	Capróico	1-5
8:0	Caprílico	1-3
10:0	Cáprico	2-4
12:0	Láurico	2-5
14:0	Mirístico	8-14
15:0	Pentadecanóico	1-2
16:0	Palmítico	22-35
16:1	Palmitoléico	1-3
17:0	Margárico	0.5-1.5
18:0	Esteárico	9-14
18:1	Oleico	20-30
18:2	Linoleico	1-3
18:3	Linolénico	0.5-2

Adaptado de Jensen (2002).

Os ácidos gordos do leite têm origem em duas fontes, a alimentação e a síntese pelas células secretoras da glândula mamária (Shingfield *et al.* 2010). Os ácidos de cadeia curta/média, 4-14 carbonos, e cerca de metade do 16:0 são sintetizados pela glândula mamária enquanto a outra metade do 16:0 e os ácidos gordos de cadeia longa são oriundos dos lípidos da dieta ou da lipólise dos triglicerídeos do tecido adiposo (Mansson 2008)

Segundo o Quadro 2., a percentagem de ácidos gordos saturados no leite é bastante superior ao total de ácidos gordos insaturados. Dos ácidos gordos monoinsaturados, o *cis*-9 18:1 é o que se encontra em maior percentagem, enquanto os ácidos polinsaturados são representados principalmente pelo ácido linoleico (18:2 *n*-6), linolénico (18:3 *n*-3) e o CLA (Jensen 2002).

Quadro 2. Composição nutricional de leite inteiro e desidratado em ácidos gordos.

	Inteiro	Desidratado
Ácidos gordos, % total		
Total de saturados	64,9	66,1
Total de monoinsaturados	28,3	31,3
Total de polinsaturados	6,8	2,6

Adaptado de Jensen (2002).

O ácido *cis*-9,*trans*-11 18:2, também designado de ácido ruménico (RA), é o isómero de CLA predominante (75-90% do CLA total; Mansson 2008).

Apesar dos principais componentes do leite, proteína, vitaminas, minerais e alguns ácidos

gordos monoinsaturados e polinsaturados apresentarem benefícios para a saúde, os ácidos gordos saturados do leite possuem efeitos negativos (Hu *et al.* 2001 citado por Butler *et al.* 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o consumo de alimentos ricos em gordura saturada está associado a um aumento do risco de doenças cardiovasculares (OMS 2012). Nas últimas décadas assistiu-se a um decréscimo do consumo do leite, uma tendência em parte explicada pelos teores de gordura saturada deste alimento e a todos os efeitos nefastos associados a estes elementos (Haug *et al.* 2007). O leite passou, para muitos, de um alimento ideal para um alimento nutricionalmente prejudicial, isto quando consumido de forma mais generosa (Murphy 2001).

1.3.1. Ácidos gordos saturados

Como referido anteriormente, a gordura do leite é na sua maioria composta por ácidos gordos saturados. Em 33 g de gordura num litro de leite, 19 g são ácidos gordos saturados (Haug *et al.* 2007). Está comprovado que dietas ricas em gorduras saturadas aumentam os níveis de colesterol sanguíneo e estão relacionadas com um aumento do risco de doenças cardiovasculares, aumento de peso e obesidade (Haug *et al.* 2007, Bauman & Lock 2010, OMS). Contudo, dos diferentes ácidos saturados do leite, apenas o ácido láurico (12:0), 14:0 e 16:0 estão associados a um aumento dos níveis sanguíneos de colesterol total e colesterol LDL (Bauman & Lock 2010). Os restantes ácidos gordos saturados pensa-se que tenham efeitos neutros, como o 18:0, não aumentando a concentração sérica de colesterol (Haug *et al.* 2007).

1.3.2. Ácidos gordos *trans*

A gordura do leite é constituída por cerca de 2-4% de ácidos gordos *trans* (Bauman & Lock 2010). Os ácidos gordos *trans* monoinsaturados são os que se encontram em maior proporção, o ácido vacénico (*trans*-11 18:1) representando cerca de 48% (Pfeuffer & Schrezenmeir 2006). Estes ácidos gordos resultam do processo de biohidrogenação ruminal.

Diversos estudos têm mostrado que uma dieta rica em ácidos gordos *trans* resulta num aumento dos níveis séricos do colesterol total e do colesterol LDL, numa diminuição do colesterol HDL. Tais alterações estão associadas ao aumento do risco de doenças cardiovasculares (Bauman & Lock 2010). Estes estudos, contudo, extrapolaram que todas as fontes de ácidos gordos *trans* estão associadas a um aumento do risco de doenças cardiovasculares (Bauman & Lock 2010). Porém, estudos apontam que nem todas as fontes de ácidos gordos *trans* provoquem tal efeito, referindo as fontes industriais como as principais causadoras deste aumento de risco (Huang *et al.* 2007). Num estudo levado a cabo por Lock *et*

al. (2005), não se encontrou relação entre o consumo de ácidos *trans* de fontes naturais, leite e carne, e o risco de doenças cardiovasculares. Tal poderá estar relacionado com a localização da posição da ligação dupla *trans* no ácido gordo das fontes industriais e das fontes naturais, o que pode ter influência nos efeitos fisiológicos. No leite, o isômero *trans*-11 18:1 é o predominante, enquanto nas gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas, o *trans*-9, *trans*-10, *trans*-11 e *trans*-12 18:1 são os isômeros mais abundantes (Bauman & Lock 2010). Para além disso, o *trans*-11 18:1 da gordura do leite pode ser convertido no isômero de CLA *cis*-9,*trans*-11 18:2 no organismo humano (Huag *et al.* 2007). Vários estudos estabeleceram que o ser humano é capaz de converter 20% do *trans*-11 18:1 em CLA (Bauman & Lock 2010). Assim, este sistema enzimático pode ser a chave de diferenciar o isômero *trans*-11 de outros isômeros *trans* octedecenóicos (Huag *et al.* 2007). Contudo, esta é, ainda, uma área em investigação com resultados contraditórios relativamente aos efeitos na saúde deste tipo de ácidos gordos (Huag *et al.* 2007; Bauman & Lock 2010).

1.3.3. Ácidos gordos insaturados

O leite é uma importante fonte de *cis*-9 18:1, representando cerca de 25% dos ácidos gordos do leite (Bauman & Lock 2010). Este ácido possui efeitos benéficos na saúde humana por estar associado a uma diminuição dos níveis colesterol LDL (Huag *et al.* 2007). O 18:2 *n*-6 e o 18:3 *n*-3 são os principais ácidos gordos polinsaturados do leite. São considerados ácidos gordos essenciais, dado não serem sintetizados pelo organismo humano (Modesto *et al.* 2002).

O 18:3 *n*-3 da dieta pode ser convertido a ácido eicosapentenóico (EPA; 20:5 *n*-3) e docosahexenóico (DHA; 22:6 *n*-3) nos tecidos quando estes não são fornecidos pela dieta. O EPA e DHA exercem diversas funções biológicas ao nível do organismo. O EPA está associado à saúde cardiovascular. A sua presença nos tecidos permite regular a actividade de mecanismos envolvidos no metabolismo dos lípidos plasmáticos, na agregação das plaquetas e no processo de coagulação sanguínea. Já o DHA tem importância a nível da formação do tecido nervoso e visual, sendo importante nas primeiras fases da vida (Modesto *et al.* 2002). O 18:2 *n*-6 sofre um processo semelhante, dando origem ao ácido araquidónico (20:4 *n*-6). Estes processos de conversão são mediados pela enzima Δ -6-desaturase presente em vários tecidos humanos (Modesto *et al.* 2002). Estes ácidos gordos de cadeia longa são, posteriormente, convertidos a eicosanóides, compostos metabolicamente ativos como as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, que estão envolvidos na contração muscular, coagulação sanguínea e resposta imune. Os eicosanóides com origem no 18:2 *n*-6, via 20:4 *n*-6, são pró-inflamatórios e pró-trombóticos, aumentando assim o risco de doenças coronárias, enquanto os eicosanóides produzidos a partir dos ácidos gordos *n*-3 estão associados a uma ação menos inflamatória,

podendo, nalguns casos, ser anti-inflamatória (Maia 2010).

1.3.4. Ácido linoleico conjugado (CLA)

O termo CLA é usado para descrever um grupo de isómeros do 18:2 *n*-6 (*cis*-9,*cis*-12 18:2) com as duplas ligações conjugadas, ou seja, as ligações duplas estão separadas por um único carbono em vez da comum separação por um grupo metileno (-CH₂-CH₂-; MacDonald 2000). Estas ligações podem ocorrer nos átomos de carbono 8 e 10 ou 9 e 11, 10 e 12 ou 11 e 13, com todas as combinações *trans* e *cis* possíveis (Funck *et al.* 2006), resultando num total de 28 isómeros de CLA. Os isómeros de CLA com maior atividade biológica conhecida são apenas dois, o *cis*-9,*trans*-11 18:2 e o *trans*-10,*cis*-12 18:2.

Os CLA existem em concentrações elevadas em produtos de origem de animais ruminantes, como o leite (MacDonald 2000). Neste, o isómero predominante é o *cis*-9,*trans*-11 18:2, ainda que em algumas condições alimentares o *trans*-10,*cis*-12 18:2 possa existir em concentrações consideráveis (MacDonald 2000). A concentração de CLA nos produtos lácteos pode variar entre os 2,9 a 8,9 mg/g de gordura, em que o *cis*-9,*trans*-11 18:2 totaliza entre 73 a 93% do total de CLA (Benjamin & Spener 2009).

1.3.4.1. Produção de CLA

Os CLA encontrados no leite têm dupla origem. Podem ter sido originados como intermediários da biohidrogenação do 18:2 *n*-6 a 18:0, pelas bactérias ruminais, ou sintetizados através da conversão endógena de um outro intermediário da biohidrogenação, o *trans*-11 18:1, pela enzima Δ 9-dessaturase presente nos tecidos, principalmente adiposo e glândula mamária. (Griinari & Bauman 1999).

A nível da produção ruminal, o 18:2 *n*-6 presente na dieta sofre o processo de biohidrogenação ruminal, no qual ocorre uma isomerização inicial a *cis*-9,*trans*-11 18:2, que posteriormente é hidrogenado a *trans*-11 18:1 (Bauman *et al.* 1999). Este último passo ocorre muito rapidamente, o que leva a que as concentrações de *cis*-9,*trans*-11 18:2 não se acumulem no rúmen e portanto a sua disponibilidade para a absorção é muito reduzida (Griinari & Bauman 1999). Assim, os níveis elevados de CLA no leite vão depender principalmente da síntese endógena. Segundo Griinari & Bauman (1999), como a hidrogenação do *trans*-11 18:1 a 18:0 é um processo com uma taxa limitante, ocorre acumulação de ácido *trans*-11 18:1 no rúmen que é eficientemente absorvido a nível intestinal. Nos tecidos, principalmente no adiposo e no mamário, o *trans*-11 18:1 é convertido pela ação da enzima Δ 9-dessaturase, em *cis*-9,*trans*-11 18:2 (Figura 2) e incorporado nos lípidos do leite (Griinari & Bauman 1999).

