

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

COMPOSIÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DO LEITE E DO SANGUE DE BÚFALAS
SUPLEMENTADAS COM ÓLEO DE LINHAÇA E
VITAMINA E NA DIETA

Autora: Bruna Calvo Agostinho
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lucia Maria Zeoula

MARINGÁ
Estado do Paraná
Abril-2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

COMPOSIÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
DO LEITE E DO SANGUE DE BÚFALAS
SUPLEMENTADAS COM ÓLEO DE LINHAÇA E
VITAMINA E NA DIETA

Autora: Bruna Calvo Agostinho
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Lucia Maria Zeoula

Dissertação apresentada, como parte das exigências para a obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Abril-2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

A284c Agostinho, Bruna Calvo, 1992-
Composição lipídica e atividade antioxidante do leite e do sangue de búfalas suplementadas com óleo de linhaça e vitamina E na dieta / Bruna Calvo Agostinho. -- Maringá, 2017.
viii, 35 f. : il. color., figs., tabs., mapas

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lucia Maria Zeoula.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2017.

1. Ácido graxo poli-insaturado. 2. Búfalas - Digestibilidade. 3. Lipoperoxidação. 4. Ômega-3. 5. Leite de búfala. I. Zeoula, Lucia Maria, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.

CDD 23.ed. 636.293

GVS-003736



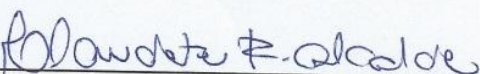
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

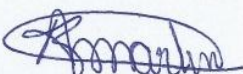
**COMPOSIÇÃO LIPÍDICA E ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DO LEITE E DO SANGUE DE BÚFALAS
SUPLEMENTADAS COM ÓLEO DE LINHAÇA
E VITAMINA E NA DIETA**

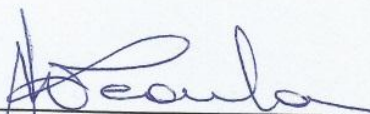
Autora: Bruna Calvo Agostinho
Orientadora: Prof^a Dr^a Lúcia Maria Zeoula

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 21 de fevereiro de 2017.


Prof^a Dr^a Claudete Regina Alcalde


Prof^a Dr^a Adriana de Souza
Martins


Prof^a Dr^a Lúcia Maria Zeoula
(Orientadora)

"Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça."

Geraldo Eustáquio de Souza

À Deus, que me permitiu que chegasse até aqui, iluminando meu passos, me guiando por todos os caminhos e aliviando meus fardos.

À minha mãe, Marta Calvo e ao meu padrasto, João Carlos Martins, por todo apoio, palavras de conforto, confiança, dedicação, e acima de tudo, pelos ensinamentos que me passaram.

Aos meus irmãos, Adolfo Calvo Dionísio, Jorge Estevan Dionísio e Murilo Messias Agostinho, pelo companheirismo, amizade e carinho.

Ao meu namorado, Paulo Henrique Silva Cruz, pelas palavras de ânimo, por todo amor e companheirismo, inclusive nos momentos que não foram fáceis.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, por ter permitido realizar meu projeto de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa.

À professora Dra. Lucia Maria Zeoula, por toda orientação, carinho, confiança, ensinamento, respeito e amizade durante esses cinco anos.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pelos conhecimentos, em especial, ao professor Dr. Geraldo Tadeu dos Santos, por me permitir utilizar os equipamentos pertencentes ao seu grupo de pesquisa.

Aos funcionários da Fazenda Experimental de Iguatemi, em especial ao Wilson Marsola e Ezupério Salim, que não mediram esforços para que fosse possível a realização da parte de campo do meu experimento e acima de tudo pela amizade que levo até hoje.

Ao meu namorado, Paulo Henrique Silva Cruz, por todo amor, companheirismo e por ter me ajudado em todos os finais de semana, férias e feriado na condução do experimento.

Aos amigos e companheiros de grupo, que tanto me ajudaram durante o experimento, análises, em tudo que sempre precisei e na descontração, Emerson Henri Yoshimura, Janaina Macieiro Bragatto, Mariana Ruiz Stemposki, Fernanda Códea Miranda, Talita

Estéfani Zunino Santana, Jessyca Caroline Rocha Ribas, Fábio Seiji dos Santos, e, em especial às irmãs que ganhei durante esses anos, Erica Machado, Nadine Woruby dos Santos, que são meus exemplos a seguir da pós-graduação, e sem elas não teria conseguido desenvolver minhas análises.

