



## Perfil de ácidos graxos do leite de vacas Holandês x Gir alimentadas com silagem de milho e concentrado contendo ou não glicerina bruta

[Milk fatty acid profile from Holstein x Gyr cows fed corn silage and concentrate containing or not crude glycerin]

A.C.A. Duque<sup>1</sup>, J.S. Oliveira<sup>2</sup>, M.J.F. Morenz<sup>2</sup>, M.A.S. Gama<sup>2</sup>,  
A.L.C.C. Borges<sup>1</sup>, R.R. Silva,<sup>1</sup> F.C.F. Lopes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Escola de Veterinária - Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, MG

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora, MG

### RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de ácidos graxos (AG) do leite de vacas alimentadas com dietas à base de silagem de milho contendo 0% e 8,9% de glicerina bruta (GB) na matéria seca (MS). Foram utilizadas 18 vacas Holandês x Gir com 48±18 dias em lactação, produzindo 19,8±4,9kg/dia de leite. Utilizou-se delineamento de blocos ao acaso, com nove vacas/tratamento e duas medidas repetidas no tempo, com os resultados analisados por modelos mistos. A inclusão de GB na dieta não alterou a ingestão de MS, mas reduziu os consumos dos AG oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico. Os teores dos AG mirístico, palmítico, rumênico, vacênico, esteárico, oleico, linoleico,  $\alpha$ -linolênico e CLA *trans*-10 *cis*-12 na gordura do leite foram semelhantes entre dietas. A inclusão de GB reduziu os teores dos AG eláidico e C18:1 *trans*-10 e aumentou os teores dos AG de cadeia ímpar linear e do ácido láurico. Não houve efeito da inclusão da GB sobre os índices de aterogenicidade e trombogenicidade da gordura do leite. Concluiu-se que a inclusão de glicerina bruta em dieta à base de silagem de milho não afetou a qualidade nutricional da gordura do leite de vacas Holandês x Gir.

Palavras-chave: ácido rumênico, ácido vacênico, biodiesel, coproduto, glicerol

### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the milk fatty acid (FA) composition of cows fed corn silage-based diets containing 0% and 8.9% of crude glycerin (GB) on a dry matter (DM) basis. Eighteen Holstein x Gyr cows with 48±18 days in milk and producing 19.8±4.9kg milk/day were used in the study. The experimental design was a randomized block with nine cows per treatment and two repeated measures. Results were analyzed using mixed models. The milk fat contents of myristic, palmitic, rumenic, vaccenic, stearic, oleic, linoleic,  $\alpha$ -linolenic, and *trans*-10 *cis*-12 CLA were similar between diets. Dietary inclusion of GB decreased elaidic and *trans*-10 C18:1, and increased lauric acid and odd linear-chain FA contents in milk fat. Both atherogenicity and thrombogenicity indices were unaffected by GB inclusion. It was concluded that GB inclusion in corn silage-based diets had no effect on the nutritional quality of milk fat from Holstein x Gyr dairy cows.

Keywords: biodiesel, byproduct, glycerol, rumenic acid, vaccenic acid

### INTRODUÇÃO

A descoberta dos benefícios à saúde humana de ácidos graxos (AG) biologicamente ativos presentes na gordura do leite integral e dos seus derivados tem motivado a realização de pesquisas no Brasil e no mundo, visando ao

enriquecimento natural desses alimentos com tais compostos. Dois dos principais AG com comprovada relevância para a saúde humana e presentes na fração lipídica do leite são: o ácido rumênico (CLA *cis*-9 *trans*-11), isômero de CLA (ácido linoleico conjugado) majoritário no leite de ruminantes, com propriedades anticarcinogênicas, antidiabetogênicas (diabetes

do tipo 2), antiaterogênicas e imunomodulatórias (Yang *et al.*, 2015); e o ácido vacênico (C18:1 *trans*-11), responsável por 64% a 97% do ácido rumênico do leite bovino (Shingfield *et al.*, 2010). Portanto, leites e derivados enriquecidos com esses dois AG, além de outros também importantes para a saúde, como os ácidos oleico (C18:1 *cis*-9) e  $\alpha$ -linolênico (C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15), são desejáveis para o consumo humano, sendo considerados alimentos funcionais de elevado valor agregado.

Atualmente no Brasil, o percentual de inclusão de biodiesel ao óleo diesel vendido ao consumidor final é de 8%, mas o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel prevê a obrigatoriedade da adição de 10% a partir de 2019 (Brasil, 2016). Em consequência, projeta-se que haverá, no mercado brasileiro, maior oferta de glicerina bruta (GB), que é o principal coproduto do processo de fabricação do biodiesel. A viabilidade técnica da substituição do milho por GB como ingrediente energético na dieta de vacas em lactação tem sido bastante pesquisada no Brasil (Pimentel *et al.*, 2014; Ezequiel *et al.*, 2015; Paiva *et al.*, 2016), sendo a adoção dessa estratégica nutricional função da relação de preços vigente entre eles.

No entanto, no Brasil há somente dois estudos de avaliação do perfil de AG do leite de vacas alimentadas com dietas contendo GB, embora em um deles (Meneses *et al.*, 2015) tenha-se utilizado GB de baixa pureza (51,8% de glicerol e 36,7% de lipídeos), que desempenhou papel de suplemento lipídico, sendo seus elevados teores dos ácidos linoleico (C18:2 *cis*-9 *cis*-12) e oleico (respectivamente, em média, 45,7% e 22,3%) os principais responsáveis pelas alterações obtidas no perfil de AG do leite. Já Ezequiel *et al.* (2015) avaliaram a inclusão de 15% e 30% de GB (83% de glicerol) na matéria seca (MS) de dietas compostas por 45% de silagem de milho e 55% de concentrados e relataram incrementos lineares ( $P < 0,05$ ) nos teores dos ácidos láurico (C12:0) e rumênico, bem como nos de vários AG de cadeia ímpar linear no leite, em resposta à suplementação das dietas com GB.