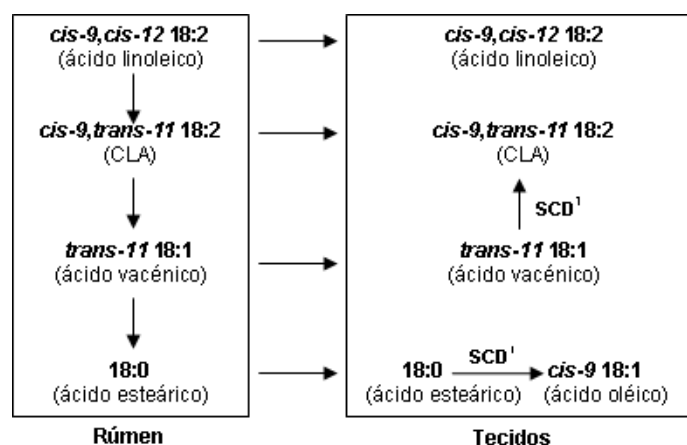


Figura 2. Biossíntese de CLA nos ruminantes. SCD- Δ^9 -dessaturase. Adaptado de Griinari & Bauman (1999).

A infusão abomasal de óleo de esterculina, um potente inibidor da Δ^9 -dessaturase, mostrou que à medida que os níveis de *trans*-11 18:1 eram reduzidos, ocorria uma concomitante redução na concentração de CLA dos tecidos (Corl *et al.* 1999 citado por Griinari & Bauman 1999). A biohidrogenação assume assim um papel chave na síntese destes compostos, quer diretamente pela síntese do *cis*-9,*trans*-11 18:2 a nível ruminal, quer indiretamente pela síntese de *trans*-11 18:1, que é posteriormente convertido nos tecidos. A presença e concentração de CLA nos produtos de animais ruminantes está assim, relacionada com uma incompleta biohidrogenação dos ácidos gordos insaturados da dieta.

1.3.4.2. Propriedades dos CLA

Uma das propriedades dos CLA é a sua atividade anticarcinogénica. Estudos em ratos com tumores mamários quimicamente induzidos, mostraram que o fornecimento de dietas suplementadas com 0,1 a 1% CLA levou à supressão dos tumores (Benjamin & Spener 2009). Além disso, o CLA demonstrou inibir o crescimento de células humanas de tumores mamários e colo-rectais cultivadas *in vitro* (MacDonald 2000). Tem sido relatada uma relação inversa entre o consumo de leite e o risco de cancro mamário nas mulheres, sugerindo assim um efeito anticarcinogénico do CLA (Benjamin & Spener 2009).

O CLA possui também um efeito antiaterosclerótico. Foi demonstrado em coelhos alimentados com dietas aterogénicas suplementadas com 0,5 g CLA/dia durante um período de 22 semanas, que as concentrações plasmáticas de triglicérideos e os níveis de colesterol-LDL eram menores em relação aos animais controlo, já os níveis de colesterol-HDL não sofreram qualquer alteração (MacDonald 2000). Estudos em humanos revelaram que a suplementação com 3 g/d de CLA em indivíduos normolipidémicos, durante um período de 8 semanas com

misturas isoméricas de CLA, em diferentes proporções, reduziu significativamente as concentrações de triglicerídeos (-20%) (Funck *et al.* 2006).

Efeitos antiobesidade e hipolipidêmicos são também apontados aos CLA. A suplementação alimentar de CLA tem sido efetiva na redução da percentagem de gordura corporal e no aumento da massa muscular (Benjamin & Spener 2009). Um estudo de 1997, mostrou que a suplementação de 0,5% de CLA na dieta de ratos reduziu a gordura corporal em 60% e aumentou a massa muscular em 14% (Nagao & Yanagita 2005). Estudos conduzidos em ratos, suínos e bovinos revelaram que o efeito do CLA na composição corporal parece ser devido em parte à redução da deposição de gordura e ao aumento da lipólise nos adipócitos, possivelmente aliada à oxidação dos ácidos gordos nas células musculares e nos adipócitos (Benjamin & Spener 2009). Finalmente, para além das propriedades referidas, foram, ainda, descritas propriedades antidiabéticas bem como propriedades imunomoduladoras (Benjamin & Spener 2009).

1.4. Metabolismo ruminal

O rúmen é palco de um extenso metabolismo lipídico, o que tem grande impacto no perfil de ácidos gordos disponíveis para a absorção e posterior utilização a nível dos tecidos (Bauman *et al.* 2003). Os principais processos que os lípidos sofrem aquando a sua entrada no rúmen são a hidrólise das ligações éster (lipólise) e a posterior biohidrogenação dos ácidos gordos insaturados (Figura 3).

1.4.1. Lipólise

Após a entrada dos lípidos no rúmen, estes sofrem rapidamente a ação das lipases microbianas. Estas enzimas promovem a hidrólise das ligações éster dos triglicerídeos, fosfolípidos e glicolípidos, levando à separação dos seus constituintes base, glicerol e ácidos gordos não esterificados (Flux 2004). A flora ruminal procede à fermentação do glicerol em ácidos gordos voláteis, enquanto os ácidos gordos livres aderem tanto às partículas de alimentos como às superfícies das bactérias (Bauman *et al.* 2003). A maioria das bactérias ruminais não utiliza os ácidos gordos para a produção de energia por se tratarem de compostos altamente reduzidos, contudo estes podem ser utilizados nas suas membranas celulares como fosfolípidos ou ser incorporados no citoplasma como ácidos livres.

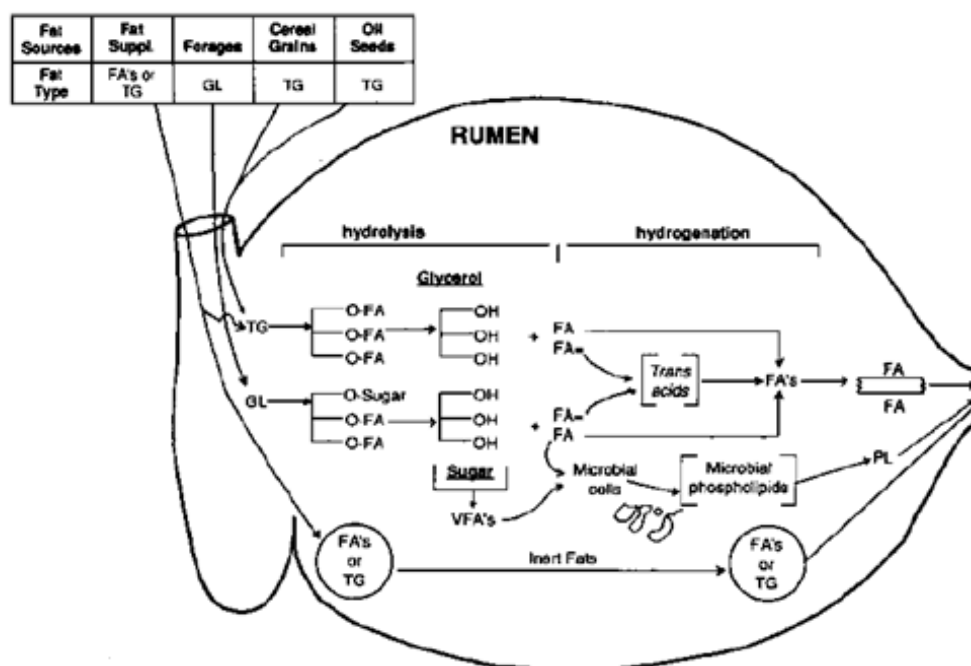


Figura 3. Digestão ruminal das gorduras. Adaptado de Bauman *et al.* (2003) Legenda: **GL**- glicolípidos; **TG**- triglicerídeos; **FA's**- mistura de ácidos gordos; **FA**- ácidos gordos insaturados; **VFA's**- ácidos gordos voláteis; **PL**- fosfolípidos; **Trans acids**- ácidos gordos *trans*.

As principais bactérias ruminais envolvidas neste processo são *Anaerovibrio lipolytica*, responsável pela hidrólise dos triglicerídeos, e *Butyrivibrio fibrisolvens* que hidrolisa os fosfolípidos e os glicolípidos (Bauman *et al.* 2003).

1.4.2. Biohidrogenação

Após a lipólise, os ácidos gordos polinsaturados não esterificados são transformados pelas bactérias ruminais em ácidos gordos saturados (Jenkins 1993). Este processo, designado por biohidrogenação, consiste numa isomerização do ácido gordo C18 polinsaturado e consequentes hidrogenações até à formação do 18:0. A hidrogenação consiste na adição de iões hidrogénio às duplas ligações, por via de enzimas microbianas (redutases), aumentando assim o grau de saturação dos ácidos gordos (Jenkins & McGuire 2006). Contudo, antes da hidrogenação ocorre um processo de isomerização. As isomerases, produzidas pelas bactérias ruminais, convertem uma dupla ligação *cis* da cadeia carbonada em ligação *trans*. Pode assim dizer-se que o processo de biohidrogenação corresponde a reações de isomerização e posteriores hidrogenações dos ácidos gordos polinsaturados da dieta. As isomerases e as redutases são as duas classes de enzimas microbianas envolvidas neste processo (Maia 2010).

Os principais substratos neste processo são o 18:2 *n*-6, nos animais que recebem

suplementos lipídicos ricos neste ácido gordo, e o 18:3 *n*-3, nos animais em pastoreio, dado este ácido gordo ser o mais abundante na composição dos fosfolípidos e dos glicolípidos da erva e de outras forragens (Lourenço *et al.* 2010). Através da Figura 4, podemos ter uma visão geral das reações que se estabelecem ao longo de processo de biohidrogenação até à formação do 18:0.

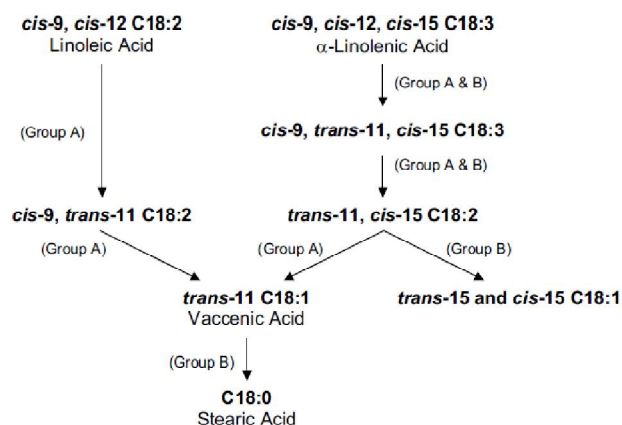


Figura 4. Vias bioquímicas da biohidrogenação ruminal do ácido linoleico e linolénico. (Adaptado de Bauman *et al.* 2003).