Aos colegas de grupo: Dayane Zimmermann, Luiz Gustavo Fafarão, Suzane Timóteo, Gabriella Oliveira, Leonardo Malavazi, Ana Cecília Piazza, Thais Feriani, Wellington Oliveira Pereira, Gabriela Hernandez Granzoto, Khassen Juday, Gabriel Leonardo Alves Araújo pelo auxílio, troca de conhecimento e descontração.

Aos funcionários do Laboratório de Análise de Alimentos e Nutrição Animal, Hermógenes Augusto de C. Neto e Osvaldo Tarelho Junior, ao funcionário e pós-doutorandos do Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia de Leite – Região Noroeste, Ranulfo Junior, Francilaine Eloise de Marchi e Rodolpho Prado, pelo suporte durante a realização das minhas análises.

A todos que de alguma forma fizeram parte dos meus caminhos trilhados até aqui.

BIOGRAFIA

BRUNA CALVO AGUSTINHO, filha de Messias Antonio Agostinho e Marta Calvo, nasceu em Santo Inácio, Paraná, no dia 26 de agosto de 1992.

Em março de 2010, iniciou o Curso de Graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá.

Em dezembro de 2014, foi graduada em Zootecnia, pela Universidade Estadual de Maringá.

Em 2015, iniciou no mestrado em Produção Animal, sub-área de Nutrição de ruminantes da Pós-graduação em Zootecnia, na Universidade Estadual de Maringá.

Em fevereiro de 2017, submeteu-se à banca examinadora para defesa da dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	
Introdução.....	1
Referências.....	8
OBJETIVOS GERAIS.....	10
CAPÍTULO II- Composição lipídica e atividade antioxidante do leite de búfalas alimentadas com dietas contendo óleo de linhaça e vitamina E	
Resumo.....	11
Abstract.....	13
Introdução.....	14
Material e métodos.....	15
Resultados.....	22
Discussão.....	27
Conclusão.....	31
Referências.....	32

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Proporção dos ingredientes e composição química das dietas.....	16
Tabela 2. Consumo da matéria seca e dos nutrientes por búfalas em lactação com adição de óleo de linhaça e vitamina E na dieta.....	22
Tabela 3. Digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes de búfalas em lactação com adição de óleo de linhaça e vitamina E na dieta.....	22
Tabela 4. Parâmetros e capacidade antioxidante sanguínea de búfalas em lactação com adição de óleo de linhaça e vitamina E na dieta.....	23
Tabela 5. Produção, composição e qualidade oxidativa do leite de búfalas em lactação com adição de óleo de linhaça e vitamina E na dieta.....	24
Tabela 6. Composição de ácidos graxos da gordura do leite (mg/g de lipídios totais) de búfalas em lactação com adição de óleo de linhaça e vitamina E na dieta.....	25
Tabela 7. Concentração de CLA total, ácidos graxos de cadeia curta, média e longa, n-6, n-3 (mg/g de lipídios totais), razão n-6/n-3, índices de aterogenicidade (IA), trombogenicidade (IT), e atividade da enzima Δ^9 -dessaturase de búfalas em lactação com adição de óleo de linhaça e vitamina E na dieta.....	26

I - Introdução

Bubalinocultura

A introdução de búfalos no Brasil ocorreu no final do século XIX, devido às suas características peculiares, responsáveis pelo sucesso da criação. Dentre essas características, destacam-se rusticidade, longevidade reprodutiva, melhor aproveitamento da fração fibrosa dos alimentos, capacidade de adaptação a diversos ambientes, principalmente em solos alagados, inviáveis para serem utilizados na criação de bovinos, além de docilidade quando domesticados.

As principais raças de búfalos criadas no Brasil são Murrah, Jafarabadi e Carabao. A Murrah tem aptidão leiteira, enquanto a Jafarabadi tem dupla aptidão, ou seja, pode ser utilizada para produção de carne ou leite, ambas as raças apresentam destaque para o rebanho presente nos estados do Sul do Brasil, São Paulo e Minas Gerais. A raça Carabao apresenta um grande rebanho, sendo criada principalmente no nordeste, utilizada como animal de tração (Rodrigues et al., 2008).