No entanto, outros AG de interesse para a saúde humana (*e.g.* ácido vacênico e outros AG C18:1 *trans*) não foram reportados por Ezequiel *et al.* (2015). Objetivou-se avaliar o perfil de AG do leite de vacas alimentadas com dietas baseadas em silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta.

## MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado de julho a novembro de 2010, no Campo Experimental José Henrique Bruschi (Coronel Pacheco, MG) da Embrapa Gado de Leite. Foram utilizadas 18 vacas Holandês x Gir, múltíparas, no terço inicial de lactação ( $48 \pm 18$  dias), com peso corporal de  $554 \pm 48$ kg, e produzindo  $19,8 \pm 4,9$ kg/dia de leite com 4,0% de gordura, 3,4% de proteína e 12,9% de sólidos totais. Os procedimentos experimentais utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Protocolo Cetea nº 216/2010). Foram avaliadas duas dietas formuladas com silagem de milho suplementada com concentrados contendo ou não glicerina bruta (GB). Os tratamentos basearam-se na substituição parcial do amido do milho moído do concentrado pelo glicerol da GB (86,9% de MS; 80,2% de glicerol; 5,6% de NaCl; 0,02% de metanol), a qual foi proveniente da produção de biodiesel a partir de óleo de soja (ADM – Archer Daniels Midland Company Ltda., Rondonópolis, MT, Brasil).

As dietas experimentais foram formuladas para atender aos requerimentos nutricionais, de acordo com o NRC (Nutrient..., 2001), para vaca de 550kg de peso corpóreo, produzindo 20kg/dia de leite com 3,5% de gordura, sem alteração do peso corporal. As dietas com 0% e 8,9% de GB apresentaram, em média, respectivamente (base MS): 36,8% e 36,7% de fibra em detergente neutro (FDN); 28,2% e 21,3% de amido; 14,6% e 15,4% de proteína bruta (PB); 3,5% e 4,0% de extrato etéreo (EE); e 71,8% e 72,2% de digestibilidade *in vitro* da MS. Os suplementos concentrados foram formulados com milho moído, farelo de soja, farelo de trigo e mistura mineral-vitamínica (Top Milk Núcleo, Matsuda, Álvares Machado, SP, Brasil), além da GB (Tab. 1).

Tabela 1. Composição centesimal e química dos concentrados formulados com inclusão ou não de glicerina bruta

Ingrediente (% da matéria seca)	Concentrado	
	Sem glicerina bruta	Com glicerina bruta
Farelo de soja	44,9	49,9
Milho moído	35,1	8,3
Glicerina bruta	0,0	22,1
Farelo de trigo	14,0	13,9
Top Milk Núcleo <sup>1</sup>	4,1	4,0
Calcário	0,7	0,7
Sal branco	1,1	1,1
Composição química (% da matéria seca)		
Proteína bruta	26,2	28,8
Fibra em detergente neutro	18,6	17,7
Extrato etéreo	3,1	1,8
Glicerol	0,6	16,1
Digestibilidade <i>in vitro</i> da matéria seca (%)	85,0	86,4

<sup>1</sup>Níveis de garantia por kg de produto: Ca= 255 a 268g; P= 76g; S= 20g; Mg= 30g; Co= 60mg; Cu= 850mg; I= 65mg; Mn= 2.000mg; Se= 20mg; Zn= 6.000mg; Fe= 1.000mg; F= 760mg; vitamina A = 220.000UI; vitamina E = 500UI.

Foi utilizado delineamento de blocos ao acaso, com nove vacas por tratamento e duas medidas repetidas no tempo. As vacas foram distribuídas nos blocos com base na produção de leite e no peso corpóreo, observados em período pré-experimental, bem como na ordem de parição e no grau de sangue, que variou de 1/2 a 7/8 Holandês x Gir. O período experimental total foi de 64 dias, sendo os dois períodos de amostragem, com duração de nove dias cada, realizados do 24<sup>o</sup> ao 32<sup>o</sup> dia e do 56<sup>o</sup> ao 64<sup>o</sup> dia.

As vacas permaneceram em curral do tipo *free-stall*, com disponibilidade de água e mistura mineral. As dietas foram fornecidas *ad libitum* (10% de sobras), uma vez ao dia, logo após a ordenha da manhã, e preparadas na forma de mistura completa, com relação volumoso:concentrado (V:C) de 63%:37% (base MS), em vagão misturador/distribuidor Dataranger<sup>®</sup> (*American Calan Inc.*, Northwood, NH, EUA), sendo os consumos de cada vaca determinados por diferença entre as quantidades oferecidas das dietas e as respectivas sobras individuais, utilizando-se cochos com portões eletrônicos do tipo *calan-gate* (*American Calan Inc.*, Northwood, NH, EUA).