No caso do ácido linoleico, ocorre a formação transitória de *cis*-9,*trans*-11 18:2, que é depois hidrogenado a *trans*-11 18:1 e posteriormente a 18:0. O metabolismo do ácido linolénico é semelhante, ocorrendo assim a isomerização em *cis*-9,*trans*-11,*cis*-15 18:3 que, por sua vez, é hidrogenado a *trans*-11,*cis*-15 18:2 e depois em *trans*-11 18:1, *cis*-15 18:1 e *trans*-15 18:1. O *trans*-11-18:1 é finalmente convertido em ácido esteárico, 18:0. Já os isómeros *cis*-15 18:1 e *trans* 15-18:1 não sofrem nenhuma reação bioquímica adicional (Maia 2010). A última reação de hidrogenação, a conversão de *trans*-11 18:1 em 18:0, é considerada uma etapa limitante na biohidrogenação dos ácidos gordos. Desta forma, intermediários *trans* octadecenóicos podem acumular-se na digesta e fluir para o omaso. Na maioria das dietas, a biohidrogenação do 18:2 *n*-6 varia entre 70 a 95%, enquanto a do 18:3 *n*-3 está na ordem dos 85% a 100% (Shingfield 2010).

O metabolismo do 18:2 *n*-6 e do 18:3 *n*-3 envolve pelo menos duas populações distintas de bactérias ruminais, do grupo A e grupo B (Lourenço *et al.* 2010). A completa biohidrogenação dos ácidos gordos C18 polinsaturados resulta da ação conjunta destes dois grupos de bactérias. O grupo A é responsável pela hidrogenação do 18:2 *n*-6 e do 18:3 *n*-3 em *trans*-11 18:1, enquanto o grupo B consegue hidrogenar este último a 18:0 (Bauman *et al.* 2003).

O *trans*-11 18:1, formado a partir do 18:2 *n*-6 e do 18:3 *n*-3, e o *cis*-9,*trans*-11 18:2 formado a partir do 18:2 *n*-6, são dois intermediários da biohidrogenação presentes em quantidades

apreciáveis na gordura dos ruminantes, numa relação de 3:1 (CLA:*trans*-11 18:1). O que poderia levaria a pensar que o CLA teria origem ruminal, contudo o *cis*-9,*trans*-11 18:2 é apenas um intermediário transitório, enquanto o *trans*-11 18:1 é o produto final das bactérias do grupo A, que engloba a grande maioria das bactérias com capacidade biohidrogenante no rúmen. A acumulação de *cis*-9,*trans*-11 18:2 deve-se, maioritariamente, à ação da enzima Δ^9 -dessaturase durante a síntese de gordura pela glândula mamária e tecido adiposo, utilizando o *trans*-11 18:1 ruminal como substrato. Este fato levou ao recente interesse em aumentar os intermediários da biohidrogenação no rúmen de forma a obter gorduras com maiores teores em CLA (Bauman *et al.* 2003).

1.5. Alteração do perfil em ácidos gordos do leite

O principal objetivo na alteração do perfil em ácidos gordos do leite passa pelo aumento dos ácidos gordos insaturados, nomeadamente aqueles com efeitos benéficos para a saúde, como o CLA, e pela redução dos ácidos gordos saturados. Esta alteração pode ser feita a nível industrial, aquando do processamento do leite, ou pode ser levada a cabo por alterações no regime alimentar dos animais (Lourenço *et al.* 2010). No que respeita à modificação através do regime alimentar, o uso de diferentes métodos de conservação das forragens, a utilização de espécies forrageiras específicas e a suplementação lipídica das dietas constituem as principais estratégias (Shingfield *et al.* 2010). Segundo Glasser *et al.* (2008), a maneira mais simples de alterar a composição da gordura do leite é através da suplementação da dieta com ácidos gordos insaturados. Os óleos vegetais ricos em ácidos gordos polinsaturados podem ser administrados no regime alimentar de vacas leiteiras para alterar o perfil em ácidos gordos e produzir assim um leite nutricionalmente mais benéfico para o consumo humano (Caroprese *et al.* 2010).

As alterações do perfil em ácidos gordos em resposta à suplementação da dieta com óleos alimentares dependem da quantidade de óleo incluído, do perfil em ácidos gordos do suplemento, da forma do suplemento lipídico e da composição da dieta (Shingfield *et al.* 2008). Os suplementos lipídicos de origem vegetal podem ser fornecidos sob diferentes formas, desde sementes de oleaginosas inteiras, sabões cálcicos ou sob a forma de óleos, sendo este último o que tende a ter maior efeito na alteração do perfil de ácidos gordos do leite, uma vez que está mais acessível aos microrganismos ruminais (Toral 2010). Como tal, diversos estudos têm mostrado os efeitos que a adição de óleos ao regime alimentar provoca na composição da gordura do leite, por exemplo, a suplementação da dieta com óleo de linhaça (rico em 18:3 *n*-3) traduziu-se num aumento dos ácidos gordos polinsaturados e monoinsaturados e um decréscimo nos ácidos gordos saturados (Caroprese *et al.* 2010). A inclusão de óleos vegetais

na dieta da vaca leiteira é reconhecida por reduzir o conteúdo de 12:0, 14:0 e 16:0 na gordura do leite e por aumentar as concentrações de ácidos gordos 18:0, *cis*-9 18:1 e polinsaturados, dependendo da composição do óleo vegetal (Givens *et al.* 2009).

Segundo Shingfield *et al.* (2008), a suplementação da dieta com óleos vegetais é um meio efetivo para diminuir a concentração de ácidos gordos saturados de cadeia média no leite de bovinos, a suplementação com 50 g de óleo de linhaça/kg de matéria seca (MS) mostrou reduzir o somatório de ácidos gordos 10:0 a 16:0 de 56 para 29%. Estas reduções foram acompanhadas por um aumento de 18:0 e *cis*-9 18:1, devido a um aumento da quantidade de 18:0 disponível para a absorção oriundo da biohidrogenação extensiva dos ácidos gordos polinsaturados do rúmen e a um aumento do fluxo de *cis*-9 18:1 derivado dos óleos vegetais ou da conversão de 18:0 em *cis*-9 18:1, via Δ^9 -desaturase, na glândula mamária (Shingfield *et al.* 2008).

No que diz respeito à alteração da concentração dos ácidos gordos saturados do leite está demonstrado que ácidos gordos com cadeias carbonadas longas, com mais de 16 carbonos, são potentes inibidores da síntese *de novo* de ácidos gordos ao nível da glândula mamária. A explicação reside no efeito inibidor da atividade da acetil-CoA-carboxilase, enzima fundamental na síntese de ácidos gordos saturados de cadeia curta e média (Chilliard *et al.* 2000). Assim, quando existe grande disponibilidade de ácidos gordos de cadeia longa, por um maior fornecimento destes na dieta, ocorre uma diminuição dos ácidos gordos de cadeia média na gordura do leite (8:0 a 14:0 e/ou 16:0; Chilliard *et al.* 2000). Estudos realizados em animais alimentados com óleo de soja registaram um aumento de ácidos gordos monoinsaturados 18:1 e uma redução dos ácidos gordos saturados entre 6:0 a 16:0. Já o uso de sabões cálcicos de ácidos gordos de óleo de palma (rico em 16:0) aumentou os 16:0, 18:0 e 18:1 e reduziu os 10:0 a 14:0 (Chilliard *et al.* 2000). A inibição da lipogénese tende a ser maior quando o número de carbonos e/ou o grau de insaturação aumenta. Além disso, os isómeros *trans*-18:1 e CLA podem ser potentes inibidores da síntese de gordura. A diminuição da disponibilidade do acetato e 3-hidroxi-butirato, devido a alterações das populações ruminais, assim como alterações na produção de ácidos gordos voláteis pode contribuir para uma diminuição dos ácidos gordos de cadeia curta e média. (Chilliard *et al.* 2000)

Através da suplementação lipídica é possível alterar os níveis de *cis*-9,*trans*-11 18:2 no leite. A adição de óleos vegetais ricos em 18:2 *n*-6, como é o caso do óleo de girassol, ou 18:3 *n*-3, como o óleo de linhaça, leva a um aumento do substrato lipídico a ser metabolizado no rúmen, levando, consequentemente, a uma maior produção e acumulação de intermediários da biohidrogenação a nível ruminal, como *cis*-9,*trans*-11 18:2 e *trans*-11 18:1, sendo este último convertido em *cis*-9,*trans*-11 18:2 nos tecidos, maioritariamente na glândula mamária. Além do aumento de substrato, a suplementação com óleos pode também provocar uma alteração da

atividade microbiana associada à biohidrogenação ruminal. Os ácidos gordos insaturados possuem efeitos tóxicos sobre as bactérias com capacidade biohidrogenante, que podem variar de bacteriostáticos a bactericidas (Maia 2010). O efeito antimicrobiano dos lípidos da dieta está associado com o grau de insaturação. Assim, os ácidos gordos polinsaturados apresentam uma maior toxicidade do que ácidos gordos monoinsaturados. Os óleos ricos em 18:3 *n*-3, como de linhaça, são expectáveis ter um maior efeito sobre a biohidrogenação e a micropopulação ruminal do que os óleos ricos em 18:2 *n*-6 ou *cis*-9 18:1 (Lourenço *et al.* 2010). Verificou-se, em culturas *in vitro*, que suplementações elevadas de 18:2 *n*-6 resultavam numa biohidrogenação incompleta, com forte acumulação de *trans* 18:1 (Harfoot *et al.* 1973 citado por Bauman & Griinari 1999). Tal sugeriu que as bactérias do grupo B, responsáveis pela hidrogenação do *trans*-11 18:1 em 18:0, fossem particularmente suscetíveis aos efeitos nefastos dos ácidos gordos polinsaturados (Griinari & Bauman 1999). A suplementação da dieta com sementes de oleaginosas e óleos conduz, frequentemente, a uma biohidrogenação menos completa, promovendo a acumulação de *trans*-11 18:1 (Kennelly 1996). Esta inibição da etapa final da biohidrogenação, aquando da suplementação da dieta com ácidos polinsaturados, leva ao aumento de *trans*-11 18:1 absorvido a nível intestinal, que, posteriormente, pode ser convertido a *cis*-9,*trans*-11 18:2 na glândula mamária, aumentando desta forma a concentração de CLA no leite. A combinação destes dois fatores induz amplas variações nas concentrações de CLA e *trans*-11 18:1 no leite.

A suplementação com óleos vegetais ricos em 18:2 *n*-6 ou 18:3 *n*-3, para além de poder ser eficaz a aumentar a concentração de CLA no leite, é efetiva na diminuição dos ácidos gordos saturados, em particular os 12:0, 14:0 e 16:0, contudo, relativamente à concentração de 18:2 *n*-6 e 18:3 *n*-3 leva a aumentos muito pequenos. Tal deve-se à extensiva biohidrogenação que os ácidos polinsaturados sofrem no rúmen, mas também ao fato da sua incorporação preferencial nos fosfolípidos plasmáticos e ésteres de colesterol, pouco usados pela glândula mamária (Toral 2010).

