

Universidade Brasil  
Campus Descalvado

ALESSANDRA LUCKMANN VOORSLUYS

CINÉTICA FERMENTATIVA “*IN VITRO*” DE FONTES LIPÍDICAS  
INERTES SUBMETIDAS A DOIS NÍVEIS DE pH

FERMENTATIVE KINETICS “*IN VITRO*” OF INERT LIPID SOURCES SUBMITTED  
TO TWO pH LEVELS

Descalvado, SP  
2017

Alessandra Luckmann Voorsluys

CINÉTICA FERMENTATIVA “*IN VITRO*” DE FONTES LIPÍDICAS  
INERTES SUBMETIDAS A DOIS NÍVEIS DE pH

Orientador: Prof. Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Descalvado, SP

2017

**Ficha catalográfica**

V921c Voorsluys, Alessandra Luckmann  
Cinética fermentativa "in vitro" de fontes lipídicas inertes submetidas a dois níveis de pH / Alessandra Luckmann Voorsluys -- Descalvado, 2017.  
57 f. : il. ; 29,5cm.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Brasil, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Liandra Maria Abaker Bertipaglia

1. Ácidos graxos hidrogenados. 2. Cinética de produção de gases. 3. Degradação. 4. Gordura inerte. 5. Sais cálcicos. I. Título.

CDD 636.2085

## \*Folha de autorização para reprodução do trabalho



### Termo de Autorização

#### Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES


Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://universidadebrasil.edu.br/portal/cursos/ppgpa/>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

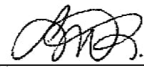
Título do Trabalho: **"Cinética fermentativa *in vitro*" de fontes lipídicas inertes submetidas a dois níveis de PH".**

Autor(es):

Discente: Alessandra Luckmann Voorsluys

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Orientador: Profa. Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Data: 28 de agosto de 2017

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO****Alessandra Luckmann Voorsluys****"Cinética fermentativa *in vitro*" de fontes lipídicas inertes submetidas a dois níveis de PH"**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Camilo Castelo Branco, pela seguinte banca examinadora:



Profa. Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia  
(Orientador)

Programa de Pós-Graduação em Produção Animal



Prof. Dr. Gabriel Mauricio Peruca de Melo  
Programa de Pós-Graduação em Produção Animal



Prof. Dr. Eduardo Cuelar Orlandi Cassiano  
FMVZ/USP

Descalvado, 28 de agosto de 2017

**Profa. Dra. Liandra Maria Abaker Bertipaglia**  
Presidente da Banca

## **DEDICATÓRIA**

Para minha filha, Isabela, que me acompanhou durante todo o mestrado.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, meu muito obrigada pelo apoio.

À Dra. Liandra pela orientação e empenho na realização de cada etapa.

## CINÉTICA FERMENTATIVA “*IN VITRO*” DE FONTES LIPÍDICAS INERTES SUBMETIDAS A DOIS NÍVEIS DE pH

### RESUMO

A alta exigência energética de vacas de elevada produção leiteira levou a busca por alternativas para aumentar a densidade energética da dieta através da suplementação de fontes de gordura que interfiram minimamente nos processos de fermentação e degradação ruminal dos nutrientes. Este estudo foi desenvolvido para analisar os efeitos *in vitro* de 7 fontes lipídicas disponíveis comercialmente (3 sais cálcicos de palma, dois sais cálcicos de soja e uma fonte de ácidos graxos hidrogenados) e do óleo de soja, submetidos a dois diferentes pHs do meio de incubação (6,4 e 6,8), nos parâmetros: pH, degradabilidade da matéria seca, da fibra e cinética de produção de gases. Com base nos resultados, conclui-se que quando o pH inicial do meio de fermentação está mais próximo da neutralidade há menos interferência das fontes lipídicas no mesmo, e este comportamento também é observado para a degradação da matéria seca. Ao mensurar a degradação da fibra em detergente neutro e ácido em 6 horas, observou-se similaridade entre os tratamentos com diferentes fontes, mesmo nos distintos pHs. A cinética de produção de gases alcançou o potencial em 24 horas e mostrou-se semelhante entre si para os respectivos pHs. A produção acumulada foi maior em 48 horas para ambos grupos de distintos pHs.

**Palavras-chave:** ácidos graxos hidrogenados, cinética de produção de gases, degradação, gordura inerte, sais cálcicos



## FERMENTATIVE KINETICS *IN VITRO* OF INERT LIPID SOURCES SUBMITTED TO TWO pH LEVELS

### ABSTRACT

The high energy requirement of high production dairy cows led to the search for alternatives to increase the energy density of the diet through the supplementation of fat sources that interfere minimally in the processes of ruminal fermentation and nutrients degradability. This study was developed to analyze the *in vitro* effect of 7 commercially available lipid sources (3 calcium palm salts, 2 calcium salts of soybean and a source of hydrogenated fatty acids and soybean oil), submitted to two different pHs (6, 4 and 6.8), in the *in vitro* effects on the parameters: pH, dry matter, fiber degradability and kinetics of gas production. Based on the results, when the initial pH is closer to neutrality there is less interference of the lipid sources in it, and this behavior was also observed for dry matter degradation. When measuring the degradation of fiber in neutral detergent and acid detergent in 6 hours, similarity was observed between the treatments with different sources, even in the different pHs. In the subsequent measurements (12, 24 and 48 hours) it was observed that the degradation is higher in the higher pH (6.8), which is explained by the higher activity of fiber degradation microorganisms at pH closer to neutrality. The kinetics of gas production reached the potential in 24 hours and was similar to each other for the respective pHs. The accumulated production was higher in 48 hours for both groups of different pHs.

**Keywords:** calcium salts, degradability, kinetics of gas production, inert fat, hydrogenated fatty acids

## Lista de figuras

<b>Figura 1:</b> Produção de leite em razão do não fornecimento (▲) e do fornecimento (●) de gordura protegida.....	20
<b>Figura 2:</b> Curva de lactação, consumo alimentar e peso vivo de vacas entre partos.....	22
<b>Figura 3:</b> Influência do BE no número de dias para a ocorrência da ovulação.....	28
<b>Figura 4:</b> Amostras dos produtos analisados.....	31
<b>Figura 5:</b> Funil com o filtro de algodão e o sobrenadante retido.....	31
<b>Figura 6:</b> Leitura de pressão com manômetro.....	36
<b>Figura 7:</b> Coleta de fluido ruminal.....	37
<b>Figura 8:</b> Pesagem das amostras nas garrafas de vidro (A) e incubação das garrafas em banho-maria à 39°C.....	38
<b>Figura 9:</b> Resíduo da digestibilidade in vitro filtrado no cadinho tipo Gooch (A) e secagem dos resíduos no cadinho em estufa a 105° C.....	38

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1:</b> Impactos do fornecimento de nutrientes sobre os parâmetros reprodutivos de fêmeas bovinas.....	24
<b>Tabela 2:</b> Aumento da concentração de progesterona plasmática em vacas lactantes que receberam dieta suplementada com gordura.....	25
<b>Tabela 3:</b> Comparação entre nível de garantia de rótulo e resultados encontrados em análise do extrato etéreo por hidrólise ácida.....	32
<b>Tabela 4:</b> Composição bromatológica dos ingredientes usados na formulação da dieta dos grupos experimentais (valores expressos como porcentagem da matéria seca).....	33
<b>Tabela 5:</b> Proporção de ingredientes na dieta total dos grupos experimentais (% da matéria seca).....	34
<b>Tabela 6:</b> Composição bromatológica das dietas dos grupos experimentais (valores expressos como porcentagem da matéria seca).....	42
<b>Tabela 7:</b> Resultados médios dos valores de pH do meio de fermentação <i>in vitro</i> dos grupos experimentais (tratamentos), nos tempos de 06, 12, 24 e 48 horas de incubação (período experimental).....	43
<b>Tabela 8:</b> Resultados médios dos valores de digestibilidade <i>in vitro</i> matéria seca (DIVMS) em meio de fermentação <i>in vitro</i> , nos tempos de 06, 12, 24 e 48 horas de incubação.....	42
<b>Tabela 9:</b> Valores médios de digestibilidade <i>in vitro</i> da fibra em detergente neutro (DIVFDN) em meio de fermentação nos tempos de 6, 12, 24, e 48 horas.....	45
<b>Tabela 10:</b> Resultados médios dos valores de digestibilidade <i>in vitro</i> da fibra em detergente ácido (DIVFDA) em meio de fermentação nos tempos de 6, 12, 24, e 48 horas.....	46
<b>Tabela 11:</b> Potencial de produção de gases <i>in vitro</i> (mL/g MS) das dietas com diferentes fontes lipídicas, em função do tempo de incubação.....	48
<b>Tabela 12:</b> Produção acumulada e gases <i>in vitro</i> (mL/g MS) das dietas com diferentes fontes lipídicas, em função do tempo de incubação.....	48
<b>Tabela 13:</b> Equações de regressão para a produção de gases <i>in vitro</i> (mL/g MS) das dietas com diferentes fontes lipídicas.....	50

<b>Tabela 14:</b> Equações de regressão para a produção acumulada de gases <i>in vitro</i> (mL/g MS) das dietas com diferentes fontes lipídicas.....	50
--	----

**Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.**

<b>AGCL</b>	Ácidos graxos de cadeia longa
<b>AGNE</b>	Ácidos graxos não esterificados
<b>AGL</b>	Ácidos graxos livres
<b>AGCC</b>	Ácidos graxos de cadeia curta
<b>AG</b>	Ácidos graxos
<b>AGHP</b>	Ácidos graxos hidrogenados de palma
<b>BEN</b>	Balanco energético negativo
<b>CHO</b>	Carboidratos
<b>CaLCFA</b>	<i>Calcium long chain fatty acids</i>
<b>DFDN</b>	Degradação da fibra em detergente neutro
<b>DIVMS</b>	Degradabilidade <i>in vitro</i> da matéria seca
<b>DFDA</b>	Degradação da fibra em detergente ácido
<b>ECC</b>	Escore de condição corporal
<b>EE</b>	Extrato etéreo
<b>FDA</b>	Fibra em detergente ácido
<b>FDN</b>	Fibra em detergente neutro
<b>GPR</b>	Gordura protegida no rúmen
<b>GnRH</b>	Hormônio liberador de gonadotrofina
<b>HDL</b>	<i>High density lipoprotein</i>
<b>IMS</b>	Ingestão de matéria seca
<b>IGF-I</b>	Fator semelhante a insulina
<b>LH</b>	Hormônio luteinizante
<b>MM</b>	Matéria mineral
<b>MS</b>	Matéria seca
<b>P4</b>	Progesterona
<b>SCaP</b>	Sais de cálcio de óleo de palma
<b>SCaS</b>	Sais de cálcio de óleo de soja
<b>SCaG</b>	Sal cálcico de ácidos graxos
<b>CaLCFA</b>	Sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa
<b>TC</b>	Taxa de concepção
<b>SARA</b>	Acidose ruminal sub aguda

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1. Relevância do tema .....	15
1.2.1. Biohidrogenação .....	16
1.2.2 Gordura inerte.....	17
1.2.3 Períodos indicados para suplementação lipídica .....	19
1.2.4 Aspectos reprodutivos relacionados a suplementação de fontes lipídicas .....	23
1.2.5. Progesterona .....	24
1.2.6. Fator semelhante à insulina (IGF-I) .....	25
1.2.7. Colesterol .....	26
1.2.8. Puberdade .....	26
1.2.9. Ovulação pós-parto .....	27
1.3. Hipótese .....	29
1.4. Objetivo geral .....	29
1.4.1. Objetivos Específicos.....	29
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
2.1 Local .....	30
2.2. Caracterização do material experimental.....	30
2.3 Tratamentos e delineamento experimental .....	35
2.4 Metodologia .....	35
2.5 Análise estatística.....	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	40
3.1 Determinação do pH do meio de fermentação “ <i>in vitro</i> ” .....	40
3.2 Determinação da digestibilidade “ <i>in vitro</i> ” da matéria seca das dietas com diferentes fontes de gordura .....	42
3.3 Digestibilidade “ <i>in vitro</i> ” da fibra em detergente neutro (DIVFDN) e em detergente ácido (DIVFDA) das dietas com diferentes fontes de gordura.....	44
3.4 Produção de gases “ <i>in vitro</i> ” na fermentação das dietas com diferentes fontes de gordura ....	47
3.5 Equações de regressão para a produção parcial e acumulada de gases “ <i>in vitro</i> ” .....	49
4. CONCLUSÕES .....	52

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Relevância do tema

Vacas leiteiras de elevado mérito genético e alta produção leiteira demandam alto consumo de energia para manutenção das funções de produção e reprodução (1).

Estudos de Palmquist e Jenkins (2) demonstram que 3 a 5% de gordura pode ser adicionada à dieta de vacas em lactação visando aumentar a ingestão energética de vacas de alta produção e reduzir a ingestão de amido, assim aumentar a relação forragem/concentrado e prevenir a depressão da gordura do leite.