Em cada período de avaliação, amostras da silagem de milho e das duas dietas foram coletadas e armazenadas a -10°C, visando à posterior determinação do perfil de AG,

conforme procedimentos descritos por Ribeiro *et al.* (2014). Essa análise foi realizada no Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG), utilizando-se cromatógrafo modelo 6890N (*Agilent Technologies Inc.*, EUA) equipado com coluna capilar (25m x 0,20m x 0,33µm) de polietilenoglicol (HP-FFAP, *Agilent Technologies Inc.*, EUA) e detector de ionização de chama (FID). A quantificação dos AG na amostra (% da MS) foi determinada por meio da adição de padrão interno (C19:0). Os resultados das análises de AG e os valores dos pesos diários das dietas fornecidas e das sobras individuais, registrados durante cada um dos períodos de amostragem, foram utilizados para os cálculos dos consumos de MS e de AG.

No 24<sup>o</sup> e no 56<sup>o</sup> dia do experimento, amostras de 30mL representativas da produção individual diária de leite (alíquotas de 2/3 e 1/3, respectivamente, obtidas nas ordenhas da manhã e da tarde – sete horas e 14 horas) foram coletadas e armazenadas a -10°C, em frascos sem conservante, visando à determinação do perfil de AG por cromatografia gasosa, conforme descrito por Ribeiro *et al.* (2014). Essa análise foi realizada no Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite, em cromatógrafo 7820A (*Agilent Technologies Inc.*, EUA) equipado com coluna capilar de sílica fundida (CP-Sil 88, 100m x 0,25mm x 0,2µm, *Varian Inc.*, EUA) e FID.

Para complementar o estudo de qualidade nutricional da gordura do leite, índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT) e relações entre AG ômega 6:ômega 3 ( $\omega$ -6: $\omega$ -3) e AG hipo e hipercolesterolêmicos (h/H) foram calculados. Os resultados foram analisados como medidas repetidas no tempo, utilizando-se o procedimento MIXED do SAS, versão 9.0. Foram considerados efeitos fixos os níveis de GB na dieta e os períodos de amostragem, bem como a interação entre eles, e aleatórios os blocos e suas interações. Correlações de Pearson foram obtidas por meio do procedimento CORR. Efeitos foram considerados significativos quando  $P \leq 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os consumos, não houve interação ( $P > 0,05$ ) entre os níveis de GB na dieta e os períodos de amostragem (Tab. 2). A inclusão de GB na dieta ( $P > 0,05$ ) não alterou os consumos de MS (CMS) e de FDN. Em trabalho realizado no Brasil, o CMS por vacas Holandês produzindo, em média, 15kg/dia de leite não foi alterado pela inclusão de até 12% de GB (80% de glicerol) na MS de dietas formuladas com 72% de silagem de milho (Pimentel et al., 2014). Já a inclusão de níveis superiores de GB (14-30% na MS da dieta) provocou redução no CMS de vacas Holandês alimentadas com 45-50% de silagem de milho e produção de leite de 16,7kg/dia (Ezequiel et al., 2015) e 26,3kg/dia (Paiva et al., 2016). Para

Ezequiel et al. (2015), que também utilizaram GB proveniente da ADM Ltda., originada da produção de biodiesel a partir de óleo de soja e com composição similar à do presente estudo, a redução no CMS foi decorrente da menor aceitabilidade das dietas com GB devido ao aumento de sua viscosidade e da presença de impurezas na GB, principalmente metanol e NaCl, além de fatores intrínsecos relacionados à fermentação e absorção do glicerol no rúmen. Para o consumo de EE, a diferença ( $P = 0,0375$ ) entre dietas (Tab. 2) é coerente com os teores de 3,1% e 1,8%, respectivamente, nos concentrados com e sem GB (Tab. 1), haja vista a substituição do milho moído, contendo 4,0% de EE, pela GB, com apenas 0,3%. Já a ausência de efeito da inclusão de GB sobre o consumo de FDN foi consequência direta da semelhança ( $P > 0,05$ ) no CMS das vacas (Tab. 2), da similar relação V:C das dietas e dos teores de FDN, respectivamente, 36,8% e 36,7% nas dietas com e sem GB.

As reduções ( $P < 0,0001$ ) observadas nos consumos dos ácidos oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico em resposta à inclusão de GB na dieta (Tab. 2) foram consequência das diferenças nos teores desses AG nas dietas experimentais (Tab. 3) que, por sua vez, estão principalmente associados à substituição do milho moído (4,0% de EE), rico nesses AG (Lopes et al., 2011), pela GB utilizada, que apresentou apenas 0,3% de óleo em sua composição, pouco contribuindo para o aporte desses AG na dieta.

Tabela 2. Taxa de passagem da fase sólida no rúmen e consumos de matéria seca, nutrientes e ácidos graxos majoritários por vacas Holandês x Gir recebendo silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta (GB)

Item	Concentrado		Erro-padrão da média	Valor de P
	Sem GB	Com GB		
Consumos de matéria seca e nutrientes (kg/vaca/dia) e taxa de passagem da fase sólida no rúmen				
Matéria seca (MS)	17,8	18,1	0,6223	0,7220
Fibra em detergente neutro (FDN)	6,32	6,41	0,2373	0,7925
Extrato etéreo	0,75	0,68	0,0215	0,0375
MS (% do peso corpóreo)	3,30	3,15	0,1368	0,4493
FDN (% do peso corpóreo)	1,18	1,12	0,0511	0,4637
Taxa de passagem (%/h) <sup>1</sup>	5,08	4,99	0,0840	0,4493
Consumo de ácidos graxos (g/vaca/dia)				
C14:0	0,7	0,8	0,0257	0,0011
C16:0	38,9	24,1	1,1806	<0,0001
C18:0	5,8	11,8	0,3018	<0,0001
C18:1 cis-9	39,1	20,4	1,1563	<0,0001
C18:2 cis-9 cis-12	46,5	13,9	1,3076	<0,0001
C18:3 cis-9 cis-12 cis-15	4,0	1,4	0,1148	<0,0001

<sup>1</sup>Taxa de passagem =  $3,054 + (0,614 \times \text{consumo de MS em \% do peso corpóreo})$  (Nutrient..., 2001).