Segundo estimativas da FAO (2017), nos últimos 50 anos, o rebanho de búfalos no Brasil apresentou crescimento relevante de 87.000 para 1.319.478 cabeças. O retorno econômico da criação de búfalos é outro ponto que impulsionou esse crescimento, devido à existência de um nicho de mercado, que está disposto a pagar mais, para consumo de queijos e carnes, que apresentam qualidade superior, quando comparados aos de bovinos. Além do valor agregado, a produção de búfalos para leite se torna mais rentável, pois a eficiência de utilização de energia e de proteína bruta é muito maior que em bovinos (Paul e Lal, 2010).

No Brasil, a produção de leite de búfala apresenta uma cadeia bem organizada, com aproximadamente 150 laticínios. O produtor recebe um estímulo, pois o retorno

econômico por litro de leite é superior ao de vaca (Bernardes, 2013). Atualmente, o valor pago ao produtor por litro de leite de vaca está próximo de 1,20 reais, enquanto o de búfala entre 1,90 e 2,20 reais, variando conforme o volume produzido e a qualidade (Laticínios Bom Destino, fevereiro de 2017).

O leite de búfalas possui maior teor de sólidos totais em relação ao de vaca (17% vs. 12%), assim como, gordura (8,16% vs. 3,68%), proteína (4,50% vs. 3,70%) e cálcio (1,88 vs. 1,30) (Verruma & Salgado, 1994). Como o teor de sólidos totais é mais elevado, o rendimento para produção de queijos e outros derivados também favorece a expansão do rebanho.

A *mozzarella* é o principal derivado produzido com o leite de búfala. A original *mozzarella* é um queijo fresco filado, feito a partir de leite bubalino integral, com origem do sul da Itália (Alvez et al., 2010), no século XVI. Queijos que apresentam similaridade em sua fabricação são considerados somente como “tipo *mozzarella*”, apesar do nome ser o mesmo.

Hábitos saudáveis e o impacto sobre o consumo de leite

O envelhecimento populacional é consequência da redução da taxa de concepção e o aumento da expectativa de vida, que se devem aos avanços da medicina, em relação ao desenvolvimento de novas vacinas e medicamentos, melhoria de saneamento básico e hábitos alimentares mais saudáveis (Nasri, 2008). Com o intuito de se alcançar a fase idosa com saúde, os consumidores estão à procura de produtos que agreguem benefícios, associado à redução do consumo de produtos intitulados “vilões da saúde”. Os produtos de destaque são aqueles com reduzidos teores de açúcares, sódio e concentração de agrotóxicos e os com melhores perfis lipídicos, ou seja, com menor concentração de ácidos graxos saturados (AGS) e maiores de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI).

O leite é um alimento completo, pois apresenta teores consideráveis de proteína, carboidratos, lipídios, vitaminas e minerais. Contudo, a concentração de AGS em relação aos ácidos graxos totais é muito elevada, que corresponde à aproximadamente 70%, tanto para leite de vacas, quanto para búfalas (Ménard et al., 2010). O hábito de substituir o consumo dos AGS por insaturados devido à associação da ingestão de altos níveis de saturados com a ocorrência de doenças cardiovasculares

(Lima et al, 2000), hipercolesterolemia e resistência à insulina (Santos et al., 2013), induziu a população a lançar um olhar negativo sobre o leite.

Com o intuito de reduzir a razão AGS/AGI no leite e recompor sua boa fama, pesquisas foram e vem sendo desenvolvidas com a adição de fontes lipídicas ricas em AGPI, como óleo e grãos de soja, girassol e linhaça na dieta das principais espécies exploradas para obtenção de leite, sendo está, vacas, búfalas e cabras. Devido aos ácidos graxos de cadeia longa no leite terem origem dos AG da dieta, fornecer uma dieta rica em AGPI com o intuito de melhorar o perfil lipídico do leite é uma ferramenta interessante.