2. TRABALHO EXPERIMENTAL

2.1. Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo avaliar os efeitos da substituição de sabões cálcicos de ácidos gordos de óleo de palma do regime alimentar por uma mistura de óleos de linhaça e de girassol na produção e na composição do leite, bem como no perfil em ácidos gordos do leite ao nível da exploração. Ou seja, pretendeu-se verificar se é possível, ao nível da exploração e através da alimentação, alterar a composição da gordura do leite, tornando-a

mais enriquecida em ácidos gordos benéficos à saúde humana, nomeadamente em ácidos gordos polinsaturados e em CLA.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Exploração

O trabalho experimental teve lugar numa exploração leiteira de Tougues, Freguesia do Concelho de Vila do Conde, durante o período de 2 de Janeiro a 11 de Fevereiro de 2012. A exploração em causa apresentava um efetivo total de 120 animais de raça Holstein-Friesian, tendo em média 66 animais em lactação. Em 2011, apresentou uma produção média de leite, aos 305 dias, de 9.715 litros. No momento da realização da experiência, encontravam-se em lactação 66 animais, com um peso vivo médio de 600 kg, uma produção média de leite de 25,8 litros/dia, sendo a média dos dias em lactação de 193.

De acordo com os resultados do contraste leiteiro do mês de Dezembro, dos 61 animais em ordenha, 13 encontravam-se na primeira lactação, 14 na segunda, 17 na terceira, 10 na quarta e 7 na quinta e seguintes lactações. Relativamente ao período da lactação, até aos 60 dias encontravam-se 13 animais, entre os 61 e 120 outros 13, por sua vez, 4 estavam entre os 121 e os 180 dias e 31 estavam acima dos 180 dias de lactação. Os animais foram ordenhados através de um sistema de ordenha mecânica, com duas linhas de 6 lugares cada, duas vezes por dia, às 06:30 e 17:30 horas.

No que respeita ao sistema de alimentação, os animais foram alimentados uma vez por dia, com alimento completo, fornecido no final da ordenha da tarde. A dieta base era composta por 30 kg de silagem de milho, 1,5 kg de palha e 9,4 kg de alimento concentrado complementar (mistura de matérias-primas). A presença de bebedouros distribuídos pela vacaria garantiu o acesso contínuo dos animais à água. As infraestruturas da exploração foram completamente renovadas em 2005; possuindo o parque das vacas em lactação, 70 cubículos com colchão sem cama, piso de cimento ripado e uma manjedoura com sistema de guilhotina.

2.2.2. Delineamento experimental, dietas e manejo

O ensaio teve uma duração de 6 semanas, com início no dia 2 de Janeiro e término a 11 de Fevereiro de 2012, tendo este período sido dividido em três períodos de duas semanas cada. No primeiro período, os animais foram alimentados com a dieta em uso na exploração, sendo constituída por 30 kg de silagem de milho, 1,5 kg de palha de trigo e 9,4 kg de uma mistura de matérias-primas (dieta controlo; Quadro 3). No segundo período, as vacas receberam a mesma

dieta, tendo, todavia, a mistura de matérias-primas sido reformulada, substituindo os 30 kg/tonelada de sabões cálcicos de ácidos gordos de óleo de palma por 27 kg de uma mistura de óleo de linho (2/3) e de óleo de girassol (1/3) e 3 kg de carbonato de cálcio (dieta experimental; Quadro 3). No terceiro período, foi novamente oferecida às vacas a dieta controlo. As dietas foram oferecidas *ad libitum*, uma vez por dia, após a ordenha da tarde (18:30 horas), como alimento completo (TMR), tendo sido formuladas para permitir um nível de refugo de ca. 2% na MS.

Durante o período experimental, foi feito o registo individual da produção de leite dos animais em ordenha duas vezes por semana, às terças e sextas. Dos 66 animais que se encontravam em lactação no início do ensaio, somente 53 se mantiveram até ao final do mesmo, devido a secagens, mortes e refugo. Dessa forma, apenas os registos da produção destes 53 animais foram submetidos a análise estatística. Procedeu-se, ainda, à recolha de duas amostras de leite do tanque por semana para posterior análise do perfil de ácidos gordos. Cada amostra correspondia ao leite de 4 ordenhas. Nos mesmos dias de registo das produções, procedeu-se à recolha de amostras de silagem de milho, palha, mistura e alimento completo, para posterior análise da composição química. As análises químicas da composição do leite produzido foram efetuadas pelo laboratório da empresa que recolhia o leite, neste caso a AGROS.

2.2.3. Análise da composição química dos alimentos

As amostras de alimentos recolhidas nos diferentes períodos do ensaio foram submetidas a análise da composição química. Para a determinação da MS, as amostras de alimentos foram secas em estufa com circulação forçada de ar, à temperatura de 65 °C, durante 48 h e 24 h, para as amostras com teores em humidade elevados (silagem de milho e alimento completo) e baixos (palha e mistura de matérias-primas), respetivamente.

Para as determinações analíticas a seguir referidas, as amostras de alimentos foram moídas em moinho equipado com crivo de 1 mm. O teor em cinza foi determinado após 3 h em mufla a 500 °C (AOAC 1990; ID 942.05). O teor em azoto (N) foi determinado pelo método de Kjeldahl (AOAC 1990; ID 954.01). O teor em PB foi calculado como $N \text{ Kjeldahl} \times 6,25$ (AOAC 1990). A fibra de detergente neutro (NDF) foi determinada de acordo com Van Soest *et al.* (1991) tendo sido adicionada α -amilase durante a extração, não tendo sido utilizado sulfito de sódio. A fração NDF foi expressa isenta de cinza residual. A gordura bruta foi determinada (após hidrólise ácida no caso das amostras de alimento completo), por extração com éter de petróleo utilizando um sistema Gerhardts Soxtec 2000 automatic (AOAC 1990; ID 920.39). Nas amostras de alimentos moídas em moinho equipado com crivo de 0,5 mm, foram determinados os teores

em ureia e em amido, respetivamente, por um método espectrofotométrico (NP 3255 2009) e por um método enzimático (Solomonsson *et al.* 1984).

Quadro 3. Composição das dietas do estudo experimental

Ingredientes (g/kg MS)	Dieta	
	Controlo	Óleos
Silagem de milho	539	539
Palha	64	64
Mistura de matérias-primas	397	397
g/kg alimento		
Farinha de milho	278,4	278,4
Palmiste gordo	62,7	62,7
Bagaço de soja	350,0	350,0
Bagaço de colza	138,0	138,0
Bagaço de girassol	49,0	49,0
Melaço	21,8	21,8
Óleo de linhaça		18,0
Óleo de girassol		9,0
Sabões cálcicos ²	30,0	
Carbonato de cálcio	17,0	20,0
Bicarbonato de sódio	17,0	17,0
Fosfato dicálcico	8,0	8,0
Óxido de magnésio	6,0	6,0
Ureia	5,0	5,0
Sal	6,0	6,0
Optigen® II ³	4,0	4,0
Bioplex® Zinco 10% ⁴	1,0	1,0
Premix mineral e vitaminico ⁵	6,0	6,0

¹Mistura das matérias-primas produzida pela Cooperativa Agrícola de Vila do Conde, CRL, Vila do Conde, Portugal

²Sabões cálcicos de ácidos gordos de óleo de palma (Invivonsa, SA, Cantanhede, Portugal)

³Preparação de ureia pura, com um nível mínimo de 41% de azoto (Alltechaditivos - Alimentação animal, Lda., Sintra, Portugal)

⁴Quelato de zinco de aminoácidos hidratados, resultantes da hidrólise da proteína da soja, produto comercial com 10% de zinco (Alltechaditivos - Alimentação animal, Lda., Sintra, Portugal)

⁵Composto por 2.500.000 IU/kg de vitamina A; 416.666 IU/kg de vitamina D3; 12.500 IU/kg de vitamina E; 66 mg/g de vitamina B3; 100g/kg de vitamina B5; 333 mg/kg de vitamina H; 95 mg/kg de Co; 3.333 mg/kg de Cu; 1666 mg/kg de Fe; 333 mg/kg de I; 83.333 mg/kg de Mg; 10.000 mg/kg de Mn; 50 mg/kg de Se; 13.333 mg/kg de Zn (Premix, Lda., Viana do Castelo, Portugal)

2.2.4. Análise dos ácidos gordos do leite e alimentos

As amostras de leite foram homogeneizadas e 45 mL centrifugados a 14.800 g, durante 15 min, a 4 °C. A fração de gordura assim obtida foi recolhida e conservada a -20 °C. Os ácidos gordos do leite foram metilados por transesterificação direta em meio básico (Molkentin & Precht 2000). Resumidamente, foram adicionados 1 mL de n-hexano e 0,2 mL de solução de

hidróxido de potássio a 2 M em metanol a 50 mg de gordura de leite. Os tubos foram agitados e deixados repousar durante 1 h. Adicionaram-se 2 gotas de ácido acético glacial, agitaram-se os tubos e a fase líquida foi transferida para um novo tubo contendo, aproximadamente, 500 mg de sulfato de sódio anidro. Os tubos foram agitados, centrifugados durante 5 min a 2500 rpm e a fração de n-hexano, contendo os ésteres metílicos dos ácidos gordos, foi transferida para um vial de cromatografia gasosa.

Os ácidos gordos de cadeia longa das amostras de alimento completo foram extraídos e transesterificados diretamente pelo método de Sukhija & Palmquist (1988). Resumidamente, 1 mL de padrão interno (17:0; 1 mg/mL tolueno seco), 1 mL de tolueno e 3 mL de solução metanólica de ácido clorídrico a 5% foram adicionados a cerca de 250 mg de amostra. Os tubos foram agitados e incubados em banho-maria a 90 °C, durante 2 h. Após o arrefecimento, adicionou-se 5 mL de solução de carbonato de potássio a 6% e 2 mL de tolueno. Os tubos foram agitados, centrifugados durante 5 min a 2.500 rpm e a fração orgânica transferida para um novo tubo com 1 g de sulfato de sódio e 0,5 g de carvão ativado. Após 1 h de reação, os tubos foram centrifugados durante 5 min a 2.500 rpm e o sobrenadante evaporado sobre fluxo de azoto a 37 °C. Adicionou-se 1,5 mL de n-hexano e os ésteres metílicos dos ácidos gordos foram transferidos para um vial de cromatografia gasosa.