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos das dietas experimentais e da silagem de milho

Ácido graxo (AG)	Concentrado		Silagem de milho
	Sem glicerina bruta	Com glicerina bruta	
g/100 g de AG totais			
C14:0	0,44	0,91	0,39
C16:0	25,06	26,42	19,38
C18:0	3,73	12,97	2,93
C18:1 <i>cis</i> -9	25,24	22,42	27,01
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	29,95	15,23	37,95
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	2,60	1,58	3,34
% da matéria seca da dieta			
C14:0	0,004	0,005	0,007
C16:0	0,219	0,133	0,339
C18:0	0,033	0,065	0,051
C18:1 <i>cis</i> -9	0,220	0,113	0,472
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	0,261	0,077	0,663
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	0,023	0,008	0,058

As concentrações de AG na silagem de milho (Tab. 3) estão, de modo geral, situadas próximo dos limites inferiores das faixas de valores relatadas por Khan *et al.* (2015) para 98 amostras desse volumoso. E, como a silagem de milho foi o ingrediente majoritário nas duas dietas, respondendo por 63% da MS delas, os consumos dos ácidos oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico (Tab. 2) podem ser considerados baixos quando comparados aos relatados em trabalhos realizados em condições de clima temperado, com vacas alimentadas com silagem de milho suplementada com concentrados não lipídicos (Staerfl *et al.*, 2013; Barletta *et al.*, 2016). Todavia, nenhum dos suplementos proteicos (farelo de soja) ou energéticos (fubá de milho, farelo de trigo e GB), constituintes dos concentrados utilizados nas duas dietas, pode ser considerado fonte dietética importante desses três AG (oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico). Assim, ainda que tenham sido observadas diferenças nos consumos de AG entre as dietas ( $P < 0,0001$ ), os baixos consumos dos ácidos linoleico e  $\alpha$ -linolênico (Tab. 2), que são, juntamente com o ácido oleico, os principais substratos para formação do ácido vacênico no rúmen por reações de bio-hidrogenação (BH) parcial, explicam os discretos teores de ácido rumênico observados (Tab. 4), pois, conforme relataram Shingfield *et al.* (2010), 64% a 97% da secreção total desse AG no leite bovino ocorre na glândula mamária, por meio da dessaturação do ácido vacênico pela enzima esteroil-CoA dessaturase (SCD).

As concentrações dos ácidos rumênico e vacênico no leite foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) entre tratamentos (Tab. 4) e estão situadas nas faixas de valores compiladas por Lopes *et al.* (2011), respectivamente, de 0,09-0,67g/100g de AG e de 0,95-3,93g/100g de AG, para dietas à base de silagem de milho suplementada com concentrados não lipídicos, indicando que, de fato, tais dietas apresentam limitado potencial para produção de leite naturalmente enriquecido com os ácidos rumênico e vacênico.

Os consumos dos ácidos oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico foram positivamente correlacionados ( $P < 0,05$ ) com as concentrações no leite do isômero não conjugado do ácido linoleico C18:2 *trans*-9 *trans*-12 e de diversos isômeros C18:1 *cis* e *trans* (C18:1 *trans*-5, C18:1 *trans*-9 ou elaídico, C18:1 *trans*-12, C18:1 *cis*-12 e C18:1 *trans*-16). Todos esses AG, além de outros, como o C18:1 *trans*-10, vacênico e C18:1 *cis*-11, estão entre os principais intermediários da BH ruminal dos ácidos oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico (Shingfield *et al.*, 2010). E exceto pelo ácido vacênico, cujos teores no leite foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) entre dietas, observaram-se menores ( $P < 0,05$ ) concentrações de todos os demais AG C18:1 *trans*, além dos AG C18:1 *cis*-12 e C18:2 *trans*-9 *trans*-12 no leite das vacas que receberam GB (Tab. 4). O teor de ácido vacênico no leite apresentou correlação negativa com o consumo de amido ( $r = -0,38$ ;  $P = 0,0242$ ), mas não foi correlacionado ( $P > 0,05$ ) com o consumo de glicerol.

Tabela 4. Perfil de ácidos graxos (AG) no leite de vacas Holandês x Gir recebendo silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta (GB)