Embora a alimentação de gordura aumente a densidade de energia da dieta, não garante que mais energia líquida esteja disponível para a produção de leite. Isto ocorre quando o suplemento de gordura causa um ou mais dos seguintes fatores: 1) a gordura interfere na digestão de outros nutrientes alimentares e causa aumento da excreção de energia nas fezes; 2) a gordura é pouco digerida e absorvida; e 3) a presença de gordura reduz a ingestão alimentar voluntária do animal.

Devendra e Lewis (3) desenvolveram quatro teorias para explicar os efeitos negativos da gordura livre no rúmen: 1) Cobertura física da fibra pela gordura, evitando a ação microbiana; 2) Modificação da população microbiana ruminal causada por possíveis efeitos tóxicos da gordura livre sobre determinados microrganismos; 3) Inibição da atividade microbiana causada por efeito surfactante dos ácidos graxos nas membranas celulares; 4) Redução da disponibilidade de cátions pela formação de complexos insolúveis com os ácidos graxos de cadeia longa (AGCL). O último efeito pode ser ocasionado por ação direta na disponibilidade de cátions para a função microbiana ou, indiretamente, pela queda do pH ruminal.

Os AG são ácidos carboxílicos que podem ser classificados em saturados ou insaturados. Os AG com ligações duplas são chamados de insaturados, sendo normalmente líquidos em temperatura ambiente.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a cinética fermentativa “*in vitro*” de fontes lipídicas inertes e do óleo de soja comercialmente disponíveis, em meio de fermentação com dois diferentes pHs. Foram avaliados pH, degradabilidade da matéria seca, degradabilidade da fibra (FDN e FDA) e a produção de gases.

Como as dietas variam entre si, e o tipo de volumoso e a quantidade de volumoso fornecido durante a suplementação da fonte lipídica são fatores preponderantes na digestibilidade dos alimentos (4, 5), é importante conhecer a dieta basal e as interações da fonte lipídica suplementada com a mesma. A concentração de ácidos graxos livres no rúmen é regulada pela quantidade e tipo de gordura suplementada e, principalmente, o quanto esta interfere na biohidrogenação ruminal (6, 7, 8, 9).

## **1.2 Fundamentação**

### **1.2.1. Biohidrogenação**

Como os ácidos graxos insaturados prejudicam o crescimento dos microrganismos ruminais, eles são hidrogenados total ou parcialmente pelas bactérias e protozoários do rúmen, como forma de proteção celular, passando para a condição de saturados. Isto é feito pela ação das enzimas redutases, que quebram as duplas ligações, dando origem principalmente ao ácido esteárico (C18:0). A esse fenômeno dá-se o nome de hidrogenação ou biohidrogenação (10).

Além disso, os microrganismos do rúmen agem sobre os lipídeos da dieta hidrolisando-os e liberando ácidos graxos livres (AGL) ou ácidos graxos não esterificados (AGNE), glicerol e outros compostos. As bactérias (principalmente, *Anaerobrio lipolytica*) são as principais responsáveis pela hidrólise de triglicerídeos, enquanto os protozoários desempenham um pequeno papel nesse processo (11).

Segundo o National Research Council (12), a extensão da hidrogenação é dependente do grau de insaturação dos ácidos graxos e da frequência da alimentação. Estimativas de hidrogenação ruminal de ácidos graxos



poliinsaturados vão de 60 a 90% (13). Segundo Klusmeyer e Clark (14), a biohidrogenação de ácidos graxos insaturados pode ser tão baixa quanto 30 a 40%, se os ácidos graxos forem fornecidos na forma de sais de cálcio. Por efeito da hidrogenação ruminal, C18:0 e vários isômeros do C18:1 constituem a grande maioria no meio ruminal. O tempo de geração das bactérias que são capazes de degradar AG de cadeia longa é relativamente grande, presumindo a substancial dificuldade de crescimento no interior do rúmen. Consequentemente, pouca degradação de AG de cadeia longa ocorre no rúmen (9).

Outros autores (2) afirmam que gorduras insaturadas são mais tóxicas aos microrganismos do rúmen do que as saturadas e que AG, particularmente poliinsaturados, inibem o crescimento dos microrganismos do rúmen.

Hippen (15) também afirma que dietas contendo concentrações significativas de gorduras ricas em AG poliinsaturados, como o óleo de soja podem causar depressão na gordura do leite. Dhiman (16) também observou que a diminuição na porcentagem de gordura no leite em vacas quando estas tiveram suas dietas suplementadas com 3 a 4 % da matéria seca da dieta, mas não quando suplementadas com óleo de soja a 1 a 2% da MS da dieta, sugerindo que a capacidade de hidrogenação dos microrganismos do rúmen foi excedida nas maiores taxas de inclusão (17).

### **1.2.2 Gordura inerte**

O termo genérico gordura é normalmente utilizado para descrever compostos com alto conteúdo de ácidos graxos (AG) incluindo triglicerídeos, fosfolipídeos, AG não esterificados, e sais de AG de cadeia longa. Os ácidos graxos de cadeia longa compreendem a fração mais rica na gordura. Muitas formas de gordura são fornecidas a vacas leiteiras, incluindo sementes de oleaginosas, e gordura vegetal, gordura seca granulada e gorduras protegidas (12).

A gordura pode ser manufaturada para ter pouco ou nenhum efeito na fermentação do rúmen, sendo assim denominada gordura protegida no rúmen (GPR) ou gordura inerte no rúmen ("rumen inert fat"). As fontes mais comuns comercialmente disponíveis de GPR incluem ácidos graxos hidrogenados e sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa (CaLCFA). Com o advento desses sais ou sabões de cálcio, houve a possibilidade de disponibilizar ácidos graxos

poliinsaturados (ácido linoleico, linolênico, EPA e DHA, por exemplo) para o intestino delgado (18).

O grau de proteção ruminal para gorduras deve ser tão elevado quanto possível, a fim de minimizar os seus efeitos deletérios nas atividades metabólicas microbianas.

Segundo Chilliard (20), os tratamentos destinados a tornar os lipídios inertes no rúmen incluem a hidrogenação ou saponificação dos ácidos graxos. Sementes oleaginosas também podem ser tostadas ou extrusadas para melhorar o valor nutritivo de outros componentes.

Gorduras secas granulares são normalmente referidas como gorduras inertes, pois são fabricadas de maneira a surtir efeito mínimo sobre a fermentação ruminal. As gorduras inertes são processadas de tal maneira que os microrganismos do rúmen não sejam afetados por elas; existem vários tipos dessas gorduras e os processos de fabricação variam entre os fornecedores dos produtos (12).

Os ácidos graxos complexados com cálcio são insolúveis em pH ruminal normal e, portanto, inertes à digestão fermentativa *in vitro* (21). O pH ruminal não é apenas uma medida fisicoquímica com relevância para a fermentação no rúmen, mas é também o critério central de diagnóstico para classificar a acidose ruminal como uma doença que afeta mais órgãos do que apenas o rúmen (22). Apresentação clínica da forma leve, chamada acidose ruminal subaguda (SARA), varia e pode incluir anorexia transitória leve, diarreia intermitente, desidratação, baixo escore corporal, depressão, diminuição da motilidade do rúmen, laminite, abscessos inexplicados e diminuição da produção de leite (22).

As fontes lipídicas processadas para serem inertes no rúmen consistem em uma fonte de ácidos graxos insaturados, que costumam ter alto teor de ácido linoleico e linolênico protegidos, que ao serem ingeridos são biohidrogenados pelos microrganismos do rúmen sendo bem aproveitados pelo animal (8).

Estes são formados por longas cadeias de carbono (linoleico possui 18 carbonos com duas duplas ligações e o linolênico possui 18 carbonos e três duplas ligações) (8). A concentração destes ácidos graxos varia de acordo com o fabricante da gordura inerte, porém são de aproximadamente 42% e 3% para linoleico e linolênico, respectivamente (23). Segundo Franco (24), a energia

bruta contida nas gorduras protegidas é de aproximadamente 6,52 Mcal/kg, o que representa um valor três vezes maior que o do milho.

A fabricação dos sais de cálcio de óleos de palma ou soja inclui a hidrolização dos óleos, que reagem com o cálcio, formando sais, o que eleva o ponto de fusão do produto final (25).

A ligação do sal cálcico (SCAG) é dependente de pH e, portanto, desfaz-se no abomaso, liberando o AG para absorção no intestino delgado. Entretanto, a desvantagem disto é que a acidose ruminal pode aumentar o risco de dissociação do SCAG no rúmen. Valores de pH ruminal inferiores a 6,0 podem causar dissociação desse complexo no rúmen, liberando ácidos graxos livres (AGL), que, em níveis elevados, têm efeito tóxico sobre algumas bactérias e protozoários ruminais (21).

Os ácidos graxos hidrogenados de palma são previamente hidrolisados, quase totalmente hidrogenados, e purificados durante o processo de fabricação. Esta forma de gordura inerte é digerida prontamente, não requerendo nenhuma modificação química antes da digestão. Estes produtos costumam ter um ponto de fusão mais baixo quando comparados com os sais de cálcio e tendem a ser menos solúveis no rúmen que suplementos de gordura com altos teores de ácidos graxos insaturados (21).

### **1.2.3 Períodos indicados para suplementação lipídica**

O manejo nutricional energético é prioridade em vacas em início de lactação. A avaliação da condição corporal ao parir e a intensificação do manejo alimentar pós-parto são ferramentas para maximizar o consumo pós-parto. É possível aumentar a densidade energética da dieta substituindo parcialmente as forragens por concentrados de densidade energética maior, suplementando gordura (26).

De acordo com Palmquist e Jenkins (2), rações para alta produção de leite (maior que 35 kg/dia) devem conter gordura suplementar para alcançar o elevado teor de energia líquida requerido, mantendo a adequada ingestão de fibras para a manutenção do pH ruminal.

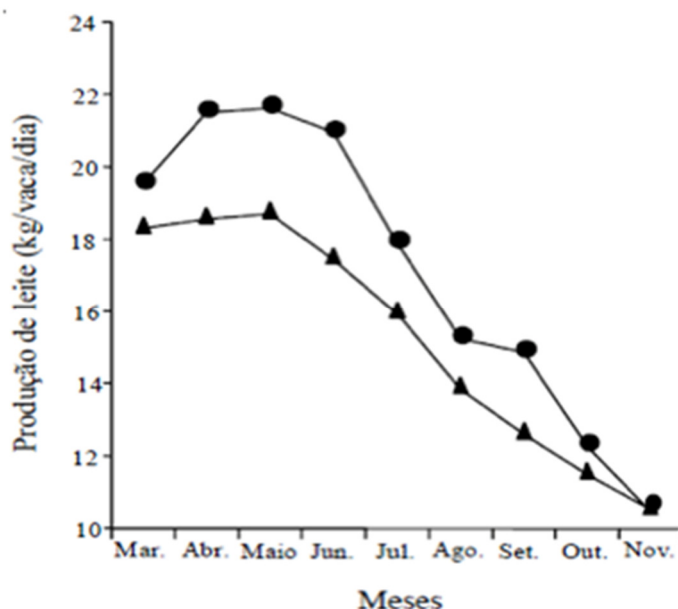
Quando se formula dietas para vacas com alto potencial leiteiro deve-se estar atento para os requerimentos básicos de ingestão de fibra, ou seja, 21%

de fibra em detergente ácido (FDA) ou 28% de fibra em detergente neutro (FDN) (12), garantindo assim bom funcionamento do rúmen na fase em que a capacidade de ingestão ainda se mantém reduzida, primeiras 10 a 12 semanas pós parto (27).

A suplementação com fontes de gordura frequentemente aumenta a produção leiteira em animais confinados. Em sistemas em que os animais permanecem no pasto, a dieta tende a variar e a produção tende a ser menor, também em função da baixa densidade de energia das forragens. Neste caso, a suplementação com gordura pode trazer diferentes resultados, porém a ingestão de energia segue sendo o fator mais limitante para a produção leiteira (28).

Suplementar gordura na dieta pode ser útil para superar limitações associadas a dietas ricas em grãos devido à alta densidade energética da gordura (29).

A Figura 1 mostra a produção de leite em vacas Holandesas em pastagem de *coast-cross*, durante 273 dias de lactação, em razão do não fornecimento e do fornecimento de gordura protegida nos primeiros noventa dias de lactação, segundo Vilela et al., (30).



**Figura 1:** Produção de leite em razão do não fornecimento (▲) e do fornecimento (●) de gordura protegida. **Fonte:** VILELA (30).