A quantificação dos ácidos gordos sob a forma de ésteres metílicos foi realizada por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massa (Shimadzu GC-MS QP2010-plus, Kyoto, Japan). O espectrómetro de massa foi operado em modo SIM (single ion monitoring), com fonte de íões em impacto eletrônico a 70eV, de acordo com o método descrito por Thurnhoffer & Vetter (2005). Os íões selecionados foram de m/z 87 para os ácidos gordos saturados, m/z 74 para os monoinsaturados, e a soma dos íões de m/z 79 e 81 para os ácidos gordos polinsaturados. Utilizou-se uma coluna capilar (CP-Sil 88, 100 m × 0.25 mm × 0.20 µm, Agilent Technologies Inc.), com programação de temperaturas, utilizou-se hélio como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min. A temperatura do forno iniciou a 50 °C, mantida durante 1 min, aumentou a 50 °C/min até aos 150 °C, mantida durante 20 min, aumentou de seguida até aos 190 °C, mantida durante 1 min, e finalmente aumentou até aos 210 °C, mantida durante 12min. A temperatura do injetor foi mantida a 250 °C. Os ácidos gordos foram expressos em percentagem do total de ácidos gordos.

2.2.5. Análise Estatística

Os dados foram analisados utilizando o PROC GLM do programa SAS (versão 9.1, SAS Institute, Inc., Cary, NC), tendo os da produção de leite sido sujeitos a análise de variância, considerando como efeitos fixos o período, a classe de dias em lactação (<90, 90-180 e >180)

e a interação período x classe de dias em lactação, e os referentes à composição do leite e ao perfil em ácidos gordos sido sujeitos a análise de variância, considerando como efeito fixo o período.

2.3. Resultados e Discussão

2.3.1. Composição química dos alimentos experimentais

No Quadro 4. apresenta-se a composição química dos alimentos e o perfil em ácidos gordos dos alimentos completos.

Quadro 4. Composição química e proporção em ácidos gordos dos ingredientes e das dietas experimentais

Item	Silagem de Milho			Palha			Concentrado			Alimento Completo		
	P1	P 2	P3	P1	P 2	P3	P1	P 2	P3	P1	P2	P3
MS (%)	38,5	37,9	38,1	91,4	90,8	91,5	89,7	89,7	89,3	48,2	49	47,7
Cinza (%MS)	3,2	3,3	3,2	--	--	--	11,0	10,3	10,9	6,5	6,0	5,9
PB (%MS)	7,1	7,4	7,4	--	--	--	27,7	31,1	31	13,6	14,3	13,6
GB (%MS)	2,7	2,8	2,8	--	--	--	6,0	6,0	6,1	3,9	4,7	3,9
NDF (%MS)	39,8	40,6	41,1	--	--	--	23,7	23,9	22,5	35,5	37,3	37,5
Amido (%MS)	38,1	38,9	37,9	--	--	--	15,4	16,9	18,3	31,6	29,4	27,4
Ureia (%MS)	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,3	0,4	0,3
Ácidos Gordos (g/100g de ácidos gordos totais)												
C12:0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	2,0	1,3	1,5
C14:0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1,3	0,7	0,9
C16:0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	21,8	13,4	21,0
C18:0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	3,4	2,5	2,4
C18:1c9	--	--	--	--	--	--	--	--	--	25,0	22,2	24,9
C18:1c11	--	--	--	--	--	--	--	--	--	1,3	1,3	1,2
C18:2n-6	--	--	--	--	--	--	--	--	--	40,0	42,2	42,8
C20:0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,3	0,2	0,3
C18:3n3	--	--	--	--	--	--	--	--	--	4,7	15,9	4,8
C22:0	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0,2	0,2	0,2

A silagem de milho em uso na exploração era de elevado teor em amido, fazendo com que o teor em amido da dieta (alimento completo) se possa considerar relativamente elevado. A variação entre períodos da composição química, quer dos ingredientes da dieta, quer do alimento completo, não sendo elevada, pode considerar-se normal. Observando a proporção de ácidos gordos do alimento completo durante os diferentes períodos, podemos constatar que do período 1 para o período 2 ocorreu uma redução do 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, *cis*-9 18:1, em

contrapartida o 18:2 *n*-6 e 18:3 *n*-3 aumentaram. No período 3, a concentração dos ácidos gordos foi semelhante à do período 1. A justificação para tais alterações reside na substituição dos sabões cálcicos de ácidos gordos de óleo de palma pela mistura de óleos vegetais no período 2. O óleo de girassol e linhaça são extremamente ricos em ácido linoleico, 18:2 *n*-6, e ácidos linolénico, 18:3 *n*-3, respetivamente. O óleo de linhaça é, em média, constituído por cerca de 57% de 18:3 *n*-3 e 16% de 18:2 *n*-6 (Morris & Vaisey-Genser 2003), enquanto o óleo de girassol apresenta níveis de 18:2 *n*-6 na ordem dos 62.1%, seguido de *cis*-9 18:1 com 24,3% (Sanchez-Muniz & Cuesta 2003). Já óleo de palma é maioritariamente composto por 16:0 (44%) e *cis*-9 18:1 (39%; Berger KG 2003). O facto de o teor em 16:0 ter sofrido a maior redução de 21,8 g para 13,4 g/100 g de ácidos gordos, revela bem a abundância dos sabões cálcicos em 16:0 no óleo de palma.

2.3.2. Produção e composição do leite

Os efeitos da substituição dos sabões cálcicos de ácidos gordos de óleo de palma pela mistura de óleos vegetais na produção e composição de leite estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5. Efeito das dietas experimentais na produção e composição do leite.

	P1-Controlo	P2-Óleos	P3-Controlo	EPM	P
Prod. de leite (L/dia)	29,7	30,3	28,9	1,36	<0,001
Composição (%)					
Gordura (%)	3,83	3,59	3,70	0,067	0,174
Proteína (%)	3,28	3,25	3,21	0,022	0,252
Extrato seco desengordurado (%)	8,80	8,80	8,76	0,036	0,669
Lactose (%)	4,80	4,84	4,84	0,026	0,537
Ureia (mg/L)	307	343	325	20,5	0,530
Ponto de congelação	-529,5	-528,0	-532,5	1,78	0,327

Como se pode verificar, a suplementação com óleos promoveu um aumento da quantidade de leite produzido do período 1 para o período 2, de 29,7 para 30,3 litros, tendo a produção de leite diminuído, no período 3, para 28,9 litros. Já o tratamento não afetou a composição do leite (Quadro 5). Note-se, porém, que os resultados da produção de leite dizem respeito à produção individual por vaca, contrariamente aos da composição do leite do tanque (total de leite produzido na exploração em quatro ordenhas), aspeto que inviabiliza o cálculo da produção de leite corrigida para o teor em energia (tendo em consideração os teores em gordura e em proteína do leite de cada vaca). Assim sendo, no presente estudo, não é possível saber se a suplementação com óleos promoveu ou não uma maior exportação de energia no leite por dia. Ou seja, não se sabe se o aumento da produção de leite se ficou a dever a efeitos de diluição

simples (diminuição dos teores em gordura e/ou proteína) ou se a suplementação com óleos promoveu, de facto, um aumento da exportação de energia pela glândula mamária.

É sabido que regimes alimentares contendo óleos vegetais e óleos de peixe, à semelhança dos contendo concentrações elevadas em hidratos de carbono facilmente fermentáveis e/ou baixos teores em fibra com estrutura física, podem ser causa de produção de leite com baixo teor em gordura (depressão da gordura do leite; Shingfield *et al.* 2010). Em casos severos podem baixar a gordura em mais de 50% com poucas ou nenhuma mudança na produção de leite, de proteína ou de lactose. A secreção de todos os ácidos gordos está diminuída durante a depressão da gordura do leite, mas a redução de ácidos gordos sintetizados *de novo* é desproporcionalmente maior (Shingfield *et al.* 2010). Uma das teorias que explica esta alteração é a inibição direta da lipogénese mamária por isómeros *trans* formados durante a biohidrogenação dos ácidos gordos polinsaturados no rúmen (Grinari *et al.* 1998). Os regimes alimentares acima mencionados podem levar a uma mudança nas principais vias de biohidrogenação, em vez de produzirem como compostos intermediários predominantes o *trans*-11 18:1, passam a produzir *trans*-10 18:1 e *trans*-10,*cis*-12 18:2, potentes inibidores da síntese da gordura do leite (Lourenço *et al.* 2010). Neste ensaio, como podemos ver no Quadro 6, não foi detetado o isómero *trans*-10,*cis*-12-18:2 no leite do período 2. Já em relação ao *trans*-10 18:1, verificou-se um aumento de 0,61 g para 0,95/100 g de ácidos gordos do período 1 para o período 2, contudo é um valor baixo para surtir efeitos significativos na lipogénese, dado que concentrações de *trans*-10 18:1 num bovino com depressão da gordura do leite aproximam-se ou excedem os 10 g/100 g de ácidos gordos (Shingfield *et al.* 2010). Um estudo conduzido por Lock *et al.* (2007) mostrou que a infusão de 42,6 g/dia de *trans*-10 18:1 durante 4 dias levou a um aumento de 0,47 g para 1,12 g/100 g de ácidos gordos deste isómero, contudo não ocorreram efeitos antilipogénicos (Lock *et al.* 2007). Além disso, este aumento de concentração não mostra que tenha ocorrido uma mudança no padrão normal da biohidrogenação, dado que o isómero *trans*-11 18:1 é o que se encontra em maior concentração. Podemos assim verificar que o nível de suplementação com óleos de linhaça e girassol usado neste ensaio, cerca de 254 g/dia (2,7% MS), não deve ter tido um efeito muito marcado na produção de gordura do leite. Num estudo realizado por Flowers *et al.* (2008), a adição de níveis crescentes de óleo de linhaça, 170, 343, e 510 g/dia, não levaram a efeitos na gordura do leite e na produção. Além disso, Rego *et al.* (2009) sugere que a suplementação com óleo de linhaça não exerce efeitos negativos na percentagem de gordura do leite, quando a dieta é maioritariamente composta à base de forragem.

Em relação à percentagem de proteína, a sua diminuição no leite é comum ocorrer em dietas suplementadas com gorduras ricas em ácidos gordos polinsaturados (Huang *et al.* 2008). Tal ocorrência reside no facto de a suplementação lipídica poder apresentar efeitos

adversos sobre a fermentação microbiana, que subsequentemente leva a uma diminuição da proteína microbiana disponível para absorção. Uma outra explicação pode dever-se ao aumento da produção no período em causa, levando à diluição da proteína do leite (Huang *et al.* 2008). No presente estudo, o facto de teor em proteína não ter sido afetado sugere que a suplementação não esteve na origem de alterações muito significativas nos processos de fermentação ruminal.