Ácido graxo - AG (g/100 g de AG totais)	Concentrado		Erro-padrão da média	Valor de P
	Sem GB	Com GB		
AG de cadeia linear saturada com n <sup>o</sup> par de C (AGCS)				
C4:0	3,58	3,63	0,0634	0,6233
C6:0	2,44	2,53	0,0422	0,1320
C8:0	1,35	1,43	0,0342	0,1222
C10:0	3,20	3,52	0,1170	0,0773
Σ AGCS 4≤C≤10	10,56	11,10	0,1712	0,0447
C12:0	3,86	4,32	0,1459	0,0397
C14:0	11,41	11,49	0,2088	0,7805
C16:0	30,73	31,20	0,7401	0,6580
Σ AGCS 12≤C≤16	45,99	47,02	0,7839	0,3716
C18:0	8,92	9,37	0,2970	0,3016
C20:0	0,13	0,14	0,0036	0,1519
C22:0	0,055	0,055	0,0021	0,8979
C24:0	0,023	0,026	0,0016	0,1881
Σ AGCS ≥18C	9,13	9,59	0,3005	0,2968
AG de cadeia ímpar e ramificada (OBCFA)				
C11:0	0,48	0,54	0,0184	0,0316
C13:0	0,12	0,20	0,0123	0,0007
C15:0 iso	0,27	0,30	0,0088	0,0602
C15:0 anteiso	0,48	0,49	0,0114	0,7109
C15:0	1,21	1,65	0,0882	0,0032
C16:0 iso	0,28	0,27	0,0155	0,9603
C17:0 iso	0,35	0,34	0,0065	0,2232
C17:0 anteiso	0,44	0,43	0,0073	0,4033
C17:0	0,46	0,57	0,0179	0,0005
C17:1 cis-9	0,19	0,23	0,0093	0,0123
C21:0	0,024	0,031	0,0018	0,0129
C23:0	0,028	0,025	0,0027	0,4129
Σ AG de cadeia linear (C11:0 a C23:0 + C17:1 cis-9)	2,52	3,25	0,1133	0,0004
Σ AG anteiso (C15:0 anteiso + C17:0 anteiso)	0,92	0,92	0,0191	0,9197
Σ AG iso (C15:0 iso + C16:0 iso + C17:0 iso)	0,90	0,91	0,0216	0,7481
Σ OBCFA (AG cadeia ímpar linear + anteiso + iso)	4,33	5,08	0,1081	0,0003
AG monoinsaturados cis				
C14:1 cis-9	1,24	1,02	0,0528	0,0121
C16:1 cis-9	1,43	1,40	0,0602	0,6966
C18:1 cis-9 + C18:1 trans-15	16,75	15,82	0,3919	0,1155
C18:1 cis-11	0,65	0,62	0,0142	0,1803
C18:1 cis-12	0,33	0,27	0,0094	0,0003
C18:1 cis-13	0,061	0,056	0,0027	0,2582
C18:1 cis-14	0,076	0,079	0,0026	0,4124
C20:1 cis-11	0,096	0,094	0,0064	0,8665
AG C18:1 trans				
C18:1 trans-4	0,013	0,009	0,0007	0,0057
C18:1 trans-5	0,012	0,008	0,0012	0,0392
C18:1 trans-6 a trans-8	0,15	0,12	0,0051	0,0015
C18:1 trans-9	0,25	0,21	0,0064	0,0001
C18:1 trans-10	0,32	0,27	0,0117	0,0070
C18:1 trans-11	1,06	1,08	0,0456	0,7866
C18:1 trans-12	0,29	0,22	0,0076	<0,0001
C18:1 trans-13 e trans-14	0,42	0,33	0,0172	0,0020
C18:1 trans-16	0,27	0,21	0,0104	0,0015
Σ C18:1 trans	2,78	2,44	0,0807	0,0104
Isômeros conjugados (CLA) e não conjugados (NCLA) do ácido linoleico				
C18:2 trans-9 trans-12 (NCLA)	0,069	0,053	0,0036	0,0060
C18:2 cis-9 trans-12 (NCLA)	0,066	0,065	0,0040	0,8323
C18:2 trans-9 cis-12 (NCLA)	0,107	0,099	0,0039	0,2010
Σ NCLA	0,24	0,22	0,0103	0,1008
CLA cis-9 trans-11	0,58	0,53	0,0254	0,2310
CLA trans-9 cis-11	0,025	0,022	0,0043	0,7022
CLA trans-10 cis-12	0,014	0,015	0,0020	0,6387
AG de cadeia longa ω-6 e ω-3				
C18:2 cis-9 cis-12 (ω-6)	1,82	1,66	0,0641	0,0951
γ-C18:3 cis-6 cis-9 cis-12 (ω-6)	0,024	0,023	0,0015	0,8156
C18:3 cis-9 cis-12 cis-15 (ω-3)	0,22	0,20	0,0077	0,1463
C20:2 cis-11 cis-14 (ω-6)	0,031	0,024	0,0030	0,1370
C20:3 cis-8 cis-11 cis-14 (ω-6)	0,076	0,086	0,0054	0,2139
Araquidônico (C20:4 cis-5 cis-8 cis-11 cis-14) (ω-6)	0,14	0,15	0,0086	0,8573
EPA (C20:5 cis-5 cis-8 cis-11 cis-14 cis-17) (ω-3)	0,044	0,051	0,0032	0,1425
DHA (C20:6 cis-4 cis-7 cis-10 cis-13 cis-16 cis-19) (ω-3)	0,060	0,068	0,0048	0,2385
Σ AG ω-6 cis	2,09	1,93	0,0703	0,1335
Σ AG ω-3 cis	0,32	0,32	0,0132	0,9532

Por outro lado, exceto pelo AG C18:1 *trans*-10 ( $P=0,0662$ ), houve correlações negativas ( $P<0,05$ ) entre o consumo de glicerol e os teores no leite de todos os demais AG C18:1 *trans*. Tais resultados indicam que, no tratamento com GB, provavelmente em razão dos menores consumos (Tab. 2), a BH ruminal dos ácidos oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico foi menos intensa. Essa hipótese é corroborada pelas maiores ( $P<0,05$ ) transferências aparentes desses AG da dieta para o leite das vacas que receberam GB (Tab. 5), indicando que frações consumidas deles não sofreram BH no rúmen. Assim, pode-se levantar a hipótese de que, de fato, a substituição *per se* do amido do milho pelo glicerol da GB foi a principal responsável pelas diferenças ( $P<0,05$ ) entre dietas nas concentrações no leite desses AG intermediários da BH ruminal (Tab. 4). Destaca-

se, ainda, que os maiores consumos dos ácidos oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico na dieta com GB (Tab. 2) também são consequência direta da substituição do milho pela GB (Tab. 3).