Um problema enfrentado com a suplementação de lipídios prontamente disponíveis, é que eles são de fácil biohidrogenação no rúmen, pois aproximadamente 90% dos AGPI são biohidrogenados (Chikunya et al., 2004), como forma de defesa dos micro-organismos. Desta forma, demandando níveis mais elevados para uma incorporação suficiente. Outros impasses também estão relacionados com a suplementação por AGPI, como a redução da digestibilidade da fibra, o aumento da lipoperoxidação no sangue e no leite, além da problemática síndrome da depressão da gordura do leite.

Pontos positivos e negativos da suplementação lipídica e antioxidante (vitamina E)

A dieta de ruminantes é composta de grande quantidade de alimentos fibrosos, como forragens, pois são essenciais para manter o bom funcionamento ruminal, pH favorável para manutenção adequada das populações de micro-organismos e reduzir as incidências de problemas metabólicos (Nussio et al., 2011). A fibra também é importante para formação dos ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) no rúmen, utilizados como fonte de energia para o animal desempenhar suas funções metabólicas, crescimento, produção de leite e reprodução. O acetato é o principal AGCC oriundo de sua degradação, fundamental para composição do leite, pois é precursor da gordura do leite na síntese *de novo* (Palmquist e Mattos, 2011).

A utilização de teor de óleo acima do limite tolerado dos ruminantes, sendo este 70 g/kg de extrato etéreo (EE) na matéria seca, prejudica a digestibilidade da fibra, que diminui o desempenho do animal por restringir a produção dos AGCC. A menor digestibilidade da fibra é consequência de duas modificações proporcionadas pela

adição de óleo na dieta. A primeira mudança é que, ao adicionar quantidade elevadas de óleo ocorre o efeito de recobrimento das partículas, dificultando o acesso e a aderência dos microrganismos, prejudicando a formação do biofilme (Jenkins, 1993), essencial para uma boa digestibilidade da fração fibrosa da dieta. Outra modificação é que os AGPI são tóxicos para as bactérias ruminais (Palmquist e Mattos, 2011), principalmente para as celulolíticas, promovendo uma redução da população, que acarreta em déficit da capacidade da digestibilidade.

Um segundo fator também reduz a síntese *de novo* na glândula mamária, em dietas com suplementação de AGPI. Esse fator é a elevada quantidade desses AG proveniente da dieta chegando à glândula mamária, que sinalizam como se a quantidade de lipídios fossem suficientes para a constituição do leite (Palmquist, 2006).

Os AGPI apresentam cadeias mais passíveis de sofrerem lipoperoxidação, pois as duplas ligações perdem elétrons com maior facilidade, por meio da ação de radicais livres e luz (Zingg e Azzi, 2004). Radicais livres são moléculas com um ou mais elétrons não-pareados no orbital externo e se apresentam muito instáveis e reativos. Os principais radicais livres formados no organismo são as espécies reativas oriundas do oxigênio e nitrogênio. Eles são formados durante a respiração e outros processos metabólicos normais, porém em caso de exposição excessiva a oxidantes externos, como radiação e reações catalisadas por metais, ocorre intensificação da sua produção (Araujo, 2011).

A lipoperoxidação ocorre em efeito cascata, pois um lipídio após ser oxidado forma um tipo de radical livre, capaz de oxidar outros lipídios. O local em que mais ocorre no organismo é na membrana celular, que causa perda da seletividade iônica, favorecendo a perda de conteúdo celular, como organelas, que causa morte das células (Miller e Brzezinska-Slebozinsk, 1993). A elevada frequência da lipoperoxidação pode induzir a problemas metabólicos ao animal, como comprometimento do sistema imunológico, mastite, metrite, edema mamário e retenção de placenta (Sordillo e Aitken, 2009). Já no produto final, como no caso do leite, quando enriquecido com AGPI oriundos do fornecimento da dieta, reduz a estabilidade oxidativa dos lipídios (Santos et al., 2016) da mesma forma que ocorre no organismo. Consequentemente, diminui o tempo de prateleira do produto. Assim, a utilização de fontes antioxidantes externas é imprescindível para a conservação.

A lipoperoxidação é dividida em três etapas, sendo elas: iniciação, propagação e terminação. Na fase de iniciação, ocorre a remoção do átomo de hidrogênio do grupo

metileno, originando um radical livre. Na propagação, ocorre a produção dos hidroperóxidos dieno conjugados (produto primário) e o malonaldeído (produto secundário). Através da degradação dos produtos da fase de propagação, são originados os produtos finais da oxidação (terminação), sendo estes as cetonas, ácidos e aldeídos, responsáveis pelo odor e gosto desagradáveis provocados pela lipoperoxidação (Araujo, 2011).