A suplementação de gordura pode aumentar a produção de leite durante o período referente ao meio da lactação por maximizar a eficiência energética

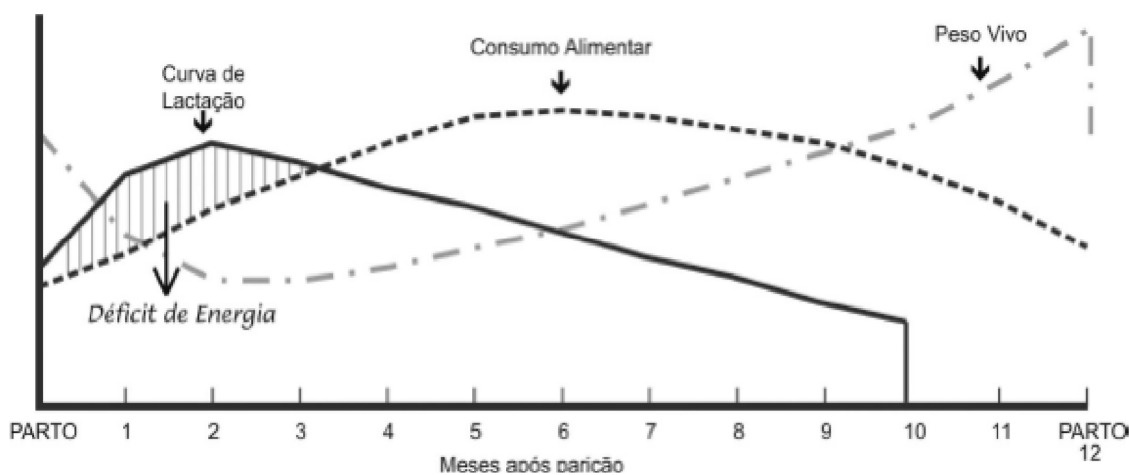
além de diminuir a produção de metano por meio do aumento na proporção de energia metabolizável na dieta (31). A inclusão de gordura na dieta pode alterar o perfil endócrino de forma a favorecer a síntese de leite ao invés de destiná-la a reservas corporais (32).

Segundo Santos (27), ao se incorporar gordura na dieta, há aumento significativo de ingestão de energia, sendo este o nutriente que mais afeta o sucesso reprodutivo em fêmeas bovinas. Segundo o mesmo autor, a ingestão insuficiente de energia está correlacionada com desempenho reprodutivo insatisfatório, além de atrasar a idade à puberdade, o intervalo da primeira ovulação e cio pós-parto e reduzir as taxas de concepção e de prenhez em gado de corte e leite.

As fêmeas bovinas são geralmente acometidas por um balanço energético negativo (BEN) no final da gestação e início da lactação, porém mais severo no período pós-parto imediato. O BEN ocorre, principalmente porque o ponto máximo de produção de leite inicia de 4 a 6 semanas antes do ponto máximo de ingestão de matéria seca (IMS) e a energia necessária para produção de leite é maior do que a energia ingerida (29), conseqüentemente, as vacas utilizam sua reserva energética corporal e perdem peso.

Existem estratégias para minimizar o BEN, e entre elas estão os fatores de otimização de ingestão de matéria seca, como assegurar conforto e acesso ao cocho aos animais. Aumentar a densidade energética da dieta através da maior inclusão de carboidratos (CHO) é a primeira escolha para aumentar a densidade energética por questões de custo, porém o amido contido nos CHO pode diminuir o pH ruminal, levando a acidose. Como alternativa, ou complemento, ao uso de CHO pode-se utilizar uma fonte de gordura inerte no rúmen.

A Figura 2 demonstra a produção de leite, o consumo de matéria seca e peso vivo durante o decorrer da lactação.



**Figura 2:** Curva de lactação, consumo alimentar e peso vivo de vacas entre partos.

**Fonte:** ARM e HAMMER (33).

Quanto aos aspectos reprodutivos, o BEN primeiramente parece interferir na capacidade do eixo hipotálamo-hipófise em desenvolver o padrão de pulsatilidade do hormônio luteinizante (LH) necessário para sustentar o desenvolvimento folicular ovariano e a ovulação. Além disso, durante esse período, o déficit energético e as baixas concentrações de insulina podem limitar a capacidade de resposta do ovário ao estímulo gonadotrófico. O intervalo para a primeira ovulação no período pós-parto depende do restabelecimento das funções normais do eixo cérebro-hipófise-ovários e do trato genital. Posteriormente, a fertilidade é transmitida por um início precoce da primeira ovulação, e pela conclusão de múltiplos ciclos antes da inseminação (34).

Ainda, segundo Butler e Smith (34), o status energético do animal está diretamente relacionado ao atraso no ressurgimento da atividade cíclica ovariana.

De acordo com Santos (27), o pronto retorno da atividade ovariana é importante para se obter o maior número de concepções no início da lactação. Em rebanhos de leite, o período de espera voluntário é de 45 a 60 dias. Quanto antes ocorrer a primeira ovulação pós-parto, maior o número de ciclos estrais durante o período de espera voluntário. Tanto a expressão de sinais de cio quanto a fertilidade do cio aumentam de acordo com o número de ciclos estrais ocorridos antes da primeira inseminação artificial.

Segundo Staples et al. (35) alguns estudos evidenciam que as vacas alimentadas com CaLCFA (Sais de cálcio de ácidos graxos de cadeia longa)

tiveram melhores índices de fertilidade que as vacas alimentadas com outras fontes de gordura ou de energia.

Os efeitos positivos da adição de gordura em dietas para vacas de leite podem ocorrer pelo estímulo do crescimento folicular ovariano em associação a um aumento no balanço energético, e em estudo, demonstrou-se aumento na população folicular em vacas suplementadas com CaLCFA (36).

De acordo com Hawkins et al. (37), vacas suplementadas com CaLCFA apresentaram aumento nas concentrações séricas de colesterol, lipoproteína de alta densidade (HDL), e progesterona (P4). O colesterol é precursor para esteróides, sendo assim, quanto maior for sua concentração sanguínea, maior serão os níveis de esteróides circulantes

#### **1.2.4 Aspectos reprodutivos relacionados a suplementação de fontes lipídicas**

A espécie, raça, idade, escore de condição corporal (ECC) e a nutrição influenciam aspectos reprodutivos nos animais domésticos. Dentre os fatores citados, a nutrição ocupa papel de destaque pois afeta diretamente a fisiologia e performance reprodutiva de vacas (18).

Segundo Santos (27), os fatores que influenciam a eficiência reprodutiva são de baixa herdabilidade. Isso faz com que os componentes ambientais tenham um maior impacto sobre a reprodução do que a seleção genética. Assim sendo, o desempenho reprodutivo do rebanho, é diretamente influenciado pelo manejo e pelo ambiente. Dentre os fatores ambientais que afetam a eficiência reprodutiva, a nutrição é o de maior impacto.

A parição e manutenção da gestação são diretamente influenciadas por fatores que alterem o equilíbrio metabólico e endócrino em bovinos. Por isso, muitos dos impactos da deficiência ou do excesso de nutrientes são refletidos na performance reprodutiva de vacas e novilhas de leite e corte.

A Tabela 1 mostra alguns dos possíveis impactos do fornecimento de nutrientes sobre os parâmetros reprodutivos de fêmeas bovinas.

**Tabela 1:** Impactos do fornecimento de nutrientes sobre os parâmetros reprodutivos de fêmeas bovinas.

Parâmetro	Deficiência	Excesso	Desbalanço
Aborto, natimorto e bezerras debilitados	Energia, PB, I, Se, Ca, P, Mn, Cu, Vit. A, D e E	---	---
Anestro e redução nos sinais de cio	Energia, PB, P, I, Mn, Co, Vit. A	F	---
Baixa concepção e mortalidade embrionária precoce	Energia, PB, I, Mn, Vit. A	PB, PDR	PB/energia
Distocia, complicações uterinas	Energia, Ca	Energia, P, Ca	Cátio-aniónico
Puberdade e maturidade sexual	Energia, PB, Se, I, P, Ca, Co, Cu, Mn, Vit. A e E	Mo, S	Cu/Mo-S
Distúrbios metabólicos que afetam o desempenho reprodutivo	Energia, Se, I, Mg, P, Ca, Vit. E, A e D	Energia, PB, Ca, P	Cátio-aniónico

Fonte: SANTOS (27)

### 1.2.5. Progesterona

Em vacas lactantes, o balanço energético (BE) durante as primeiras semanas pós-parto está relacionado positivamente com as concentrações de progesterona durante os primeiros três ciclos estrais pós-parto. Além disso, as vacas que expressam estro mais cedo na primeira ovulação pós-parto possuem BE melhor que as vacas que não manifestam estro (Tabela 2) (35).



**Tabela 2:** Aumento da concentração de progesterona plasmática em vacas lactantes que receberam dieta suplementada com gordura.

Referencias	Tempo	Dieta		
		Controle	Gordura	EPM
		(ng/mL de progesterona)		
Lucy et al., 1993	1 - 12 dias do ciclo estral	4,2 <sup>a</sup>	5,2 <sup>b</sup>	0,8
Garcia et al., 1998	1 - 7 sem. pós-parto	Maior acúmulo		
Son et al., 1996	2 - 12 sem. pós-parto	4,2 <sup>a</sup>	4,8 <sup>b</sup>	0,3
Adams, 1998	2 - 9 sem. pós-parto	Maior acúmulo		

**Fonte:** STAPLES et al (35)

A progesterona (P4), sintetizada e secretada pelo corpo lúteo no ovário, é essencial para a manutenção da prenhez. Ela não somente prepara o útero para a implantação do embrião como também colabora na manutenção da prenhez coordenando a nutrição do embrião em desenvolvimento. Um grande número de estudos reporta que vacas que recebem gordura suplementar possuem maiores concentrações de P4 no sangue (35).

A suplementação de gordura inerte em dietas de vacas leiteiras no início do período pós-parto estimula o crescimento folicular e o reestabelecimento da atividade ovariana (36). Ainda segundo Lucy (36), os efeitos da gordura na dinâmica folicular das vacas em pós-parto imediato ocorreram devido a maior síntese de PGF2 $\alpha$  quando maiores quantidades de ácido linoleico atingem o intestino delgado.

### 1.2.6. Fator semelhante à insulina (IGF-I)

Embora estudos apontem o BE como um regulador da função ovariana, os hormônios ou metabólitos que mediam os efeitos do BE na função ovariana são desconhecidos. O fator semelhante a insulina- I (IGF-I) é um potencial mediador hormonal dos efeitos positivos do aumento do BE na reprodução em gado leiteiro (38).

Especificamente, as concentrações sistêmicas do IGF-I, que são essencialmente dependentes da produção de IGF-I no fígado, são influenciadas

no gado leiteiro por variações no consumo proteico ou energético, ou ambos, e aumentam juntamente ao BE (38). Assim, o aumento da densidade energética da dieta com gordura “by pass” pode aumentar as concentrações de IGF-I no sangue, resultando em efeitos positivos na reprodução.

O IGF-I é produzido pelo fígado e tem sido proposto como um regulador hipofisário do crescimento folicular ovariano. Atua também regulando a secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e LH. Em culturas de células da granulosa, o IGF-I pode promover a estereidogênese e aumentar o número de receptores para o LH (39).

Durante o balanço energético negativo no início da lactação, o rápido aumento na utilização de glicose para produção de lactose no leite resulta em concentrações plasmáticas mais baixas de glicose e insulina quando comparadas com as fases posteriores de lactação (34).

### **1.2.7. Colesterol**

A suplementação com gordura também influencia os níveis de colesterol e progesterona no sangue, além de aumentar o crescimento do folículo ovulatório (40).

O colesterol presente na circulação sanguínea é o principal fator para a síntese luteal de progesterona nos mamíferos. A síntese a partir do acetato no interior do tecido luteal é insuficiente para manter a função luteal normal. Por isso, acredita-se que o aumento da concentração de colesterol, através da alimentação, possa interferir na função luteal (41). Além disso, o colesterol é fundamental para que a síntese de progesterona ocorra nos tecidos estereidogênicos, e as proteínas conhecidas como “high density lipoprotein” (HDL) e a “low density lipoprotein” (LDL) fornecem colesterol aos tecidos ovarianos para a síntese de hormônios esteróides (27).

### **1.2.8. Puberdade**

A idade em que a puberdade é alcançada em bovinos é um índice muito significativo e sua ocorrência parece estar associada com o aumento na frequência e na amplitude de pulsos de hormônio luteinizante (LH), e quanto

maior a ingestão de energia maior a pulsatilidade da secreção de LH. É bastante provável que este efeito esteja relacionado a produção aumentada de ácido propiônico no rúmen, aumentando a concentração de glicose circulante e estimulando as secreções de insulina e IGF-I (27).

Os fatores pelos quais a maior ingestão de energia interfere na idade a puberdade não estão bem esclarecidos. Sabe-se que o aumento de metabólitos e hormônios que atuam na secreção e ação das gonadotrofinas, a diminuição da sensibilidade do tecido hipotalâmico-hipofisário ao chamado “feedback” negativo provocado pelos estrógenos, e a expressão aumentada de genes associados a síntese de gonadotrofinas são possíveis fatores ligados a maior ingestão de energia (27).