A taxa de passagem da fase sólida apresenta potencial para modular a BH de AG no rúmen, mas não houve efeito da inclusão de GB na dieta sobre essa variável (Tab. 2). Dentre os isômeros C18:1 *trans*, destacam-se os AG vacênico, elaídico e o C18:1 *trans*-10 como os de maior interesse para a nutrição humana. Os dois últimos têm sido associados com efeitos deletérios à saúde cardiovascular (Almeida *et al.*, 2014) e, portanto, as reduções de seus teores no leite, alcançadas com a inclusão de GB na dieta (Tab. 4), impactam positivamente a qualidade nutricional da gordura do leite.

Tabela 5. Efeito da inclusão de glicerina bruta (GB) na dieta de vacas Holandês x Gir sobre a transferência aparente de ácidos graxos consumidos para o leite

Transferência aparente (% do consumido)	Concentrado		Erro-padrão da média	Valor de P
	Sem GB	Com GB		
C18:0	13,74	5,93	0,7400	<0,0001
C18:1 <i>cis</i> -9	3,82	5,76	0,2716	0,0002
C18:2 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12	0,35	0,88	0,0401	<0,0001
C18:3 <i>cis</i> -9 <i>cis</i> -12 <i>cis</i> -15	0,49	1,06	0,0498	<0,0001

Não houve efeito ( $P>0,05$ ) da inclusão de GB sobre o teor do ácido esteárico no leite (Tab. 4), cujos valores são similares ao obtido (9,1g/100g de AG) em trabalho realizado no Brasil com vacas alimentadas com silagem de milho e concentrado não lipídico (Rennó *et al.*, 2013). No entanto, os teores de ácido oleico (Tab. 4) podem ser considerados baixos em relação aos relatados por Rennó *et al.* (2013), de 20,9g/100g de AG, ou aos compilados (18,9-29,0g/100g de AG) por Lopes *et al.* (2011) de trabalhos com vacas alimentadas com silagens de milho e concentrados não lipídicos.

No tratamento sem inclusão de GB, o maior consumo de ácido esteárico (Tab. 2) foi o principal responsável pela maior ( $P<0,05$ ) transferência aparente desse AG da dieta para o leite (Tab. 5). No entanto, a presumida maior disponibilidade de ácido esteárico para glândula mamária das vacas do tratamento sem GB foi modulada pela maior ( $P=0,0586$ ) atividade de dessaturação da enzima SCD para o par oleico/esteárico, o que reduziu a secreção do ácido esteárico e contribuiu para a semelhança

( $P>0,05$ ) entre dietas quanto ao seu teor no leite (Tab. 4). Por outro lado, a maior transferência de ácido oleico da dieta para o leite das vacas que receberam GB (Tab. 5) compensou a menor atividade de dessaturação da enzima SCD nesse tratamento, contribuindo para a semelhança ( $P>0,05$ ) entre dietas quanto ao seu teor no leite (Tab. 4).

A inclusão da GB na dieta promoveu aumento ( $P<0,05$ ) na concentração do ácido láurico, mas não alterou ( $P>0,05$ ) os teores dos ácidos mirístico e palmítico no leite (Tab. 4). As concentrações no leite desses AG, que são considerados hipercolesterolêmicos (Food..., 2010), estão próximas das compiladas por Lopes *et al.* (2011), de trabalhos realizados no Brasil com vacas alimentadas com silagens de milho suplementadas com concentrados não lipídicos. A inclusão de GB na dieta reduziu ( $P<0,05$ ) o somatório das concentrações dos AG de cadeia curta C4:0 a C10:0, mas não houve efeito ( $P>0,05$ ) sobre os teores individuais desses AG no leite (Tab. 4). Trabalhos realizados *in vitro* (AbuGhazaleh *et al.*, 2011) e *in vivo* (Ariko *et*

*al.*, 2015) demonstraram que até ~11% de glicerol na MS da dieta em substituição ao amido não altera o pH, mas modifica a proporção molar de ácidos graxos voláteis no rúmen, com maior concentração de propionato às expensas de acetato.

Os aumentos ( $P < 0,05$ ) observados no somatório das concentrações dos AG de cadeia curta C4:0 a C10:0 e do ácido láurico no leite das vacas que receberam GB (Tab. 4) são indicativos de que a disponibilidade de acetato não foi limitante para a síntese *de novo* de AG nessa dieta. Ademais, houve correlação positiva ( $r = 0,44$ ;  $P = 0,0072$ ) entre o consumo de glicerol e a síntese *de novo* dos AG C4:0 a C12:0 no leite, que, por sua vez, apresentou correlações negativas com os consumos dos ácidos linoleico ( $r = -0,36$ ;  $P = 0,0330$ ) e  $\alpha$ -linolênico ( $r = -0,35$ ;  $P = 0,0369$ ), indicando que os maiores consumos de AG poli-insaturados na dieta sem GB (Tab. 2) podem ser responsabilizados, ao menos em parte, pela redução na síntese *de novo* dos AG C4:0 a C12:0 no leite das vacas desse tratamento.