O organismo possui sistemas de defesas antioxidante ativo, constituído pelas enzimas glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase e glutathione reduzida, capazes de retardar a lipoperoxidação (Ferreira e Matsubara, 1997). Entretanto, quando esse processo se instala com muita intensidade, o sistema de defesa do organismo se torna ineficiente, demandando a utilização de compostos com atividade antioxidante para suplementação animal. Os antioxidantes podem ser naturais ou sintéticos.

A vitamina E se refere a um grupo de oito produtos oriundos de vegetais, mas somente quatro são requeridos pelos animais, sendo estes o alfa-tocoferol, beta-tocoferol, gama-tocoferol e sigma-tocoferol. Dos tocoferóis, o mais reativo é o alfa-tocoferol (Zingg e Azzi, 2004) e, na nutrição, ele é fornecido na forma sintética de acetato de α -tocoferil, com o objetivo de melhorar a capacidade antioxidante do sangue, leite e carne, conseqüentemente controlando a lipoperoxidação. A vitamina E é um antioxidante sintético muito estudado nos últimos anos, com o objetivo de atuar complementando a atividade das enzimas do organismo, de modo a eliminar os radicais livres e seus efeitos deletérios.

A exigência de vitamina E para bubalinos é de 15 UI/kg de matéria seca ingerida e apresenta baixa toxicidade, podendo ser ingerida até 100 vezes a exigência, sem que haja intoxicação (Paul e Lal, 2010). Panda et al (2006) observaram que suplementar búfalas com 1000, 1500 e 2000 UI/dia de vitamina reduziu os índices de mastite e metrite, em relação ao tratamento sem suplementação.

Óleo de linhaça e vitamina E nas dietas de ruminantes

Os AGPI das famílias ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3) são constituídos por AG em que a primeira insaturação ocorre no sexto carbono no caso do n-6, e no terceiro carbono no caso do n-3, contados a partir do grupo metil terminal (Martin et al., 2006). Ambos são ácidos graxos essenciais, ou seja, o organismo requer sua ingestão através

da dieta, pois não é capaz de sintetizá-los (Santos et al., 2013) e são necessários para o metabolismo animal.

Os AG n-6 são substratos para síntese de uma grande variedade de eicosanoides, sendo que alguns destes apresentam propriedades pró-trombótica e pró-agregatória, que promove um aumento da viscosidade do sangue (Simopoulos, 2006), além de pró-inflamatória, que estimula o desenvolvimento de doenças como câncer, colite ulcerativa e artrite (Simopoulos, 2002), trazendo malefícios para a saúde humana.

Enquanto os n-3 após sofrer alongação e dessaturação no organismo, formam o ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), responsáveis pela redução da chance de desenvolvimento de doenças cardiovasculares, pois ocasiona melhora da função do sistema nervoso autônomo, diminuição da agregação plaquetária e da pressão arterial e estabiliza a formação de placas de ateromas e triglicérides (Santos et al., 2013). Outro problema dos AG n-6 é que eles competem pelas enzimas responsáveis por alongar e dessaturar os AG n-3 no organismo, impedindo a formação do EPA e DHA, reduzindo os benefícios da ingestão do n-3 (Martin et al., 2006). Portanto, não só é importante a quantidade de n-3 consumido na dieta, mas também a razão n-6/n-3.

O óleo de linhaça é rico em n-3 e apresenta razão de n6/n3 reduzida, de aproximadamente 1:4, ideal para balancear a razão da dieta total. A suplementação com óleo de linhaça na dieta de ruminantes enriquece o leite, pois aumenta a concentração de n-3, conseqüentemente reduzindo a razão n-6/n-3 e aumenta o isômero do CLA C18:2 *cis*-9, *trans*-11 (Santos et al., 2016; Santillo et al, 2016), que beneficia tanto o animal que consome o óleo, por favorecer a síntese de EPA e DHA, como o indivíduo que consome o leite ou seus derivados, reduzindo a incidência de doenças.