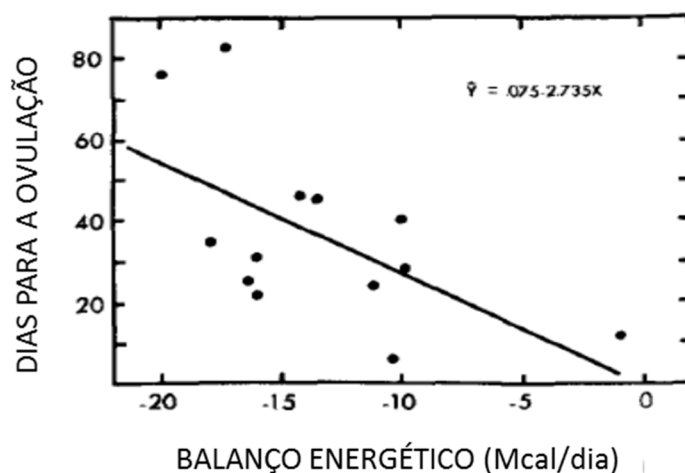
Em estudo, forneceu-se 4,4% de sementes de girassol como fonte lipídica, o que implicou em aumento do número de novilhas entrando na puberdade no início do período reprodutivo. O estudo sugere que os efeitos reprodutivos do fornecimento de gordura sejam dependentes de raça e condição corporal (42).

### **1.2.9. Ovulação pós-parto**

Em vacas leiteiras, a ocorrência da primeira ovulação após a parição ocorre por volta de 10 a 14 dias após o valor mais baixo do balanço negativo de energia líquida (34).

O atraso da primeira ovulação após a parição está relacionado com o status energético da vaca (43), portanto quanto maior a intensidade do BEN, maior será o intervalo até a primeira ovulação. O atraso para ocorrência da primeira ovulação pós-parto prejudica a performance reprodutiva do animal. Acredita-se que um retorno mais cedo à ciclicidade seja benéfico à performance reprodutiva (44) devido ao aumento no número de ciclos estrais antes da inseminação artificial estar associado à maior taxa de concepção (TC) na primeira inseminação artificial (45).

A Figura 3 demonstra a relação entre balanço energético e o número de dias para ocorrer a ovulação nos primeiros 20 dias de lactação de vacas leiteiras, segundo Butler et al. (46).



**Figura 3:** Influência do BE no número de dias para a ocorrência da ovulação.  
**Fonte:** BUTLER et al (46)

O fornecimento de gordura altera a dinâmica do crescimento folicular através do aumento do número de folículos de tamanho médio de três a sete semanas após o parto. Este efeito é observado independentemente da quantidade de energia metabolizável da dieta ou do ganho de peso. A suplementação com óleos vegetais, que são ricos em ácido linoleico, é a responsável pelo maior desenvolvimento folicular observado. As fontes de óleos vegetais mais usadas, apesar de serem altamente biohidrogenadas, são caroço de algodão, óleo de soja e farelo de arroz, sendo que pelo menos 4% da MS da dieta deve ser composta de óleos vegetais. Abaixo disso as respostas encontradas são menores (47).

A gordura na dieta pode aumentar o desenvolvimento de folículos por meio de hormônios que agem no sistema nervoso central influenciando a secreção de GnRH. Outro mecanismo pelo qual a suplementação com gordura pode afetar o desenvolvimento ovariano é pela ação de hormônios e metabólitos, como a Insulina e o IGF-I, diretamente no ovário (42).

A suplementação com gordura no início do período pós-parto melhora a função luteal através da redução da incidência de ciclos curtos (41). O aumento do tempo de vida do corpo lúteo pode estar relacionado à capacidade da suplementação lipídica de interferir no crescimento e na fisiologia do folículo pré-ovulatório (48). Este fato ainda pode estar relacionado aos efeitos do ácido linoleico na síntese uterina de prostaglandina (41).

Os óleos vegetais são ricos em ácido oleico e linoleico, que são responsáveis pela produção de propionato no rúmen, aumentando a gliconeogênese (21). Devido a este efeito, as concentrações de insulina também devem aumentar. Thomas e Williams (48) demonstraram que o óleo de soja levou a um aumento do desenvolvimento folicular juntamente com elevação das concentrações de insulina sérica e IGF-I folicular. Foi comprovado que a insulina e o IGF-I estimulam a proliferação das células da granulosa *in vitro* (49)

### **1.3. Hipótese**

O valor de pH do meio de incubação influencia o comportamento de fontes lipídicas com relação a degradabilidade dos nutrientes da dieta e produção de gases

### **1.4. Objetivo geral**

O objetivo deste estudo foi avaliar a cinética fermentativa "*in vitro*" de diferentes fontes lipídicas inertes em dois diferentes pHs de meio de incubação, além de avaliar o comportamento do óleo de soja livre nas mesmas condições.

#### **1.4.1. Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos foram avaliar o pH do meio de fermentação "*in vitro*", a produção parcial de gases "*in vitro*" (3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas) e acumulada (48 horas), digestibilidade "*in vitro*" da matéria seca (DIVMS), digestibilidade "*in vitro*" da fibra em detergente neutro (DIVFDN) e em detergente ácido (DIVFDA).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

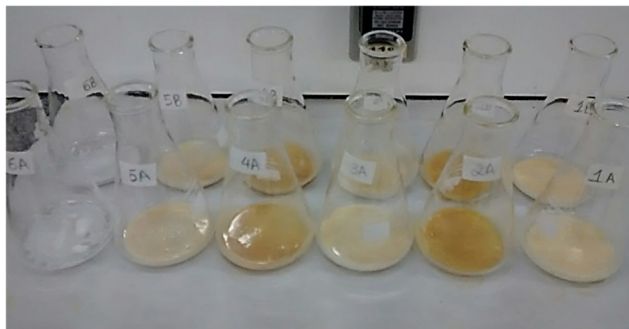
### **2.1 Local**

O experimento foi conduzido no Laboratório de Nutrição Animal e Biogeoquímica da Universidade Brasil, campus de Descalvado-SP. As análises bromatológicas foram realizadas no Departamento de Tecnologia, Laboratório de Biogeoquímica, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal.

### **2.2. Caracterização do material experimental**

Foram analisados seis produtos disponíveis comercialmente (grupos experimentais) e registrados no Ministérios da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento (50), e uma fonte de óleo de soja que, por razões éticas foram codificados. São eles: SCaS1 e SCaS2 – Sais de cálcio de óleo de soja; SCaP1, SCaP2 e SCaP3 – Sais de cálcio de óleo de palma; AGHP – Ácidos graxos hidrogenados de palma e OSOJ – Óleo de soja. As amostras das fontes lipídicas inertes no rúmen foram analisadas quanto ao teor de extrato etéreo, utilizando a metodologia para obtenção do extrato etéreo por hidrólise ácida, de acordo como descrito no Compêndio Brasileiro de Alimentação Animal (51).

Para a análise do extrato etéreo por hidrólise ácida, foram utilizadas 2 gramas de produto moído, pesados em balança analítica e transferidos para Erlenmeyer de 250mL. Em seguida, 2mL de álcool etílico foram adicionados de maneira a umidificar toda a amostra, assim como 10mL da solução de ácido clorídrico 70% (v/v), agitado vigorosamente e levado ao banho-maria a temperatura de 70 a 80°C por 40 minutos, agitando a cada 10 minutos (Figura 4).



**Figura 4:** Amostras de dois gramas de fontes lipídicas inertes no rúmen em Erlenmeyer

Após esse procedimento, a mistura foi deixada a temperatura ambiente, adicionado 10 mL de álcool etílico e agitado. Adicionou-se 50mL da solução de éter de petróleo e éter etílico (1+1), tampado e agitado por 30 segundos. Após a saída dos vapores, lavou-se a tampa com pequenas porções de solução de éter de petróleo e éter etílico (1+1), transferindo-se para dentro do frasco a gordura e partículas aderidas. A amostra permaneceu então em repouso até que o sobrenadante estivesse límpido. O sobrenadante foi filtrado sobre funil com algodão, para Erlenmeyer de 250mL previamente seco em estufa a 105 graus Celcius e tarado (Figura 5). O resíduo retido no funil foi lavado com solução de éter de petróleo e éter etílico (1+1) até que toda porção solúvel nessa solução fosse carregada para o Erlenmeyer.



**Figura 5:** Funil com o filtro de algodão e o sobrenadante retido.

As comparações entre os níveis de garantia dos rótulos e valores encontrados estão descritas na Tabela 2.

Tabela 3: Comparação entre nível de garantia de rótulo e resultados encontrados em análise do extrato etéreo por hidrólise ácida

<b>Extrato etéreo hidrólise ácida</b>		
<b>Produto</b>	<b>Garantia no produto (mínimo) (%)</b>	<b>Resultados Laboratoriais (%)</b>
SCaS1	85,00	85,00
SCaP1	84,00	81,00
SCaP2	82,00	81,00
SCaS2	82,00	80,00
ScaP3	82,50	84,00
AGHP	*	10,00

\*Produto não comercializado no Brasil, por isso, sem rótulo.

De acordo com Palmquist e Jenkins (2), rações para alta produção de leite (maior que 35 kg/dia) devem conter gordura suplementar para alcançar o elevado teor de energia líquida requerido. Os autores demonstram que 3 a 5% de gordura pode ser adicionada a dieta, visando aumentar a ingestão energética de vacas de alta produção e reduzir a ingestão de amido.

Apesar da possibilidade da inclusão de gordura na dieta de ruminantes, deve ser feita com cautela pois a ingestão energética excessiva leva a depressão na digestão de fibra, gordura no leite e acidose ruminal.

As fontes de gordura inertes (produtos) foram avaliadas em dietas com proporção de 60% de concentrado e 40% de volumoso, para vacas leiteiras, com produção de leite para 30 kg, formuladas para serem isoprotéicas e isoenergéticas. A composição bromatológica dos ingredientes utilizados na formulação e a proporção desses ingredientes usada nas dietas formuladas estão caracterizados na Tabela 3 e 4, respectivamente. A composição bromatológica da dieta está apresentada na Tabela 5.



**Tabela 4:** Composição bromatológica dos ingredientes usados na formulação da dieta dos grupos experimentais (valores expressos como porcentagem da matéria seca).

Parâmetros	Silagem de milho	Milho grão moído	Farelo de soja	Polpa cítrica
MS	91,5	93,09	90,16	86,95
PB, % MS	8,87	9,41	49,94	7,4
EE, % MS	6,9	6,83	1,65	2,41
FDN, % MS	39,5	15,15	17,02	22,37
FDA, % MS	19,1	2,76	7,58	14,65
LIG, % MS	2,52	0,56	0,52	3,51
MM, 5 MS	7,34	2,9	7,25	6,3

MS = matéria seca; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LIG = lignina; MM = matéria mineral

**Tabela 5:** Proporção de ingredientes na dieta total dos grupos experimentais (% da matéria seca).

Tratamentos	Grupos experimentais						
	OS	SCaS1	SCaS2	SCaP1	SCaP2	SCaP3	AGHP
Volumoso (40% da dieta, % MS)							
Silagem de milho *	40	40	40	40	40	40	40
Concentrado (60% da dieta % da MS)							
Milho grão moído	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0	40,0
Farelo de soja	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
Polpa cítrica	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0	13,0
Ureia	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Sulfato de amônia	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Mistura mineral**	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Inerte	3,40	3,50	3,40	3,53	3,53	3,59	3,70
Fontes de gordura (% da MS)							
Óleo de soja	3,60	-	-	-	-	-	-
Sais de cálcio de óleo de soja	-	3,58	3,60	-	-	-	-
Sais de cálcio de óleo de palma	-	-	-	3,47	3,47	3,41	-
Ácidos graxos hidrogenados de palma	-	-	-	-	-	-	3,03

**OS** = Óleo de soja; **SCaS1** e **SCaS2** = Sais de cálcio de óleo de soja; **SCaP1**, **SCaP2** e **ScaP3** = Sais de cálcio de óleo de palma; **AGHP** = Ácidos graxos hidrogenados de palma.

\* Composição por quilograma de produto: Cálcio-230 g, Fósforo-90 g, Enxofre-15 g, Magnésio-20 g, Cobre-700 mg, Zinco-2700 mg, Manganês-1250 mg, Cobalto-100 mg, Iodo-80 mg, Selênio-20 mg, Ferro -2000 mg. Fontes de gordura (% da MS) de acordo com a recomendação básica para inclusão de gordura inerte.

**Tabela 6:** Composição bromatológica das dietas dos grupos experimentais (valores expressos como porcentagem da matéria seca).