2.3.3. Ácidos gordos de cadeia curta e média

Através da análise do Quadro 6, podemos verificar que a composição da gordura do leite foi marcadamente alterada pela suplementação lipídica. No que respeita aos ácidos gordos saturados de cadeia curta, apenas o 10:0 sofreu uma redução significativa, passando de 2,00 g/100 g do período 1 para 1,63g /100 g no período 2. Relativamente ao 16:0, é visível uma diminuição significativa da sua concentração do período 1 para o período 2. Tal demonstra que a dieta suplementada com óleos de linhaça e girassol levou a uma redução deste ácido gordo saturado no leite. No período 3, no qual foi novamente fornecida a dieta controlo, a concentração de 16:0 voltou a subir. Numa meta-análise realizada por Glasser *et al.* (2008) verificou-se que tanto a adição de óleo de linhaça como de girassol, entre os 483 a 868 g/d, reduziam a percentagem de 16:0 da gordura do leite. Embora neste ensaio tenham sido apenas usados cerca de 254g/dia de suplemento lipídico, os resultados vão no mesmo sentido. Segundo Palmquist *et al.* (1993), a suplementação lipídica leva um aumento da percentagem de ácidos gordos com 18 carbonos à custa da diminuição dos ácidos gordos de cadeia curta e média, tal deve-se a um aumento da captação por parte da glândula mamária de ácidos gordos de cadeia longa absorvidos a nível intestinal e a uma diminuição da síntese *de novo* de ácidos gordos na glândula mamária (Glasser *et al.* 2008). A glândula mamária é responsável pela síntese dos ácidos gordos de cadeia curta e média (4:0 a 14:0) e cerca de metade de 16:0, a outra metade tendo origem em ácidos gordos pré formados oriundos da dieta ou da mobilização das reservas corporais (Modesto *et al.* 2002). Os ácidos gordos de cadeia longa são inibidores da síntese mamária de ácidos gordos, devido ao seu efeito inibitório sobre a atividade da acetil-CoA-carboxilase, enzima fundamental no processo da lipogénese mamária (Chilliard *et al.* 2000). A marcada diminuição de 16:0 pode também ser devida a uma menor ingestão deste ácido gordo na dieta durante o período 2, pois a substituição dos sabões cálcicos de óleo de palma pelos óleos de linhaça e girassol, reduziu os níveis de ácido palmítico no alimento completo de 21,8%, no período 1, para 13,4%, no período 2 (Quadro 4). A suplementação com óleos teve também efeito na percentagem de *cis*-9 16:1 da gordura do leite, registando-se uma descida da sua concentração do período 1 para o período 2 ($P < 0,05$).

Quadro 6. Perfil de ácidos gordos (g/100 g do total de ácidos gordos) do leite do tanque recolhido ao longo das 6 semanas de estudo (n=4).

	Dietas			EPM	P
	P1-Controlo	P2-Óleos	P3-Controlo		
Ácido gordo (g/100g do total de ácidos gordos)					
10:0	2,00 ^b	1,63 ^a	2,01 ^b	0,083	0,017
11:0	0,12 ^b	0,09 ^a	0,11 ^b	0,006	0,017
12:0	3,10	2,67	3,03	0,115	0,059
13:0	0,10 ^b	0,09 ^a	0,10 ^b	0,005	0,035
14:0	10,96	10,32	11,02	0,194	0,059
<i>iso</i> -14:0	0,11	0,10	0,11	0,003	0,158
<i>cis</i> -9 14:1	1,08	0,98	1,12	0,036	0,053
15:0	0,99	0,89	0,97	0,028	0,071
<i>iso</i> -15:0	0,24	0,24	0,24	0,005	0,717
<i>anteiso</i> -15:0	0,40	0,39	0,40	0,007	0,617
16:0	34,94 ^b	29,85 ^a	34,19 ^b	0,371	<0,001
<i>iso</i> -16:0	0,30	0,28	0,30	0,008	0,255
<i>cis</i> -7 16:1	0,23	0,22	0,24	0,006	0,238
<i>cis</i> -9 16:1	2,07 ^b	1,70 ^a	2,06 ^b	0,045	<0,001
17:0	0,45	0,44	0,44	0,012	0,726
<i>iso</i> -17:0	0,39	0,41	0,40	0,010	0,323
<i>anteiso</i> -17:0	0,44	0,44	0,45	0,011	0,813
<i>cis</i> -9 17:1	0,20	0,18	0,19	0,005	0,084
18:0	9,44 ^a	10,87 ^b	9,20 ^a	0,165	<0,001
<i>trans</i> -6,-7,-8 18:1	0,46 ^a	0,57 ^b	0,48 ^a	0,008	<0,001
<i>trans</i> -9 18:1	0,31 ^a	0,40 ^b	0,33 ^a	0,010	<0,001
<i>trans</i> -10 18:1	0,61 ^a	0,95 ^c	0,81 ^b	0,023	<0,001
<i>trans</i> -11 18:1	0,86 ^a	1,55 ^b	0,91 ^a	0,034	<0,001
<i>trans</i> -12 18:1	0,56 ^a	0,72 ^b	0,59 ^a	0,029	0,014
<i>trans</i> -15 18:1	0,36 ^a	0,59 ^b	0,38 ^a	0,015	<0,001
<i>trans</i> -16+ <i>cis</i> -14 18:1	0,35 ^a	0,58 ^b	0,36 ^a	0,011	<0,001
<i>cis</i> -9 18:1	23,39 ^a	25,43 ^b	23,59 ^a	0,254	<0,001
<i>cis</i> -11 18:1	0,86	0,86	0,86	0,018	0,964
<i>cis</i> -12 18:1	0,42 ^a	0,68 ^c	0,45 ^b	0,007	<0,001
<i>cis</i> -15 18:1	0,08 ^a	0,31 ^b	0,11 ^a	0,060	0,048
18:2 <i>n</i> -6	2,77	2,99	2,89	0,060	0,085
<i>trans</i> -11, <i>cis</i> -15 18:2	0,03 ^a	0,20 ^b	0,04 ^a	0,005	<0,001
<i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 18:2	0,68 ^a	1,11 ^c	0,75 ^b	0,021	<0,001
18:3 <i>n</i> -3	0,31 ^a	0,74 ^b	0,37 ^a	0,032	<0,001
20:0	0,11	0,12	0,10	0,004	0,056
<i>cis</i> -11 20:1	0,06	0,07	0,06	0,002	0,057
20:3 <i>n</i> -6	0,14	0,13	0,13	0,003	0,251
20:4 <i>n</i> -6	0,20	0,19	0,19	0,003	0,127
22:0	0,03 ^{ab}	0,03 ^b	0,03 ^a	0,001	0,013
Somatórios					
Ácidos gordos ímpares	1,66	1,50	1,62	0,045	0,075
Ácidos gordos ramificados	1,88	1,86	1,90	0,039	0,750
Ácidos gordos C18	41,34 ^a	48,54 ^b	42,13 ^a	0,354	<0,001
Ácidos gordos C18:1	28,12 ^a	32,63 ^b	28,87 ^a	0,265	<0,001
Ácidos gordos C18:2	3,48 ^a	4,30 ^b	3,68 ^a	0,074	<0,001
Ácidos gordos saturados	62,24 ^c	56,99 ^a	61,19 ^b	0,196	<0,001
Ácidos gordos monoinsaturados	31,77 ^a	35,78 ^c	32,53 ^b	0,208	<0,001
Ácidos gordos polinsaturados	4,12 ^a	5,37 ^b	4,37 ^a	0,096	<0,001
Rácio <i>n</i>-6:<i>n</i>-3	10,16 ^b	4,50 ^a	8,82 ^b	0,486	<0,001

^{a,b}Na mesma linha valores com diferentes notações são diferentes ($P<0,05$).

A suplementação com óleos teve também efeito na percentagem de *cis*-9 16:1 da gordura do leite, registando-se uma descida da sua concentração do período 1 para o período 2 ($P < 0,05$). A $\Delta 9$ -dessaturase presente no tecido mamário é responsável pela conversão do ácido palmítico em *cis*-9 16:1. Assim, quando ocorre uma diminuição do fornecimento 16:0 à glândula mamária, quer seja pela diminuição da sua síntese *de novo*, quer seja pela menor ingestão deste ácido, ocorre uma menor produção de *cis*-9 16:1 (Givens *et al.* 2009). No presente ensaio podemos verificar tal realidade, pois por um lado a substituição dos sabões cálcicos levou a uma menor ingestão de 16:0 no alimento completo (Quadro 4) e por outro lado, o efeito inibitório dos ácidos gordos polinsaturados sobre a lipogénese mamária pode também ter contribuído na redução do 16:0. A soma destes dois fatores poderá ter provocado, assim, uma diminuição de 16:0, o que levou consequentemente a uma menor produção de *cis*-9 16:1.

2.3.4. Ácidos gordos ímpares e ramificados

Relativamente aos ácidos gordos ímpares e ramificados, o 11:0 e 13:0 apresentaram uma diminuição do período 1 para o período 2, enquanto os restantes ácidos pertencentes a este grupo não apresentaram alterações nas suas concentrações. A presença deste tipo de ácidos gordos no leite deriva maioritariamente de ácidos gordos de bactérias ruminais, assim quando ocorrem variações nas percentagens destes ácidos gordos no leite, podem refletir alterações no ambiente ruminal (Vlaeminck *et al.* 2006). Segundo Cabrita *et al.* (2003), os ácidos gordos ímpares podem ser usados como indicadores da função ruminal em termos de populações microbianas, substratos e interações. Dado os ácidos gordos polinsaturados possuírem efeitos antimicrobianos, sendo estes mais severos quanto maior o grau de insaturação (Maia *et al.* 2007), é expectável que a suplementação lipídica com quantidades elevadas de 18:2 *n*-6 e 18:3 *n*-3 possa afetar as populações bacterianas e, portanto, acarretar alterações nos processos fermentativos (Vlaeminck *et al.* 2006), levando a uma redução da disponibilidade destes ácidos gordos ímpares e ramificados para serem incorporados no leite. Segundo Loores *et al.* (2005), a suplementação da dieta com óleos de linhaça a 3% (na MS) levou a uma redução dos ácidos gordos ímpares e ramificados no leite.

De forma geral, e olhando para os somatórios, apesar de registar uma ligeira diminuição numérica dos ácidos gordos ímpares e uma manutenção dos níveis de ácidos gordos ramificados, sugere que apesar de a população ruminal poder ter sido alterada, não se verificaram efeitos tóxicos.

2.3.5. Ácidos gordos de cadeia longa

Pela análise do Quadro 6, verifica-se que do período 1 para o período 2, ocorreu um aumento dos ácidos gordos com 18 carbonos, nomeadamente o 18:0 e vários isómeros *cis* e *trans* monoenoicos. No que respeita ao aumento de 18:0, sabe-se que biohidrogenação ruminal de suplementos ricos em ácidos gordos polinsaturados com 18 carbonos é um processo sequencial começando na lipólise, seguido da isomerização e hidrogenação das duplas ligações, produzindo como produto final o 18:0 (Jouany *et al.* 2007). A adição de óleos de linhaça e girassol no regime alimentar do período 2, fez aumentar os níveis de 18:2 *n*-6 e 18:3 *n*-3 na dieta. Este último passou de 4,7% do total de ácidos gordos do alimento completo para 15,9%, enquanto o 18:2 *n*-6 passou de 40,0% para 42,2% (Quadro 4). Desta forma, ocorreu um aumento de substrato para as reações de biohidrogenação ruminal, o que consequentemente levou a um aumento do seu produto final, o 18:0.