A inclusão de GB na dieta não alterou ( $P > 0,05$ ) as concentrações no leite de nenhum dos AG *anteiso* e *iso* e, exceto pelo AG C23:0, promoveu aumentos nos teores de todos os demais AG de cadeia ímpar linear no leite (Tab. 4). Os AG de cadeia ímpar e ramificada são originados, em sua maior parte, de AG sintetizados *de novo* e incorporados na membrana celular das bactérias ruminais, de forma que as concentrações desses AG na gordura do leite podem ser indicativas da atividade e crescimento de específicas classes de bactérias no rúmen (Vlaeminck *et al.*, 2006). Ezequiel *et al.* (2015) não analisaram os AG de cadeia ímpar ramificada, mas observaram incrementos lineares nas concentrações de vários AG de cadeia ímpar linear (C7:0, C11:0, C13:0, C15:0, C17:0 e C17 *cis*-9) no leite de vacas Holandês alimentadas com 15% e 30% de GB na MS de dietas baseadas em silagem de milho. Esses autores sugeriram que tal resultado poderia estar associado à maior concentração de propionato no rúmen de vacas alimentadas com dietas em que o amido foi substituído por glicerol, resultando na disponibilidade de propionil-CoA para ser utilizado como *primer* na síntese de AG de cadeia ímpar linear pelas bactérias ruminais.

No entanto, outra possível explicação para o incremento nos teores dos AG de cadeia ímpar

linear no leite foi apresentada por Ariko *et al.* (2015). Segundo eles, o glicerol absorvido pela parede do rúmen pode ser metabolizado no fígado pela via glicolítica, o que reduz a necessidade de propionato para produção de glicose, tornando-o mais disponível para ser utilizado como precursor para síntese de AG de cadeia ímpar linear na glândula mamária. Corroborando essa hipótese, foram verificadas correlações positivas entre o consumo de glicerol e os teores no leite dos AG C17:1 *cis*-9 ( $r = 0,35$ ;  $P = 0,0388$ ), C15:0 ( $r = 0,48$ ;  $P = 0,0033$ ), C17:0 ( $r = 0,54$ ;  $P = 0,0006$ ) e no somatório dos AG de cadeia ímpar linear ( $r = 0,55$ ;  $P = 0,0005$ ). Ressalte-se que o incremento ( $P < 0,05$ ) no teor do AG C17:1 *cis*-9 no leite das vacas que receberam GB na dieta pode ser atribuído à dessaturação na glândula mamária do AG C17:0, o que é corroborado pela correlação positiva observada entre as concentrações desses dois AG ( $r = 0,74$ ;  $P < 0,0001$ ).

Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) da inclusão de GB sobre as concentrações do CLA *trans*-10 *cis*-12 e CLA *trans*-9 *cis*-11 no leite (Tab. 4), que podem ser consideradas normais e, portanto, não passíveis de promover depressão no teor de gordura do leite, uma vez que esses CLAs estão associados à inibição da lipogênese mamária em vacas (Shingfield *et al.*, 2010). O maior teor do AG C14:1 *cis*-9 no leite das vacas do tratamento controle deu-se em resposta à maior ( $P = 0,0195$ ) atividade na glândula mamária da enzima SCD para o par C14:1 *cis*-9/mirístico, que apresentou semelhante ( $P > 0,05$ ) atividade para os pares C16:1 *cis*-9/palmitico e rumênico/vacênico.

Como não houve efeito ( $P > 0,05$ ) da inclusão de GB sobre os teores dos ácidos esteárico e oleico nem sobre os somatórios das concentrações dos ácidos láurico, mirístico e palmítico, bem como dos  $\Sigma$  dos AG  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 (Tab. 4), isso resultou em semelhança ( $P > 0,05$ ) na qualidade nutricional da gordura do leite, aferida pelos índices de aterogenicidade e de trombogenicidade, e pela relação entre AG hipo e hipercolesterolêmicos (Tab. 6). Entretanto, houve redução ( $P < 0,05$ ) na relação  $\omega$ -6: $\omega$ -3 em resposta à inclusão de GB, o que é considerado positivo para a nutrição humana, embora, segundo FAO (Food..., 2010), não há consenso científico quanto ao valor desse índice como métrica para recomendações dietéticas que visem reduzir risco de ocorrência de doenças cardiovasculares.



Tabela 6. Índices de qualidade nutricional da gordura do leite de vacas Holandês x Gir recebendo silagem de milho suplementada com concentrado contendo ou não glicerina bruta (GB)

Item	Concentrado		Erro-padrão da média	Valor de P
	Sem GB	Com GB		
Índice de aterogenicidade (IA)	4,24	4,59	0,1591	0,1475
Índice de trombogenicidade (IT)	4,90	5,29	0,1884	0,1682
Relação entre AG hipo:hipercolesterolêmicos (h/H)	0,37	0,35	0,0159	0,2463
Relação entre ácidos graxos $\omega$ -6: $\omega$ -3	6,59	6,08	0,1452	0,0258

IA =  $[C12:0 + (4 * C14:0) + C16:0] / (C18:1 \text{ cis-9} + \Sigma \omega\text{-6 cis} + \Sigma \omega\text{-3 cis})$ ; IT =  $(C14:0 + C16:0 + C18:0) / [(0,5 * C18:1 \text{ cis-9}) + (0,5 * \Sigma \omega\text{-6 cis}) + (3 * \Sigma \omega\text{-3 cis}) + (\Sigma \omega\text{-3 cis} / \Sigma \omega\text{-6 cis})]$ ; h/H =  $(C18:1 \text{ cis-9} + \Sigma \omega\text{-3 cis}) / (C12:0 + C14:0 + C16:0)$ ; e Relação entre ácidos graxos  $\omega$ -6: $\omega$ -3 =  $\Sigma \omega\text{-6 cis} / \Sigma \omega\text{-3 cis}$ .