Parâmetros	Dietas						
	OS	SCaS1	SCaS2	SCaP1	SCaP2	SCaP3	AGHP
MS	91,38	91,94	91,38	92,16	91,94	92,23	87,34
PB, %MS	22,60	29,92	28,02	31,21	30,79	27,89	30,15
EE, %MS	3,61	3,97	3,54	3,57	3,52	3,85	4,06
FDN, %MS	37,92	35,95	35,17	35,76	36,35	36,23	37,97
FDA, %MS	16,52	15,82	15,66	15,41	15,78	15,90	16,02
LIG, %MS	3,56	2,46	3,18	2,62	2,84	2,27	2,59
MM, %MS	7,45	7,60	7,45	7,19	7,04	6,92	6,67

MS = matéria seca; PB = proteína bruta; EE = extrato etéreo; FDN = fibra em detergente neutro; FDA = fibra em detergente ácido; LIG = lignina; Ca= cálcio; P = fósforo; MM = matéria mineral

### 2.3 Tratamentos e delineamento experimental

O experimento foi composto por 14 tratamentos, ou seja, utilizou-se sete fontes de gordura (OS = Óleo de soja; SCaS1 e SCaS2 = Sais de cálcio de óleo de soja; SCaP1, SCaP2 e ScaP3 = Sais de cálcio de óleo de palma; AGHP = Ácidos graxos hidrogenados de palma) com uma inclusão de 3,0% de extrato etéreo da matéria seca da dieta formulada para vacas leiteiras, submetidas à fermentação ruminal *in vitro*, com dois níveis de pH (6,4 e 6,8).

Os tratamentos avaliados em fermentação *in vitro* de produção de gases foram dispostos em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições (garrafas), totalizando 42 unidades experimentais. Os tratamentos foram avaliados como parcelas subdivididas no tempo, de acordo com as horas de fermentação (0,3, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas).

### 2.4 Metodologia

As determinações da composição bromatológica da matéria seca, matéria mineral, lignina, hemicelulose, celulose, extrato etéreo e proteína bruta foram realizadas como descrito por Silva e Queiroz (52), e a matéria orgânica (MO) calculada a partir da diferença entre a MS e MM. As análises para

determinação dos teores de FDN e FDA [78] foram feitas em autoclave, conforme Pell e Schofield (53).

O pH das amostras foi determinado utilizando um peagâmetro com prévia calibração com soluções tampão padrões pH = 4,0 e pH = 7,0, conforme método 017/IV descrito em Instituto Adolf Lutz (54).

Na avaliação dos perfis acumulativos de produção de gases *in vitro* foi usada a técnica descrita por Theodorou et al. (55) com transdutor de pressão (Figura 6). O volume de gás foi obtido através da equação ( $R^2 = 0,999$ ):  $y = 0,2839 x$ . Onde “y” refere-se ao volume de gás (mL) e “x” é a pressão de gases medida em PSI (pressão por polegada quadrada), originada dos gases acumulados na parte superior dos frascos.



**Figura 6:** Leitura de pressão com manômetro.

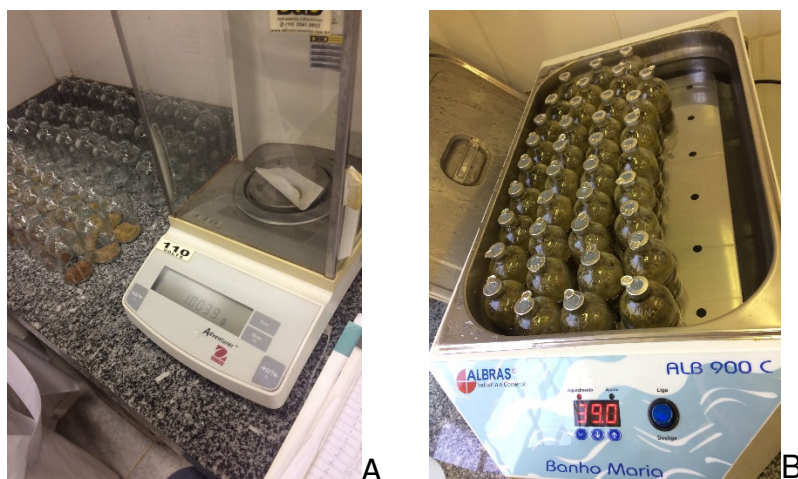
Dois bovinos adultos da raça Nelore, canulados no rúmen, do Departamento de Ciências Agrárias, FZEA-USP (Figura 7), foram utilizados como doadores de fluido ruminal, como inóculo. Os animais foram mantidos em pastagem e suplementados com silagem de milho e mistura mineral. O fluido ruminal colhido apresentou valor de pH de 6,5, as coletas ocorreram no período matutino, entre 8:00 e 9:00 horas.



**Figura 7:** Coleta de fluido ruminal.

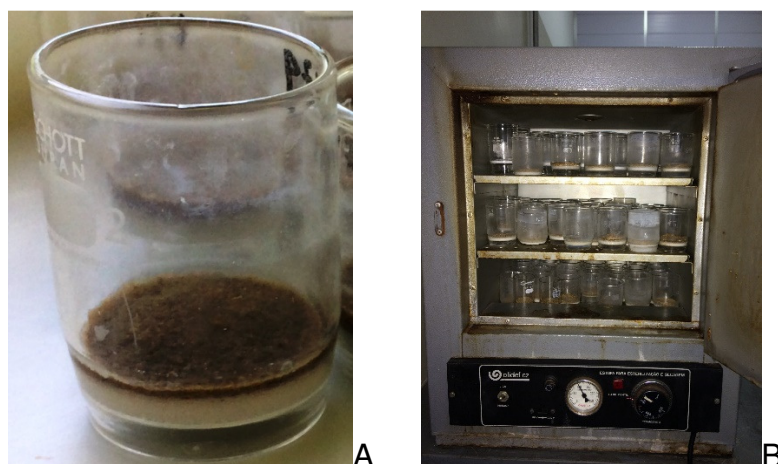
No dia anterior à incubação, as amostras foram pesadas (Figura 8A), em frascos de vidro de 160 mL. Para a incubação, foram adicionados às amostras 80 mL de solução de incubação (20 mL de líquido ruminal e 60 mL de solução tampão de Menke), de acordo com Longo et al. (56). As soluções de incubação foram mantidas em pH desejados para a condução experimental (6,4 e 6,8). Considerou-se o pH 6,5 como ideal em função do relatado por Mould et al. (57), sendo que esse valor de 6,5 é aproximadamente uma média para a atividade máxima da maior parte dos microrganismos, apesar de que alguns diferem dessa média. Para se obter solução de incubação com característica de pH desejados para a condução experimental (6,0 e 6,5), adotou-se critérios sugeridos e descritos por Kohn e Dunlap (1998), no entanto, o pH final da solução tampão foi de 6,4, para o que seria solução pH 6,0 e 6,8, para o que seria solução pH 6,5.

Após a adição das soluções de incubação às amostras, os frascos foram fechados com tampas de borrachas, lacrados com anéis de alumínio, homogeneizados por agitação manual e mantidos em banho-maria a 39°C (Figura 8B). Foram incluídos três frascos contendo as soluções de incubação, sem amostra, como prova em branco.



**Figura 8:** Pesagem das amostras nas garrafas de vidro (A) e incubação das garrafas em banho-maria à 39°C.

A digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) foi avaliada de acordo com Mauricio et al. (58), ao final de 6, 12, 24 e 48h de incubação da produção de gases *in vitro*. Os conteúdos de cada amostra incubada foram filtrados em cadinhos de Gooch, porosidade número 2 (40 a 100 micras) (Figura 9A) e o resíduo lavado com água destilada quente. Após esse procedimento os cadinhos foram armazenados em estufa a 105° C (Figura 9B) para determinar posteriormente DIVMS.



**Figuras 9:** Resíduo da digestibilidade *in vitro* filtrado no cadinho tipo Gooch (A) e secagem dos resíduos no cadinho em estufa a 105° C.

As digestibilidades da FDN e FDA foram analisadas adicionando solução de detergente neutro ao resíduo da DIVMS, resultando no resíduo em detergente neutro e a estimativa da DIVFDN (digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro). A este

resíduo foi adicionado solução de detergente ácido para posterior estimativa da DIVFDA (digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente ácido).

## **2.5 Análise estatística**

Os dados referentes composição centesimal das diferentes amostras foram submetidas as prerrogativas de normalidade (teste de Shapiro-Willk) e homogeneidade de variância (teste Levene). Quando estas prerrogativas não foram atendidas aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para confrontar as médias experimentais dentro e entre os momentos de avaliação ao nível de 95% de confiabilidade.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Determinação do pH do meio de fermentação “*in vitro*”

Pode-se observar que o meio da solução de incubação (nutritivo-tamponante) utilizado inicialmente em pH 6,4 e 6,8 foi eficaz na manutenção de valores pré-fixados mais baixo para caracterizar uma situação de pré-acidez ruminal e mais alto, próximo à alcalinidade, nas primeiras 6 horas de fermentação *in vitro* (Tabela 6).

Em 12 horas de fermentação, observou-se o mesmo comportamento, e, quando se comparou os tratamentos submetidos ao nível de pH diferente, observou-se que os únicos tratamentos destas duas faixas que apresentaram valor semelhante foram os com a presença de sal cálcico a base de palma (SCaP1 6,4) e ácidos graxos hidrogenados de palma (AGHP 6,8). Em 24 horas de fermentação, os menores valores continuaram a ser daqueles tratamentos submetidos ao meio de incubação com pH 6,4, no entanto, o tratamento SCaS2 6,4 (Sal cálcico a base de soja) foi semelhante aos tratamentos em meio de incubação 6,8, com exceção do SCaS2 6,8, com valor de 5,78, sendo esse tratamento com valor baixo de pH, em 48 horas de fermentação (Tabela 6).

Diante dos resultados observados pode-se inferir que com a inclusão de gorduras inertes na dieta, em meio de fermentação “*in vitro*” há queda no pH, porém esta é menos acentuada quando a gordura é introduzida em fluido com pH mais próximo da alcalinidade (6,8). Sabe-se que o pKa das gorduras protegidas está entre o pH 4,5 e 5,2 o que significa que neste pH metade dos sais cálcicos estão dissociados (ácido graxo se torna livre no rúmen) e metade ainda está ligado ao cálcio (inerte). No presente estudo, até 48 horas de fermentação não se observou valores de pH que levassem quadro de dissociação das gorduras inertes.

Ao comparar a variação do pH de um grupo experimental do nível de 6,4, ao longo do tempo, observou-se, de modo geral, que apenas uma das fontes de gordura inerte com sais cálcicos a base de palma (SCaP3 6,4), de óleo de



soja (SCaS1 6,4) e o hidrogenado de palma (AGHP 6,4) apresentaram valores maiores do pH em 6 horas de fermentação, em comparação aos demais horários ( $P < 0,05$ ). Para a fonte óleo de soja (OS 6,4) e sais cálcicos a base de palma (SCaP2 6,4) não houve variação significativa do pH ao longo do tempo. Para SCaS2 6,4, o pH elevou-se apenas as 24 horas e diminuiu significativamente as 48 horas de fermentação (Tabela 6).

Quanto ao pH do meio de fermentação de 6,8, as fontes de gordura inerte com sais cálcicos a base de palma (SCaP3 6,8), de óleo de soja (SCaS2 6,8), o hidrogenado de palma (AGHP 6,8) e o óleo de soja (OSOJ 6,8) apresentaram valores maiores do pH em 6 horas de fermentação, em comparação aos demais horários ( $P < 0,05$ ). A fonte SCaS1 6,8 proporcionou pH maior as 6h e o menor as 48 h, no entanto, sem diferença significativa destes horários com os de 12 e 24h. As fontes SCaP1 6,8 e SCaP2 6,8 proporcionaram elevados valores de pH até 12h.

A gordura de palma tem pKa de 4,6 ou seja, em pH ruminal com característica de acidose, não haverá grande dissociação de ácidos graxos no rúmen. O pKa da gordura de soja, por exemplo, é próximo do pH 5,2, o que faz com que este produto seja mais dissociável em pH mais alto (59).

Diante deste cenário, os resultados obtidos confirmam as referências da literatura (60) de que as fontes de gordura inerte, em pH próximo a neutralidade passam inerte pela fermentação ruminal e, sendo dissociada apenas em faixa de pH próxima a do abomaso ( $\text{pH} = 2$  a  $3$ ), disponibilizando os ácidos graxos para a absorção.

Em sistemas de produção de leite, por exemplo, as dietas de vacas de alta produção, mesmo balanceadas para adequada fermentação ruminal, podem causar intensa redução do pH em determinados momentos do dia. Os valores de pH oscilam normalmente entre 6,5 e 5,8 após as refeições. As alterações no pH desafiam as populações de bactérias e outros microrganismos e impedem a completa hidrogenação dos ácidos graxos insaturados. Sendo assim, com o conhecimento do comportamento das fontes de gordura inerte ou livre, como é o caso do óleo de soja frente à variação de pH obtido neste estudo, pode-se

estabelecer estratégias nutricionais para o melhor aproveitamento das fontes de gordura para a nutrição animal que estão disponíveis no mercado.

**Tabela 7:** Resultados médios dos valores de pH do meio de fermentação *in vitro* dos grupos experimentais (tratamentos), nos tempos de 06, 12, 24 e 48 horas de incubação (período experimental).