O aumento dos diversos isómeros 18:1 e 18:2, podem ser explicados pelo fato da etapa final deste processo, a conversão do *trans*-11 18:1 em 18:0, ser uma reação limitante e portanto, vários ácidos gordos intermediários decorrentes do processo da biohidrogenação podem acumular-se no rúmen e ficar assim disponíveis para a absorção intestinal e consequente incorporação no leite (Kliem *et al.* 2009). A principal via de biohidrogenação do 18:2 *n*-6 produz como compostos intermediários, o *cis*-9,*trans*-11 18:2 e *trans*-11 18:1, enquanto o 18:3 *n*-3 leva à formação de *cis*-9,*trans*-11,*cis*-15 18:3, *trans*-11,*cis*-15 18:2 e *trans*-11 18:1. Contudo, investigações mais recentes têm mostrado que as vias de biohidrogenação são muito mais complexas, levando à produção de diferentes intermediários da biohidrogenação *trans* e *cis* octadecenóicos (Shingfield *et al.* 2010). Da biohidrogenação do 18:2 *n*-6, podem ser formados isómeros de *trans*-8 a *trans*-12 18:1 assim como de *cis*-10 a *cis*-12 18:1. No caso do 18:3 *n*-3 podem ser formados *trans*-11 a *trans*-16 e *cis*-11 a *cis*-15 18:1. Na mesma linha, Chilliard *et al.* (2007) descrevem que, para além dos efeitos sobre o *trans*-11 18:1 e *cis*-9,*trans*-11 18:2, a suplementação lipídica pode também modificar o perfil de outros isómeros *trans* e conjugados. A ingestão de 18:2 *n*-6 aumenta o *trans*-6 a *trans*-10 18:1 e a ingestão de 18:3 *n*-3 pode alterar o perfil de *cis*-15-18:1 e *trans*-13 a *trans*-16 18:1, entre outros (Chilliard *et al.* 2007). Looor *et al.* (2005) mostraram, que a suplementação com óleo de linhaça resultou numa maior percentagem de *trans*-13 a *trans*-16 18:1 na gordura do leite quando comparados com tratamentos com óleo de girassol. O aumento da grande maioria de *trans* 18:1 e *cis*-12 e *cis*-15 18:1, registado com a suplementação dos óleos no regime alimentar durante o período 2, sugere que a biohidrogenação do 18:2 *n*-6 e 18:3 *n*-3 não foi completa.

Em relação ao aumento registado de *cis*-9 18:1 no período 2, este pode dever-se a uma maior ingestão deste isómero na dieta, que consequentemente conseguiu escapar à

biohidrogenação ruminal e ser absorvido no duodeno, mas também pode ser explicado pelos níveis aumentados de 18:0 produzidos a nível ruminal, dado que mais de 50% do *cis*-9 18:1 excretado no leite deriva da ação da Δ 9-dessaturase sobre o 18:0 (Givens *et al.* 2009). Como a percentagem de *cis*-9 18:1 do alimento completo sofreu uma diminuição de 24.96% do período 1 para 22,2% no período 2, podemos sugerir que o aumento de *cis*-9 18:1 se tenha devido à conversão do 18:0 pela Δ 9-dessaturase na glândula mamária.

O aumento 18:3 *n*-3 no leite registado aquando a suplementação da dieta com os óleos de linhaça e girassol (período 2) revela que parte deste ácido gordo conseguiu escapar ao processo de biohidrogenação. No entanto, o seu teor no alimento completo aumentou de 5 para 16% com a inclusão da mistura de óleo de girassol e linhaça (Quadro 4). Por sua vez, a percentagem de 18:2 *n*-6 não se alterou entre dietas, tendo seguido o mesmo padrão relativamente ao teor no leite. Ainda que não tenha sido calculada, os dados obtidos permitem sugerir que a biohidrogenação dos precursores foi extensa, particularmente a do 18:3 *n*-3 no alimento completo suplementado com os óleos de linhaça e girassol.

2.3.6. Ácido linoleico conjugado (CLA)

Relativamente ao *cis*-9,*trans*-11 18:2, este aumentou de 0,68 g do período 1 para 1,11 g/100 g no período 2 ($P < 0.05$), mostrando que a dieta suplementada com óleos teve efeitos no teor deste ácido gordo na gordura do leite. O efeito registado pode dever-se ao facto deste ácido gordo ser um produto intermediário do processo de biohidrogenação do 18:2 *n*-6, podendo assim ocorrer a sua acumulação ruminal e posterior absorção intestinal. Por outro lado, o *trans*-11 18:1, intermediário da biohidrogenação do 18:2 *n*-6 e do 18:3 *n*-3, pode ser convertido em *cis*-9,*trans*-11 18:2 via Δ 9-dessaturase na glândula mamária (Chilliard *et al.* 2000). Estudos *in vitro* mostraram que, após a formação ruminal de *cis*-9,*trans*-11 18:2, este é rapidamente convertido em ácido *trans*-11 18:1, sugerindo que a sua acumulação ruminal é mínima (Modesto *et al.* 2002). É, assim, aceite que a maioria do *cis*-9,*trans*-11 18:2 do leite é sintetizada pela conversão do *trans*-11 18:1 no tecido mamário (Caroprese *et al.* 2010). Griinari *et al.* (2000) demonstraram que aproximadamente 70 a 80% de CLA que surge no leite é sintetizado endogenamente, nos tecidos, por ação da Δ 9-dessaturase. Segundo Shingfield *et al.* (2008) a forma mais eficaz de aumentar o CLA na gordura do leite passa por aumentar os teores de 18:2 *n*-6 e 18:3 *n*-3 na dieta, os quais servem de precursores para a formação de *trans*-11 18:1 no rúmen. A adição de óleos de linhaça e de girassol no período 2, promoveu uma extensa biohidrogenação dos precursores, 18:2 *n*-6 e 18:3 *n*-3, o que terá levado a um aumento na formação de *cis*-9,*trans*-11 18:2 e *trans*-11 18:1 no rúmen, como intermediários. Para além do efeito no rúmen, não podemos descartar a hipótese de mais *cis*-9,*trans*-11 18:2

ter sido produzido endogenamente via conversão do *trans*-11 18:1 pela enzima Δ^9 -dessaturase na glândula mamária, ou maior expressão desta face ao aumento de substrato disponível.

2.3.7. Análise dos somatórios

Podemos afirmar que o leite do período 2 é mais saudável do que o leite dos períodos 1 e 3, ou seja, a dieta suplementada com óleos de linhaça e girassol levou a que o leite produzido na exploração tivesse um perfil em ácidos gordos nutricionalmente mais saudável. Através do Quadro 6 verifica-se uma diminuição dos ácidos gordos saturados de 62,24 g para 56,99 g/100 g do período 1 para o período 2. Tal diminuição foi compensada pelo aumento dos ácidos gordos monoinsaturados e polinsaturados.

No período 3, o leite apresentou teores intermédios em ácidos gordos saturados monoinsaturados, comparativamente ao leite dos períodos 1 e 2, sugerindo que as alterações na composição da gordura do leite não são simultâneas à alteração da dieta. A dieta utilizada durante o período 2 terá provocado, assim, um efeito “carry over” na insaturação da gordura do leite. As diferenças observadas no perfil de ácidos gordos saturados e monoinsaturados do leite nos períodos 1 e 3, em que o mesmo alimento completo foi oferecido aos animais, poderão ser explicados por diferenças na população microbiana ruminal induzidas com a dieta suplementada com sabões de óleos de girassol e linhaça no período 2. Adicionalmente, o tempo da retenção ruminal da dieta do período 2, assim como o período de adaptação à dieta controlo poderão estar na base dos dados observados.

O leite do período 2 provou ser assim mais saudável. Outro fator que suporta a natureza benéfica do leite do período 2, é o facto do rácio *n*-6:*n*-3 ser menor comparativamente com o do período 1, passando de 10.16 para 4.50, uma redução de mais de 50%. Simopoulos (2008), num artigo de revisão, reportou as relações entre a ingestão de quantidades excessivas de ácidos gordos polinsaturados da série *n*-6 e rácios *n*-6:*n*-3 elevados e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, neoplásicas, inflamatórias e autoimunes, enquanto quantidade mais elevadas de ácidos gordos polinsaturados *n*-3 e um rácio *n*-6:*n*-3 mais baixo exerciam efeitos supressivos. De fato, uma elevada ingestão de 18:2 *n*-6 tem sido associada ao processo inflamatório e ao despoletar ou exacerbação da doença inflamatória, enquanto a ingestão de 18:3 *n*-3 tem mostrado ter o efeito oposto, evitando a inflamação ou diminuído os seus efeitos (Madureira 2007).

2.4. Conclusão

No presente ensaio, a substituição de sabões cálcicos de ácidos gordos de óleo de palma por uma mistura de óleos de girassol e de linhaça promoveu uma maior produção de leite e não afetou a composição do leite, no que concerne à percentagem de gordura, proteína e lactose. Mais, esta substituição revelou-se eficaz na alteração do perfil em ácidos gordos do leite, ocorrendo uma redução da proporção de ácidos gordos saturados e um aumento da proporção de ácidos mono- e polinsaturados, nomeadamente o CLA. Desta forma, podemos concluir que esta estratégia de manipulação do regime alimentar ao nível de exploração permite produzir leite com gordura nutricionalmente mais benéfica à saúde humana.

Bibliografia

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. **Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, VA.