### CONCLUSÕES

A inclusão de glicerina bruta em dieta à base de silagem de milho não afetou a qualidade nutricional da gordura do leite de vacas Holandês x Gir.

### AGRADECIMENTOS

À Embrapa, à Fapemig e ao CNPq, financiadores do trabalho e de bolsas de estudo. Aos técnicos do Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite, Ernando Ferreira Motta e Hernani Guilherme Barbosa Filho, responsáveis pelas análises de ácidos graxos.

### REFERÊNCIAS

ABUGHAZALEH, A.A.; ABO EL-NOR, S.; IBRAHIM, S.A. The effect of replacing corn with glycerol on ruminal bacteria in continuous culture fermenters. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, v.95, p.313-319, 2011.

ALMEIDA, M.M.; LUQUETTI, S.C.D.; SABARENSE, C.M. *et al.* Butter naturally enriched in *cis*-9 *trans*-11 CLA prevents hyperinsulinemia and increases both serum HDL cholesterol and triacylglycerol levels in rats. *Lipids Health Dis.*, v.13, p.1-13, 2014.

ARIKO, T.; KASSA, M.; HENNO, M. *et al.* The effect of replacing barley with glycerol in the diet of dairy cows on rumen parameters and milk fatty acid profile. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.209, p.69-78, 2015.

BARLETTA, R.V.; GANDRA, J.R.; BETTERO, V.P. *et al.* Ruminant biohydrogenation and abomasal flow of fatty acids in lactating cows: Oilseed provides ruminal protection for fatty acids. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.219, p.111-121, 2016.

BRASIL. Congresso Nacional decreta a Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 24 mar. 2016. Seção 1, p.1.

EZEQUIEL, J.M.B.; SANCANARI, J.B.D.; MACHADO NETO, O.R. *et al.* Effects of high concentrations of dietary crude glycerin on dairy cow productivity and milk quality. *J. Dairy Sci.*, v.98, p.8009-8017, 2015.

FOOD And Agriculture Organization of the United Nations. *Fats and fatty acids in human nutrition*. Report of an expert consultation. Roma: FAO, 2010. 166p.

KHAN, N.A.; PEIQIANG, Y.; MUBARAK, A. *et al.* Nutritive value of maize silage in relation to dairy cow performance and milk quality. *J. Sci. Food Agric.*, v.95, p.238-252, 2015.

LOPES, F.C.F.; GAMA, M.A.S.; RIBEIRO, C.G.S. *et al.* Produção de leite com alto teor de CLA - Experiência brasileira. In: PEREIRA, L.G.R.; NOBRE, M.M.; NEVES, A.L.A. *et al.* (Eds.). *Pesquisa, desenvolvimento e inovação para sustentabilidade da bovinocultura leiteira*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2011. p.251-296.

MENESES, M.A.; SILVA, F.F.; SILVA, R.R. *et al.* Fatty acid composition of milk from cows fed low purity glycerin. *Semin. Cienc. Agrar.*, v.36, p.971-984, 2015.

NUTRIENT requirements of dairy cattle. 7.ed. Washington: National Academic Press. 2001. 381 p.

- PAIVA, P.G.; DEL VALLE, T.A.; JESUS, E.F. *et al.* Effects of crude glycerin on milk composition, nutrient digestibility and ruminal fermentation of dairy cows fed corn silage-based diets. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.212, p.136-142, 2016.
- PIMENTEL, L.R.; MARCONDES, M.I.; SILVA, M.V. *et al.* Inclusion of crude glycerin in the diet of dairy cows on intake, milk yield and composition. *Semin. Cienc. Agrar.*, v.35, p.1439-1446, 2014.
- RENNÓ, F.P.; FREITAS JÚNIOR, J.E.; GANDRA, J.R. *et al.* Fatty acid profile and composition of milk protein fraction in dairy cows fed long-chain unsaturated fatty acids during the transition period. *Rev. Bras. Zootec.*, v.42, p.813-823, 2013.
- RIBEIRO, C.G.S.; LOPES, F.C.F.; GAMA, M.A.S. *et al.* Desempenho produtivo e perfil de ácidos graxos do leite de vacas que receberam níveis crescentes de óleo de girassol em dietas à base de capim-elefante. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.66, p.1513-1521, 2014.
- SHINGFIELD, K.J.; BERNARD, L.; LEROUX, C.; CHILLIARD, Y. Role of *trans* fatty acids in the nutritional regulation of mammary lipogenesis in ruminants. *Animal*, v.4, p.1140-1166, 2010.
- STAERFL, S.M.; ZEITZ, J.O.; AMELCHANKA, S.L. *et al.* Comparison of the milk fatty acid composition from dairy cows fed high-sugar ryegrass, low-sugar ryegrass, or maize. *Dairy Sci. Technol.*, v.93, p.201-210, 2013.
- VLAEMINCK, B.; FIEVEZ, V.; CABRITA, A.R.J. *et al.* Factors affecting odd- and branched-chain fatty acids in milk: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, v.131, p.389-417, 2006.
- YANG, B.; CHEN, H.; STANTON, C. *et al.* Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *J. Funct. Foods*, v.15, p.314-325, 2015.