Grupos Experimentais	pH/ Período Experimental <sup>1</sup>							
	06:00		12:00		24:00		48:00	
ScaP3 6,4	6,37	Ba	6,10	Fb	5,85	CDc	5,65	Fd
ScaS1 6,4	6,40	Ba	6,16	Fb	5,83	CDc	5,67	EFc
ScaP1 6,4	6,43	Ba	6,39	DEa	5,94	Cb	5,80	CDEFc
ScaS2 6,4	6,34	Bb	6,21	EFb	6,62	ABa	5,79	DEFc
ScaP2 6,4	6,39	Ba	6,04	Fa	5,89	CDa	6,28	ABCDa
AGHP 6,4	6,30	Ba	6,03	Fb	5,83	CDc	5,82	BCDEFc
OSOJ 6,4	6,32	Ba	6,05	Fa	5,84	CDa	6,22	ABCDEa
ScaP3 6,8	6,98	Aa	6,89	ABb	6,57	Bc	6,39	Ad
ScaS1 6,8	6,85	Aa	6,81	ABab	6,51	Bab	6,37	ABb
ScaP1 6,8	7,02	Aa	6,97	ABa	6,54	Bb	6,55	Ab
ScaS2 6,8	7,02	Aa	6,82	ABb	5,78	Cc	5,64	Fd
ScaP2 6,8	6,98	Aa	7,02	Aa	6,52	Bb	6,36	ABCc
AGHP 6,8	6,82	Aa	6,58	CDb	6,53	Bb	6,51	Ab
OSOJ 6,8	7,06	Aa	6,79	BCb	6,73	Ab	6,49	Ac

Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey\* ou Kruskal-Wallis\*\* ( $P \geq 0,05$ )

**SCaP3 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 3; **SCaS1 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de soja 1; **SCaP1 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 4; **SCaS2 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de soja 2; **SCaP2 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 2; **AGHP 6,4** - pH 6,4 - Ácidos graxos hidrogenados de palma; **OSOJ 6,4** - pH 6,4 - Óleo de soja; **SCaP3 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 3; **SCaS1 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de soja 1; **SCaP1 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 1; **SCaS2 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de soja 2; **SCaP2 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 2; **AGHP 6,8** - pH 6,8 - Ácidos graxos hidrogenados de palma; **OSOJ 6,8** - pH 6,8 - Óleo de soja

### 3.2 Determinação da digestibilidade “*in vitro*” da matéria seca das dietas com diferentes fontes de gordura

No período experimental de 6 horas observou-se que a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) apresentou valores superiores nos tratamentos SCaP3 6,8, SCaS1 6,8, SCaP1 6,8, SCaS2 6,8 em relação aos tratamentos SCaP3 6,4, SCaS1 6,4, SCaP1 6,4, SCaS2 6,4, o que indica que o pH influenciou significativamente este parâmetro do que as diferenças entre as fontes de

gordura na dieta. O menor valor de digestibilidade foi observado no tratamento com a fonte de ácidos graxos hidrogenados de palma em pH 6,4 ( $P < 0,05$ ) (Tabela 7).

O mesmo comportamento da influência do pH sobre a DIVMS das dietas com as diferentes fontes de gordura foi observado nos demais períodos experimentais, principalmente em 24 e 48 horas de fermentação.

Para cada grupo experimental, a DIVMS foi maior no período de 48 horas, em relação aos demais períodos, com exceção de SCaS2 6,4 e OSOJ 6,4, cujas digestibilidades foram semelhantes em 24 e 48 horas.

Tabela 8: Resultados médios dos valores de digestibilidade *in vitro* matéria seca (DIVMS) em meio de fermentação *in vitro*, nos tempos de 06, 12, 24 e 48 horas de incubação.

Grupos Experimentais	DMS/ Período Experimental <sup>1</sup>							
	06:00		12:00		24:00		48:00	
SCaP3 6,4	30,14	DCc	28,38	Fc	40,99	Cb	55,49	Ba
SCaS1 6,4	28,32	Db	41,70	CDa	43,54	Da	51,38	Ba
SCaP1 6,4	27,96	DEd	33,38	EFc	43,87	Db	51,13	BCa
SCaS2 6,4	28,27	Dc	35,66	DEb	49,07	Ca	53,33	Ba
SCaP2 6,4	32,61	ABCc	36,05	DEc	45,71	CDb	53,07	Ba
AGHP 6,4	24,41	Ed	35,19	Ec	43,98	Cb	53,46	Ba
OSOJ 6,4	30,58	BCDc	36,25	DEb	45,23	CDa	45,79	Ca
SCaP3 6,8	34,26	ABd	45,03	BCc	61,80	ABb	72,21	Aa
SCaS1 6,8	33,57	ABCd	46,85	BCc	59,95	Bb	68,59	Aa
SCaP1 6,8	35,32	Ad	48,55	Bc	65,30	Ab	68,44	Aa
SCaS2 6,8	35,78	Ad	49,04	ABc	60,81	ABb	70,51	Aa
SCaP2 6,8	36,02	Ad	55,22	Ac	64,53	ABb	72,72	Aa
AGHP 6,8	33,31	ABCd	51,20	ABc	62,95	ABb	70,12	Aa
OSOJ 6,8	35,84	Ad	49,37	ABc	63,37	ABb	70,93	Aa

Valores seguidos pela letra mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey\* ou Kruskal-Wallis\*\* ( $P \geq 0,05$ )

**SCaP3 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 3; **SCaS1 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de soja 1; **SCaP1 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 4; **SCaS2 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de soja 2; **SCaP2 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 2; **AGHP 6,4** - pH 6,4 - Ácidos graxos hidrogenados de palma; **OSOJ 6,4** - pH 6,4 - Óleo de soja; **SCaP3 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 3; **SCaS1 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de soja 1; **SCaP1 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 1; **SCaS2 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de soja 2; **SCaP2**

**6,8** – pH 6,8 – Sal cálcico a base de palma 2; **AGHP 6,8** – pH 6,8 - Ácidos graxos hidrogenados de palma; **OSOJ 6,8** – pH 6,8 – Óleo de soja

Pode-se notar que não houve grande influência da fonte de gordura inerte na digestão de matéria seca, o que está de acordo com dados apresentados em estudos de Wu e Palmquist, (61).

Wu et al. (62) avaliaram a gordura inerte (sais cálcicos de óleo de palma), sebo ou ácidos graxos cristalizados (*prilled fat*) em nível de 2,5% sobre uma dieta com 3,7% de ácidos graxos, contendo 7,2% de semente de algodão inteira, fornecida a vacas Holandês em lactação. Nesse estudo, os resultados demonstraram que a suplementação lipídica não afetou a digestibilidade da MS ou da FDN (digestibilidade aparente média: MS = 63,20%; FDN = 38,02%).

### **3.3 Digestibilidade “*in vitro*” da fibra em detergente neutro (DIVFDN) e em detergente ácido (DIVFDA) das dietas com diferentes fontes de gordura**

Em seis horas de fermentação *in vitro*, observou-se similaridade entre as digestibilidades das dietas dos grupos SCaS2 6,4, ScaP2 6,4, ScaP3 6,8, ScaS1 6,8, ScaP1 6,8, ScaP2 6,8, AGHP 6,8 e OSOJ 6,8, ressaltando que diante esse comportamento, encontram-se os grupos experimentais sob pH 6,4 e 6,8. Destaca-se que, nesse tempo, a maior DIVFDN foi observada no grupo ScaS2 6,8 em relação às menores nos grupos ScaS1 6,4 e A6HP 6,4 (Tabela 8).

Em 12, 24 e 48 horas de fermentação, pode-se observar que as diferenças mais significativas entre os grupos experimentais estão relacionadas ao pH do meio de fermentação e não com a fonte de gordura presente nas dietas. A DIVFDN em pH mais alto (6,8) foi maior do que nas dietas com as fontes de gordura em pH 6,4. O pH também demonstra ser o fator que mais afeta a DIVFDA (Tabela 9).

Tabela 9: Valores médios de digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente neutro (DIVFDN) em meio de fermentação nos tempos de 6, 12, 24, e 48 horas.

Grupos Experimentais	DFDN/ Período Experimental <sup>1</sup>							
	06:00		12:00		24:00		48:00	
ScaP3 6,4	10,87	EFc	13,77	Cb	17,03	Fa	8,69	Gb
ScaS1 6,4	5,61	Gc	13,79	Cb	25,91	Da	5,84	Gc
ScaP1 6,4	11,73	DEFc	6,24	Dd	25,11	DEa	23,59	Eb
ScaS2 6,4	14,56	ABCDc	8,40	CDd	24,56	DEb	29,59	Da
ScaP2 6,4	13,01	CDEb	13,20	Cb	25,45	DEa	26,90	DEa
A6HP 6,4	5,76	Gd	12,48	Cc	21,96	Eb	27,57	Da
OSOJ 6,4	9,14	Fd	11,48	CDc	25,78	Db	19,14	Fa
ScaP3 6,8	15,74	ABCc	25,43	Bb	48,63	BCa	51,32	Ca
ScaS1 6,8	13,60	ABCDEd	24,46	Bc	49,28	BCb	58,16	Ba
ScaP1 6,8	13,24	BCDEd	24,81	Bc	50,73	BCb	61,46	ABa
ScaS2 6,8	16,68	Ad	24,75	Bc	51,65	ABb	63,19	Aa
ScaP2 6,8	15,44	ABCd	33,22	Ac	55,05	Ab	62,19	Aa
A6HP 6,8	16,36	ABd	28,98	ABc	48,03	Cb	61,68	Aa
OSOJ 6,8	15,30	ABCc	30,30	ABb	49,95	BCa	51,21	Ca

Valores seguidos pela letra mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey\* ou Kruskal-Wallis\*\* ( $P \geq 0,05$ )

**SCaP3 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 3; **SCaS1 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de soja 1; **SCaP1 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 4; **SCaS2 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de soja 2; **SCaP2 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 2; **AGHP 6,4** - pH 6,4 - Ácidos graxos hidrogenados de palma; **OSOJ 6,4** - pH 6,4 - Óleo de soja; **SCaP3 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 3; **SCaS1 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de soja 1; **SCaP1 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 1; **SCaS2 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de soja 2; **SCaP2 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 2; **AGHP 6,8** - pH 6,8 - Ácidos graxos hidrogenados de palma; **OSOJ 6,8** - pH 6,8 - Óleo de soja

De acordo com Chandler (63) considera-se que uma fonte de gordura é relativamente inerte se, inclusive, a digestão da fibra não é alterada e, se não há redução considerável no consumo de alimentos e na produção de leite.

A significativa diferença entre os grupos experimentais em pH 6,4 e 6,8 (Tabela 8) pode ser devido à maior atividade dos microrganismos que digerem a fibra em níveis de pH próximo à neutralidade. Orskov (64) relatou que, em situações de pH abaixo de 6,2, ocorre redução na digestão da fibra, devido à sensibilidade das bactérias fibrolíticas, e o ponto ótimo da digestão da fibra

ocorre em valores de pH entre 6,7 e 7,1. Da mesma forma, Mertens (65) sugeriu que a digestão da fibra declinaria, quando o pH ruminal estivesse abaixo de 6,7.

Bateman e Jenkins (66) não observaram redução na digestibilidade da fibra ao usarem óleo de soja (gordura altamente insaturada) em nível de 8% da matéria seca da dieta.

Tabela 10: Resultados médios dos valores de digestibilidade *in vitro* da fibra em detergente ácido (DIVFDA) em meio de fermentação nos tempos de 6, 12, 24, e 48 horas.

Grupos Experimentais	DFDA/ Período Experimental <sup>1</sup>							
	06:00		12:00		24:00		48:00	
SCaP3 6,4	12,90	CDEc	18,74	Bb	24,00	Ga	19,41	Fb
SCaS1 6,4	13,07	CDEc	19,82	Bb	26,34	FGa	20,25	Fb
SCaP1 6,4	11,94	DEb	9,12	Cb	25,26	Ga	30,49	Da
SCaS2 6,4	15,78	ABCb	16,32	Bb	29,33	Ea	29,12	Da
SCaP2 6,4	16,36	ABCb	15,14	Bb	28,38	EFa	28,30	DEa
AGHP 6,4	10,82	Ec	15,97	Bb	24,24	Ga	26,74	DEa
OSOJ 6,4	16,07	ABCc	17,50	Bc	29,03	EFa	24,49	EFb
SCaP3 6,8	18,97	Ad	27,89	Ac	46,73	Db	50,90	Ca
SCaS1 6,8	15,68	ABCDd	30,26	Ac	49,11	BCDb	57,49	Ba
SCaP1 6,8	16,93	ABd	31,71	Ac	48,21	BCDb	61,98	ABa
SCaS2 6,8	19,46	Ad	31,68	Ac	50,84	ABb	64,06	Aa
SCaP2 6,8	19,32	Ac	32,28	Ab	52,77	Aa	59,23	ABa
AGHP 6,8	13,77	BCDEd	28,77	Ac	47,85	CDb	63,92	Aa
OSOJ 6,8	19,23	Ad	31,50	Ac	49,49	BCb	56,70	Ba

Valores seguidos pela letra mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey\* ou Kruskal-Wallis\*\* ( $P \geq 0,05$ )

**SCaP3 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 3; **SCaS1 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de soja 1; **SCaP1 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 4; **SCaS2 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de soja 2; **SCaP2 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 2; **AGHP 6,4** - pH 6,4 - Ácidos graxos hidrogenados de palma; **OSOJ 6,4** - pH 6,4 - Óleo de soja; **SCaP3 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 3; **SCaS1 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de soja 1; **SCaP1 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 1; **SCaS2 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de soja 2; **SCaP2 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 2; **AGHP 6,8** - pH 6,8 - Ácidos graxos hidrogenados de palma; **OSOJ 6,8** - pH 6,8 - Óleo de soja

### 3.4 Produção de gases “*in vitro*” na fermentação das dietas com diferentes fontes de gordura

As técnicas de produção de gases são utilizadas para estudar a cinética de fermentação de alimentos para ruminantes e é resultado da fermentação total do substrato e desaparecimento da matéria seca Bueno et al. (67).