Associação Nacional dos Industriais de Lacticínios. Federação Nacional das Cooperativas de Produtores de Leite. Memorando Conjunto. Reunião de Trabalho com o S. Ex.^a, Sr. Ministro da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. 2011-02-15. A Fileira do Leite em Portugal <http://www.anilact.pt/documentos/anilfenalac001.pdf>

Bauman DE, Baumgard LH, Corl BA, Griinari JM (1999) " Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants" **Proceedings of the American Society of Animal Science**, 1-15

Bauman DE, Lock AL (2010) "Milk fatty acid composition: challenges and opportunities related to human health" **World Buiatrics Congress**, 278-289

Bauman DE, Perfield II JW, de Veth MJ, Lock AL (2003) "New perspectives on lipid digestion and metabolism in ruminants". **Proceedings of the American Society of Animal Science**, 175-189

Benjamin S, Spener F (2009) "Conjugated linoleic acids as functional food: an insight into their health benefits" **Nutrition & Metabolism** 6, 1-13

Berger KG (2003) " Palm oil" *in* Benjamim Caballero (Ed.) **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, 2^a Ed, Academic Press, 4329-4330

Butler G, Stergiadis S, Seal C (2011)"Fat composition of organic and conventional retail milk in northeast England" **Journal of Dairy Science** 94, 24-36

Cabrita ARJ, Fonseca AJM, Dewhurst RJ, Gomes E (2003) "Nitrogen Supplementation of Corn Silages. 2. Assessing Rumen Function Using Fatty Acid Profiles of Bovine Milk" **Journal of Dairy Sciences** 86, 4020-4032

Caroprese M, Marzano A, Marino R, Gliatta G, Muscio A, Sevi A (2010) "Flaxseed supplementation improves fatty acid profile of cow milk" **Journal of Dairy Science** 93, 2580-2588

Chilliard Y, Ferlay A, Mansbridge RM, Doreau M (2000) "Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids" **Annales de Zootechnie** 49, 181-205

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" **Journal of Lipid Science Technology** 109, 828-855

Ferreira A (2008) "A produção de leite na Região Norte" **Revista INFO- ordem dos engenheiros** 15, 10-15

Flowers G, Ibrahim SA, AbuGhazaleh AA (2008) "Milk fatty acid composition of grazing dairy cows when supplemented with linseed oil" **Journal of Dairy Science** 91, 722–730

Flux CL (2004) "The effect of conjugated linoleic acid on lipid metabolism in the hamster and the sheep" **PhD Thesis - University of Nottingham**, 6-11

Funck LG, Barrera-Arellano D, Block JM (2006) "Ácido Linoléico Conjugado (CLA) e Sua Relação Com a Doença Cardiovascular e os Fatores De Risco Associados" **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, 56, 123-134

Gabinete de Planeamento e Políticas (2007) Leite e Lacticínios – Diagnóstico Sectorial, Ministério da Agricultura do Desenvolvimento Rural e das Pescas
http://www.gpp.pt/pbl/Diagnosticos/Leite_Diagnostico_Sectorial.pdf

Givens DI, Kliema KE, Humphries DJ, Shingfield KJ, Morgana R (2009) "Effect of replacing calcium salts of palm oil distillate with rapeseed oil, milled or whole rapeseeds on milk fatty-acid composition in cows fed maize silage-based diets" **Animal** 3, 1067-1074

Glasser F, Ferlay A, Chilliard Y (2008) "Oilseed lipid supplements and fatty acid composition of cow milk: A Meta-Analysis" **Journal of Dairy Science** 91, 4687-4703

Griinari MJ, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KVV, Bauman DE (2000) "Conjugated Linoleic Acid is Synthesized Endogenously in Lactating Dairy Cows by Δ^9 -Desaturase" **The Journal Of Nutrition** 130, 2285- 2291

Griinari, JM, Bauman DE (1999) "Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants" **Advances in Conjugated Linoleic Acid Research** 1, 180-200

Hasler CM (2002) "Functional Foods: Benefits, Concerns and Challenges: a Position Paper from the American Council on Science and Health" **The Journal of Nutrition** 132, 3772-3781

Haug A, Høstmark AT, Harstad OM (2007) "Bovine milk in human nutrition - a review" **Lipids in Health and Disease** 6, 1-16

Huang Y, Schoonmaker JP, Bradford, BJ, Beitz, DC (2008) "Response of milk fatty acid composition to dietary supplementation of soy oil, conjugated linoleic acid, or both" **Journal of Dairy Science** 91, 260-270

Instituto Nacional de Estatística (2011) "Estatísticas Agrícolas 2010" Disponível em: http://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=123297571&PUBLICACOESmodo=2

Jenkins TC (1993) "Lipid Metabolism in the Rumen" **Journal of Dairy Science** 76, 3851-3863

Jenkins TC, McGuire MA (2006) "Major advances in nutrition: impact on milk composition" **Journal of Dairy Science** 89, 1302-1310

Jensen RG (2002) "The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000" **Journal of Dairy Science** 85, 295-350

Jouany JP, Lassalas B, Doreau M, Glasser F (2007) "Dynamic Features of the Rumen Metabolism of Linoleic Acid, Linolenic Acid and Linseed Oil Measured in Vitro" **Lipids** 42, 351-360

Kennelly, JJ (1996) "The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds". **Animal Feed Science and Technology**, 60, 137-152

Kliem KE, Aikman PC, Humphries DJ, Morgan R, Shingfield KJ, Givens DI (2009) "Effect of replacing calcium salts of palm oil distillate with extruded linseeds on milk fatty acid composition in Jersey and Holstein cows" **Animal** 3:12, 1754-1762

Lock AL, Parodi PW, Bauman DE (2005) "The biology of *trans* fatty acids: Implications for human health and the dairy industry" **Australian Journal of Dairy Technology** 60, 134-142

Lock AL, Tyburczy C, Dwyer DA, Harvatine KJ, Destailats F, Mouloungui Z, Candy L, Bauman DE (2007) "Trans-10 octadecenoic acid does not reduce milk fat synthesis in dairy cows" **The Journal of Nutrition** 137, 71–76

Loor JJ, Ferlay A, Ollier A, Doreau M, Chilliard Y (2005) "Relationship among trans and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil" **Journal of Dairy Science** 88, 726-740

Loor JJ, Ferlay A, Ollier A, Ueda K, Doreau M, Chilliard Y (2005) "High-concentrate diets and polyunsaturated oils alter *trans* and conjugated isomers in bovine rumen, blood and milk" **Journal of Dairy Science Association** 88, 3986-3999

Lourenço M, Ramos-Morales E, Wallace RJ (2010) "The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation" **Animal** 4, 1008-1023

MacDonald HB (2000) "Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge" **Journal of the American College of Nutrition** 19,111-118

Madureira E (2007) " Efeitos anti-inflamatórios dos ácidos gordos polinsaturados *n*-3 de cadeia longa" **Nutricias** 7, 25-29

Maia MRG (2010) "Biohydrogenation and conjugated linoleic acid production in the rumen ecosystem" **Tese de Doutoramento- Universidade Técnica de Lisboa**, 3-42

Maia MRG, Chaudhary LC, Figueres L, Wallace RJ (2007) "Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen" **Antonie van Leeuwenhoek** 91, 303-314

Mannaers J, Craven H (2003) "Liquid Milk for the Consumer" *in* Benjamim Caballero (Ed.) **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, 2^a Ed, Academic Press, 3947-3951

Mansson HL (2008) "Fatty acids in bovine milk fat" **Food & Nutrition Research**, 52, 1-3

McGuire MC, McGuire, MK (1999) "Conjugated linoleic acid (CLA): a ruminant fatty acid with

beneficial effects on human health" **Proceedings of the American Society of Animal Science**, 1-8

Modesto EC, Santos GT, Vilela D, Gonçalves GD, Makoto M (2002) "Efeitos nutricionais de dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados para os ruminantes e alguns benefícios para o homem" **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR** 5, 119-134

Molkentin J, Precht D (2000) "Validation of a gas-chromatographic method for the determination of milk fat contents in mixed fats by butyric acid analysis" **European Journal of Lipid Science and Technology** 102, 194-201

Morris DH, Vaisey-Genser M (2003) " Flaxseed" *in* Benjamim Caballero (Ed.) **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, 2ª Ed, Academic Press, 2525-2526

Murphy JJ (2001) "Milk fat composition and nutritional value" **Proceedings of the British Society of Animal Science Annual Meeting**

Nagao K, Yanagita T (2005) "Conjugated fatty acids in food and their health benefits" **Journal of Bioscience and Bioengineering** 100,152-157

Norma Portuguesa. 1986. Norma Portuguesa 3255: Determinação do teor de ureia. Método espectrofotométrico. **Diário da República**, III Série de 30/05, no. 123 Norma Portuguesa, Lisboa, Portugal

OMS (2012) "Global Health Observatory (GHO)-Unhealthy diet" **Organização Mundial de Saúde** Disponível em: http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/unhealthy_diet_text/en/

Otter D (2003) "Physical and Chemical Properties" *in* Benjamim Caballero (Ed.) **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, 2ª Ed, Academic Press, 3957-3968

Palmquist DL, Beaulieu AD, Barbano DM (1993) "Feed and animal factors influencing milk fat composition" **Journal of Dairy Science** 76, 1753–1771

Pfeuffer M, Schrezenmeir J (2006) "Impact of trans fatty acids of ruminant origin compared with those from partially hydrogenated vegetable oils on CHD risk" **International Dairy Journal** 16, 1383-1388

Rego AO, Alves SP, Antunes MS, 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" **Journal of Dairy Science** 92, 4530-4540

Rego OA, Rosa, HJD, Portugal, PV, Franco T, Vouzela CM, Borba AES, Bessa, RJB, (2005) "The effects of supplementation with sunflower and soybean oils on the fatty acid profile of milk fat from grazing dairy cows" **Animal Research** 54, 17–24

Robertson JB, Van Soest PJ (1981) "The detergent system of analysis and its application to human foods" in James WPT & Theander O (Ed.) **The analysis of dietary fiber in food**, Marcel Dekker, 123-158

Salomonsson A, Theander A, Westerlund E (1984) "Chemical characterization of some Swedish cereal whole meal and bran fractions" **Swedish Journal of Agricultural Research** 14, 111-117

Sanchez-Muniz FJ, Cuesta C (2003) "Sunflower oil" in Benjamim Caballero (Ed.) **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, 2^a Ed, Academic Press, 5672-5675

Sgarbieri VC, Pacheco MTB (1999) "Revisão: Alimentos Funcionais Fisiológicos" **Brazilian Journal of Food Technology** 2, 7-19

Shingfield KJ, Bernard L, Leroux C, Chilliard Y (2010) "Role of trans fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants" **Animal** 4, 1140-1166

Shingfield KJ, Chilliard Y, Toivonen V, Kairenius P, Givens DI (2008) "Trans Fatty Acids and Bioactive Lipids" **Bioactive Components of Milk** 606, 3-65

Simopoulos AP (2008) "The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases" **Experimental Biology and Medicine** 233, 674-688

Sukhija PS, Palmquist DL (1988) "Rapid method for determination of total fatty-acid content and composition of feedstuffs and feces" **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 36, 1202-1206

Thurnhofer S, Vetter W (2005) "A Gas Chromatography/Electron Ionization-Mass Spectrometry-Selected Ion Monitoring Method for Determining the Fatty Acid Pattern in Food after Formation of Fatty Acid Methyl Esters" **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 53, 8896-8903

Toral PG (2010) "Supplementation of the diet of dairy ewes with sunflower oil and marine lipids to modulate milk fat composition" **Tesis Doctoral- Universidad de León**, 33-35

Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA (1991) "Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition" **Journal of Dairy Science** 74, 3583-3597

Vlaeminck B, Fievez V, Cabrita ARJ, Fonseca AJM, Dewhurst RJ (2006) "Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: A review" **Animal Feed Science and Technology** 131, 389–417