A produção de gases em 6 horas de fermentação é um bom indicativo da extensão da fermentação dos carboidratos não estruturais e, adicionalmente, a produção em tempos superiores a 6, até 24 horas estimaria a fermentação dos carboidratos estruturais de uma dieta de alto consumo (68). Os carboidratos solúveis são mais rapidamente digeridos pelos microrganismos ruminais que os polissacarídeos estruturais, como a celulose e hemicelulose (69).

Neste estudo, os resultados do potencial de produção de gases e perfil da produção acumulada encontram-se descritos na Tabela 10 e 11, respectivamente.

Na avaliação do potencial de produção de gases, nos tempos de fermentação (Tabela 10), observou-se que o potencial fermentativo dos grupos experimentais avaliados foi em 24h de fermentação, com exceção do grupo OSOJ 6,8, que ocorreu em 18 horas.

Em 24 horas, os grupos experimentais das dietas com as fontes de gordura submetidos ao pH 6,8 SCaP3, SCaS1, SCaS2 e SCaP2, foram semelhantes entre si e apresentaram as maiores produções de gases. Sendo que os grupos SCaS1 e SCaP2 não diferiram dos grupos SCaP1 e AGHP. Ainda em 24 horas, os grupos submetidos ao pH 6,4 SCaP3, SCaS1, SCaP1, SCaS2, SCaP2 e OSOJ apresentaram produção de gases intermediárias. O grupo AGHP em pH 6,4 apresentou a menor produção de gases em relação aos demais, sendo semelhante aos grupos OSOJ, SCaP3 e SCaS1, todos em pH 6,4.

Na Tabela 8 são apresentados a produção acumulada de gases *in vitro* (mL/gMS) em relação ao tempo em 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas de fermentação, pelo teste de Kruskal-Wallis ( $p \geq 0,05$ ).





Quanto ao perfil acumulativo de gases em 48 horas, nota-se que as maiores produções foram nos grupos das dietas em pH 6,8 SCaP3, SCaS1 e SCaS2, sendo que o tratamento SCaS1 foi semelhante ao SCaP2. Neste mesmo período, os menores perfis puderam ser observados nos tratamentos submetidos ao pH 6,4 SCaP3, AGHP, OSOJ, sendo que o tratamento SCaP3 foi semelhante aos SCaS1, SCaP1, SCaS2 e SCaP2, todos em pH 6,4.

### **3.5 Equações de regressão para a produção parcial e acumulada de gases “*in vitro*”**

O volume de gases produzidos em função do potencial fermentativo das dietas e fontes de gordura avaliadas pode ser estimado indiretamente por equação de regressão a partir das leituras de pressão gerada dentro dos frascos. Desse modo, as equações de regressão preditas estão apresentadas nas Tabelas 12 e 13, para a produção parcial e acumulada, respectivamente.

A medida direta do volume restringe o número de amostras analisadas por experimento, e, às vezes, a acurácia das leituras, podendo comprometer a descrição da curva de fermentação (57). Em função disso, o desenvolvimento de uma equação de regressão estabelecendo a relação entre pressão e volume vem sendo praticado.

A equação estimada neste trabalho para a produção parcial dos gases apresentou um comportamento quadrático (Tabela 12), diferente do linear obtido para a produção acumulada de gases (Tabela 13).

O elevado coeficiente de determinação ( $r^2=0,99$ ) reflete a acurácia na estimativa do volume de gases produzidos a partir dos valores de pressão gerados durante o processo fermentativo. As equações de regressão da produção de gases apresentaram coeficientes de determinação relativamente baixos (Tabela 12), ao contrário, do que se pode observar para as equações da Tabela 13.

Diante deste resultado, pode-se inferir que o volume acumulado de gases produzidos durante a fermentação dos grupos experimentais utilizando-se a técnica *in vitro* de produção de gases, de acordo com a metodologia empregada e condições laboratoriais, foi estimado satisfatoriamente a partir dos dados de pressão, potencializando o uso desta técnica na avaliação de alimentos para ruminantes.

**Tabela 13:** Equações de regressão para a produção de gases *in vitro* (mL/g MS) das dietas com diferentes fontes de gordura.

Tratamentos	Equação de regressão da produção de gases	r	r <sup>2</sup>	P
ScaP3 pH 6,4	Gases = 6,97 + 0,91*Hora - 0,02*Horas <sup>2</sup>	0,74	0,55	<0,0001
ScaP3 pH 6,8	Gases = 11,30 + 1,75*Hora - 0,04*Horas <sup>2</sup>	0,77	0,59	<0,0001
ScaS1 pH 6,4	Gases = 7,06 + 0,92*Hora - 0,02*Horas <sup>2</sup>	0,72	0,53	<0,0001
ScaS1 pH 6,8	Gases = 10,89 + 1,69*Hora - 0,04*Horas <sup>2</sup>	0,78	0,60	<0,0001
ScaP1 pH 6,4	Gases = 7,54 + 1,06*Hora - 0,02*Horas <sup>2</sup>	0,80	0,64	<0,0001
ScaP1 pH 6,8	Gases = 9,66 + 1,31*Hora - 0,03*Horas <sup>2</sup>	0,71	0,50	<0,0001
ScaS2 pH 6,4	Gases = 9,44 + 0,97*Hora - 0,02*Horas <sup>2</sup>	0,76	0,58	<0,0001
ScaS2 pH 6,8	Gases = 10,41 + 1,97*Hora - 0,04*Horas <sup>2</sup>	0,81	0,66	<0,0001
ScaP2 pH 6,4	Gases = 10,75 + 0,90*Hora - 0,02*Horas <sup>2</sup>	0,72	0,51	<0,0001
ScaP2 pH 6,8	Gases = 8,65 + 1,67*Hora - 0,04*Horas <sup>2</sup>	0,77	0,60	<0,0001
A6HP pH 6,4	Gases = 7,55 + 0,66*Hora - 0,02*Horas <sup>2</sup>	0,69	0,48	<0,0001
A6HP pH 6,8	Gases = 7,40 + 1,72*Hora - 0,04*Horas <sup>2</sup>	0,83	0,70	<0,0001
OSOJ pH 6,4	Gases = 6,14 + 0,83*Hora - 0,02*Horas <sup>2</sup>	0,78	0,61	<0,0001
OSOJ pH 6,8	Gases = 8,34 + 1,34*Hora - 0,03*Horas <sup>2</sup>	0,75	0,57	<0,0001

R = ; r<sup>2</sup> = coeficiente de determinação; P = probabilidade; **SCaP3 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 3; **SCaS1 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de soja 1; **SCaP1 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 4; **SCaS2 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de soja 2; **SCaP2 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 2; **AGHP 6,4** - pH 6,4 - Ácidos graxos hidrogenados de palma; **OSOJ 6,4** - pH 6,4 - Óleo de soja; **SCaP3 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 3; **SCaS1 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de soja 1; **SCaP1 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 1; **SCaS2 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de soja 2; **SCaP2 6,8** - pH 6,8 - Sal cálcico a base de palma 2; **AGHP 6,8** - pH 6,8 - Ácidos graxos hidrogenados de palma; **OSOJ 6,8** - pH 6,8 - Óleo de soja

**Tabela 14:** Equações de regressão para a produção acumulada de gases *in vitro* (mL/g MS) das dietas com diferentes fontes de gordura.

Tratamentos	Equação de regressão da produção de gases acumulado	r	r <sup>2</sup>	P
ScaP3 pH 6,4	Gases = 12,24 + 2,73*Hora	0,94	0,89	<0,0001
ScaP3 pH 6,8	Gases = 24,63 + 5,02*Hora	0,96	0,92	<0,0001
ScaS1 pH 6,4	Gases = 11,84 + 2,88*Hora	0,94	0,88	<0,0001
ScaS1 pH 6,8	Gases = 21,14 + 4,76*Hora	0,94	0,88	<0,0001
ScaP1 pH 6,4	Gases = 17,27 + 3,03*Hora	0,96	0,93	<0,0001
ScaP1 pH 6,8	Gases = 20,50 + 3,96*Hora	0,93	0,87	<0,0001
ScaS2 pH 6,4	Gases = 21,56 + 3,12*Hora	0,96	0,92	<0,0001
ScaS2 pH 6,8	Gases = 23,97 + 5,03*Hora	0,96	0,92	<0,0001
ScaP2 pH 6,4	Gases = 24,87 + 2,56*Hora	0,94	0,88	<0,0001
ScaP2 pH 6,8	Gases = 19,48 + 4,31*Hora	0,94	0,88	<0,0001
A6HP pH 6,4	Gases = 18,13 + 2,20*Hora	0,94	0,88	<0,0001
A6HP pH 6,8	Gases = 18,64 + 3,98*Hora	0,96	0,92	<0,0001
OSOJ pH 6,4	Gases = 14,75 + 2,29*Hora	0,94	0,87	<0,0001
OSOJ pH 6,8	Gases = 19,42 + 3,52*Hora	0,95	0,90	<0,0001

R = ; r<sup>2</sup> = coeficiente de determinação; P = probabilidade; **SCaP3 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 3; **SCaS1 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de soja 1; **SCaP1 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 4; **SCaS2 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de soja 2; **SCaP2 6,4** - pH 6,4 - Sal cálcico a base de palma 2; **AGHP 6,4** - pH 6,4 - Ácidos graxos hidrogenados de palma; **OSOJ 6,4** - pH 6,4 - Óleo de

soja; **SCaP3 6,8** – pH 6,8 – Sal cálcico a base de palma 3; **SCaS1 6,8** – pH 6,8 – Sal cálcico a base de soja 1; **SCaP1 6,8** – pH 6,8 – Sal cálcico a base de palma 1; **SCaS2 6,8** – pH 6,8 – Sal cálcico a base de soja 2; **SCaP2 6,8** – pH 6,8 – Sal cálcico a base de palma 2; **AGHP 6,8** – pH 6,8 - Ácidos graxos hidrogenados de palma; **OSOJ 6,8** – pH 6,8 – Óleo de soja

Deve-se ressaltar que o valor de probabilidade obtido (Tabela 12 e 13) foi inferior a 0,0001, apontando que há indícios suficientes de que o modelo das equações é adequado para descrever o fenômeno.

## 4. CONCLUSÕES

Os dados avaliados pelo presente estudo são insuficientes para concluir o nível de dissociação ruminal das gorduras inertes, porém a variação do pH indica que quando o pH inicial do meio de fermentação *in vitro* está mais próximo a neutralidade (6,8), há menos interferência das fontes de gordura nos subsequentes pHs.

As análises relacionadas a digestibilidade da matéria seca também demonstraram o mesmo comportamento. Não há interferência das fontes de gordura na digestibilidade de FDN e FDA em pHs 6,8 e 6,4.

As fontes de gordura proporcionam potencial de fermentação em 24 horas e são semelhantes entre si para os dois pHs avaliados, o que reflete na semelhança da produção de gases parcial e acumulada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASHES, J. R.; GULATI, S.; K. SCOTT, T. W. Potential to Alter the Content and Composition of Milk Fat Through Nutrition. **J Dairy Sci.** 80:2204 - 2212. 1997.
2. PALMQUIST, D. L., JENKINS, T. C. Fat in Lactation Rations. **J Dairy Sci.** 63:1-14. 1980.
3. DEVENDRA, C.; LEWIS, D. K. The interaction between dietary lipids and fiber in the sheep. **Animal Production.** V. 59, p. 67. 1974.
- 4 – UEDA, K.; FERLAY, A.; CHABROT, J.; LOOR, J. J.; CHILLIEARD, Y.; DERAU, M. Effects of linseed oil supplementation on ruminal digestion on dairy cows fed diets with different forage: concentrate ratios. **J Dairy Sci.** 86: 3999-4007. 2003.
- 5 – PALMQUIST, D. L. The feeding values of fats. Em: Orskov E. R. **World animal science.** B. Disciplinary approach. 4. Feed Science. Amsterdam: Elsevier, 1988, p. 239-311.
- 6 – BOCK, B. J.; D. L. HARMON, R.T.; BRANDT, JR.; SCHNEIDER J. E. Fat source and calcium level effects on finishing steer performance, digestion, and metabolism. **Journal of animal Science.** 69:2211. 1991.
- 7 – ZINN, R. A. Comparative feeding value of supplemental fat in finishing diets for feedlot steers supplemented with and without monensin. **Journal of Animal Science.** 67: 1038. 1988.
- 8 – IKWUGDU. O. A. SUTTON, J. D. The effect of varyng the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. **Br. J. Nutrition.** 48:365. 1982
- 9 - JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. **J Dairy Sci.** 76: 3851-3863. 1993.
- 10 - FIALHO, M. P. F; OLIVEIRA, V. Influência da suplementação com gordura no pós-parto de vacas. **Macal Nutrição Animal,** 2005. Disponível em: <<http://www.macal.com.br/uploads/1364850134.pdf>> Acesso em: 15 maio 2009.
- 11 - NUNES, I.J. **Nutrição Animal Básica.** 2.ed. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998.
- 12 - NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of dairy cattle. 7.ed. Washington, DC: **National Academy Press,** 2001. 381p.
- 13 - MATTOS, W.; PALMQUIST, D.L. Biohydrogenation and availability of linolenic acid in lactating cows. **Journal of Nutrition.**, n. p. - ,1977.
- 14 - KLUSMEYER, T. H.; KLARK, J. H. Effects of dietary fat and protein on fatty acids flow to the duodenum and in milk produced by dairy cows. **Journal of Dairy Science,** n. 74, p. 3055-3067, 1991.

15 –HIPPEN, A. R.; DE FRAIN, J. M.; LINKE, P. L. Glycerol and Other Energy Sources for Metabolism and Production of Transition Dairy Cows. Florida Ruminant Nutrition Symposium. 2008

16. T.R. DHIMAN; J. KLEINMANS; N.J. TESSMANN; H.D. RADLOFF; L.D. SATTE. Digestion and Energy Balance in Lactating Dairy Cows Fed Varying Ratios of Alfalfa Silage and Grain. **J dairy Sci.** 78: 330 – 341. 1995.

17. HUANG, Y; SCHOONMAKER, J. P.; BRADFORD B. J. SCHOONMAKER; B. J. BRADFORD; D. C. BEITZ. Response of Milk Fatty Acid Composition to Dietary Supplementation of Soy Oil, Conjugated Linoleic Acid, or Both. **J Dairy Sci.** 2008.

18 - SARTORI, R.; MOLLO, M.R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, n. 31, p. 197-204, 2007.

19 - J.R. ASHES, S.K. GULATI, T.W. SCOTT. Potential to Alter the Content and Composition of Milk Fat Through Nutrition. **J dairy Sci.** 80: 2204 – 2212. 1997

21 - CHALUPA, W.; VECCHIARELLI, B.; ELSER, A. E.; KRONFELD, D. S.; SKLAND D.; PALMQUIST, D. L. Ruminant fermentation in vivo as influenced by long-chain fatty acids. **J Dairy Sci.** 69: 1293-1301, 1986.

22 - ASCHENBACH, J. R.; PENNER, G. B.; STUMPF, F.; GABEL, G. Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. **Journal of Animal Science.** V 89, p. 1092-1107. 2011

23 - THEURER, M. L.; MCGUIRE, M. A.; SANCHEZ, W. K. Sais de cálcio de ácidos graxos poli-insaturados fornecem mais EFA para vasa em lactação. **Pacific Northwest Nutrition Conference.** 2002.

24 - FRANCO, M. Gordura protegida é boa fonte de energia. **Revista DBO.** Ano 26, n 321, p. 45. 2007.

25 - SOLORZANO, L. C.; KERTZ, A. F. Rumen Inert fat supplements reviewed for dairy cows. **Feedstuffs.** V. 77. N. 11. 2005.

26 - ALVES FILHO, D. C. **Manipulação da composição da gordura do leite.** 2005. Disponível em: <[http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/gordura\\_leite.pdf](http://www6.ufrgs.br/bioquimica/posgrad/BTA/gordura_leite.pdf)> Acesso em: 10 maio 2009.

27 - SANTOS, J. E. P. **Efeitos da nutrição na reprodução bovina,** [2000]. Disponível em <<http://www.unitins.br/ates/arquivos/Pecu%C3%A1ria/Bovinocultura/Reprodu%C3%A7%C3%A3o%20Bovina%20-%20Efeitos%20da%20Nutri%C3%A7%C3%A3o.doc>> Acesso em 12 maio 2009.

28 - PERES, J. R. **Fornecimento de gordura para vacas a pasto em início de lactação.** 2002. Disponível em <<http://www.milkpoint.com.br/?noticialID=15909&actA=7&areaID=61&secaoID=176>> Acesso em: 10 maio 2009.

- 29 - WEST, J. W.; HILL, G. M. Effect of a protected fat product on productivity of lactating holstein and jersey cows. **J Dairy Sci.** 73: 3200-3207, 1990.
- 30 - VILELA, D; ALVIM, M. J.; MATOS, L. L.; MATIOLLI, J. B. Utilização de gordura protegida durante o terço inicial da lactação de vacas leiteiras em pastagem de coast-cross. **Pesq. Agropec. Bras.** . Brasília. v. 37, n. 10, p. 1503-1509. 2002.
- 31 - CHILLIARD, Y. Dietary fat and adipose tissue metabolism in ruminants, pigs, and rodents: a review. **J Dairy Sci.** 76: 3897-3931. 1993.
- 32 - DRACKLEY, J. K.; CICELA, T. M.; LACOUNT, D. W. Responses of primiparous and multiparous holstein cows to additional energy from fat or concentrate during summer. **J. Dairy Sci.** 86: 1306–1314. 2002.
- 33 - ARM & HAMMER. Apostila técnica Megalac-E. Disponível em: <<http://www.qgn.com.br/Nutricao-Animal/Bovinos-de-leite/Trabalhos-Tecnicos/Apostila-Tecnica-Megalac-E>> Acesso em: 12 maio 2009.
- 34 - BUTLER, W. R.; SMITH, R. D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. **J Dairy Sci.** 72: 767-783, 1989.
- 35 - STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; THATCHER, W. W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **J Dairy Sci.** 81: 856–871. 1998.
- 36 - LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; MICHEL, F. M.; THARCHER, W. W.; BOLT, D. J. Effect of feeding calcium soaps to early postpartum dairy cows on plasma prostaglandin F<sub>2</sub> alfa luteinizing hormone, and follicular growth. **J Dairy Sci.** 74: 483-489. 1991.
- 37 - G.E. HAWKINS, J.A. LITTLE. Response of Steers to Two Levels of Saliva Added Intraruminally. **J Dairy Sci.** 58: 1817-1822. 1998.
- 38 - SPICER, L. J.; VERNON, J. K.; TUCKER, W. B.; WEITEMANN, R. P.; HOGUE, J. F.; ADAMS, O. D. Effects of inert fat on energy balance, plasma concentrations of hormones, and reproduction in dairy cows. **J Dairy Sci.** 76: 2664-2673. 1993.
- 39 - FERREIRA, A. M. Nutrição e atividade ovariana em bovinos: uma revisão. **Pesq. Agropec. Bras.** v. 28, n. 9, p. 1077-1093, 1993.
- 40 - SANTOS, J. E. P., SÁ FILHO, M. F. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycle and embryonic survival in lactating dairy cows. **Animal Reproductive Science.** V. 110 n. 3-4 p 207-221, 2009.
- 41 - WILLIAMS, G. L.; STANKO, R.L. Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle. **J Anim Sci.** 77: 1-12, 1999.
- 42 - LAMMOGLIA, M.A.; BELLOWS, R.A.; GRINGS, E.E. et al. Effects of dietary fat and sire breed on puberty, weight, and reproductive traits of F1 beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.78, p.2244-2252, 2000.

- 43 - BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Energy balance, metabolic hormones, and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. **J Dairy Sci.** 81: 121–131, 1998.
- 44 - STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W.; CLARK, J. H. Relationship between the early postpartum ovarian activity and energy status during period of high producing dairy cows. **J Dairy Sci.** 73: 938-947. 1990.
- 45 - SALLA, L.E.; FISCHER, V.; FERREIRA, E.X. et al. Comportamento ingestivo de vacas Jersey alimentadas com dietas contendo diferentes fontes de gordura nos primeiros 100 dias de lactação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.3, p.683-689, 2003.
- 46 - BUTLER, W. R.; EVERETT, R. W.; COPPOCK, C. E. The relationship between energy balance, milk production and ovulation in postpartum holstein cows. *Journal of Animal Science.* v. 53, n. 3, 1981.
- 48 - THOMAS, M.G.; WILLIAMS, G.L. Metabolic hormone secretion and FSH-induced superovulatory responses of beef heifers fed dietary fat supplements containing predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. **Theriogenology.** v. 45, p. 451-458, 1995.
- 49 - ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; D'ERCOLE, A.J. et al. Insulin-like growth factors as intraovarian regulators of granulosa cell growth and function. **Endocrine Reviews.** 6:400-420, 1985.
- 50 - MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.
- 51 - COMPÊNDIO BRASILEIRO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. São Paulo: **Sindirações. 2013.** BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Instrução Normativa n. 30 de 07/08/2009.
- 52 - SILVA, D. J.; QUEIROZ, A. C. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos** 3. ed. Viçosa, MG:UFV, 2006. 235p
- 53 - PELL, A.N.; SCHOFIELD, P. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion in vitro. **J Dairy Sci.**76: 1063-1073. 1993.
- 54 – INSTITUTO ADOLF LUTZ
- 55 - THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S.; MCALLAN, A.B. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.48, n. 1, p.185-197, 1994.
- 56 - LONGO, C.; BUENO, I.C.S.; NOZELLA, E.F.; GODDOY, P.B.; CABRAL FILHO, S.L.S; ABDALLA, A.L. The influence of head-space and inoculum dilution on in vitro ruminal methane measurements. **International Congress Series**, Amsterdam, v. 1293, p. 65-65, 2006.



- 57 - MOULD, F.L.; ØRSKOV, E.R.; MANN, S.O. Associative effects of mixed feeds. 2. The effect of dietary additions of bicarbonate salts on the voluntary intake and digestibility of diets containing various proportions of hay and barley. **Animal Feed Science and Technology**, v.10, p.15-25, 1983.
- 58 - MAURICIO, R.M.; PEREIRA, L.G.R.; GONÇALVES, L.C. Potencial da Técnica in Vitro Semi-Automática de Produção de Gases para Avaliação de Silagens de Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.4, p.1013-1020, 2003.
- 59 - NETO, J. F., MOURA, M. T., 2012. Gordura Protegida: 30 anos no mercado sempre com as mesmas dúvidas. Disponível em: <[www.holandeparana.com.br/artigos/ArtigoGPNT032012.pdf](http://www.holandeparana.com.br/artigos/ArtigoGPNT032012.pdf)>. Acesso em: 14 de Dezembro de 2016.
- 60 - CHURCH e DWIGHT C. O. Megalac-R, rumen bypass fat. EFA Alert Research Summary. 28 p. 2002.
- 61 - Z. Wu, D.L. Palmquist. Synthesis and Biohydrogenation of Fatty Acids by Ruminal Microorganisms In Vitro. **J Dairy Sci**. 74: 3035–3046. 1991
- 62 - WU, Z.; HUBER, J.T.; SLEIMAN, F.T. et al. Effect of three supplement fat sources on lactation and digestion in dairy cows. **J Dairy Sci**. 76: n.11, p.3562-3570, 1993.
- 63 - CHANDLER, P. Digestibility of fat sources for dairy cows. **Feedstuffs**, v. 65, n.15, p.1-3, 1993
- 64 - ØRSKOV, E.R. Nutricion proteica de los ruminantes. Saragoza: **Acribia**, 1988. p. 178.
- 65 - MERTENS, D.R. Análise da fibra e sua utilização na avaliação de alimentos e formulação de rações. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE RUMINANTES, REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 29, 1992, Lavras. Anais... Lavras: SBZ, p.188-219, 1992.
- 66 - BATEMAN II, H.G.; JENKINS, T.C. Influence of soybean oil in high fiber diets fed to nonlactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. **J Dairy Sci**. 81: 2451-2458. 1998.
- 67 - BUENO, I. C. S.; FILHO, S. L. S; GOBBO, S. P. LOUVANTINI, H.; VITTI, D. M. S. S; ABDALLA, A. L. Influence of inoculum source in a gas production method. **Animal feed science and technology**, Amsterdam, v.123-124, n. 1-2, p.95-105, 2005.
- 68 – E.R. ØRSKOV, W.P. FLATT, P.W. MOE. Fermentation Balance Approach to Estimate Extent of Fermentation and Efficiency of Volatile Fatty Acid Formation in Ruminants. **J Dairy Sci**. 51: 1429-1435. 1968
- 69 - STEFANON, B., PELL, A.N., SCHOFIELD, P. 1996. Effect of maturity on digestion kinetics of water-soluble and waterinsoluble fractions of alfafa and brome hay. **Journal of Animal Science**., v.74, n.5, p.1104-1115.