O CLA (ácido linoleico conjugado) do leite é oriundo da biohidrogenação incompleta do ácido linoléico (18:2) no rúmen pelas bactérias e ação das enzimas dessaturases da glândula mamária. É um AG muito importante para quem consome, pois apresenta propriedades anti-mutagênicas, anti-carcinogênicas, anti-diabéticas, anti-obesidade e anti-hipertensiva (Viladomiu et al., 2015). É constituído por vários isômeros, tendo dois principais, o C18:2 *trans*-10, *cis*-12 e o C18:2 *cis*-9, *trans*-11, ambos apresentam benefícios a saúde (Koba e Yanagita, 2013). O CLA está presente em outros produtos de origem animal, mas as maiores concentrações ocorrem no leite e carne de ruminantes, assim como em seus derivados (Koba e Yanagita, 2013). Portanto,

consumir leite ou carne de bovinos, búfalos, cabras, ovelhas, dentre outros ruminantes, agrega os benefícios do CLA para a saúde humana.

Como dito anteriormente, aumentar a concentração de AGPI no sangue e no leite de animais em lactação pode aumentar a ocorrência de lipoperoxidação. Portanto, é necessária uma fonte de antioxidante, como a vitamina E. Geralmente, vacas em experimentos avaliando a suplementação com vitamina E, encontram-se na fase de lactação ou periparto, em que a produção de radicais livres eleva o estresse oxidativo.

Spears e Weiss (2008) observaram redução de incidência de retenção de placenta, mastite, metrite, entre outras inflamações, pois a vitamina E age doando o átomo de hidrogênio do grupo hidroxila do anel aromático aos radicais livres, interrompendo suas ações sobre os lipídios e inibindo a reação em cadeia de um radical livre em formar outros (Araujo, 2011) no organismo. Contudo, os benefícios da suplementação com vitamina E não ficam somente para o animal que consome, mas também passam para o leite (Gobert et al., 2009), aumentando o tempo de prateleira, assim como o potencial antioxidante, importante para saúde humana.

Além das vantagens com o potencial antioxidante da vitamina E, é possível melhorar outros parâmetros. A vitamina E no rúmen, é capaz de aumentar a digestibilidade da fibra, como observado por Naziroğlu et al. (2002) e Hino et al. (1993), pois, provavelmente, deve atuar sobre os micro-organismos do rúmen favorecendo a população e atuação das bactérias celulolíticas. Portanto, associar os benefícios da suplementação com o óleo de linhaça e antioxidantes, possibilita melhorar o perfil lipídico do sangue ou do leite, sem aumentar a lipoperoxidação sanguínea (Gladine et al., 2007, Gobert et al., 2009, Santos et al., 2016) e corrigir a redução da digestibilidade da fibra ocasionada pela suplementação lipídica.

Referências

(Animal Feed Science and Technology)

- Alvez, T.C., Rodrigues, R., Souza, A.A.A., Gameiro, A.H. 2010. Comunicação da qualidade do mozzarella de búfala por laticínios aos consumidores finais sinalização das características do queijo pelas empresas. *Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"* 65, 26-34.
- Araujo, J. 2011. *Química de alimentos: teoria e prática*. 5 ed. Editora UFV. Viçosa, BR.
- Bernardes, O. 2013. Produção de Búfalas Leiteiras. Anais do IV Simpósio Nacional de bovinocultura Leiteira (SIMLEITE). Viçosa, BR. 279-316
- Chikunya, S., Demirel, G., Enser, M., Wood, J.D., Wilkinson, R. G., Sinclair, L.A. 2004. Biohydrogenation of dietary n-3 PUFA and stability of ingested vitamin E in the rumen, and their effects on microbial activity in sheep. *Br. J. Nutr.* 91, 539-550.
- Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S. 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Méd. Bras.* 43, 61-68.
- Food and Agriculture Organization (FAO). Acessado em 24 de janeiro de 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>.
- Gladine, C., Morand, C., Rock, E., Bauchart, D., Durand, D. 2007. Plant extracts rich in polyphenols (PERP) are efficient antioxidants to prevent lipoperoxidation in plasma lipids from animals fed n-3 PUFA supplemented diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136, 281-296.
- Gobert, M., Martin, B., Ferlay, A., Chilliard, Y., Graulet, B., Pradel, P., Bauchart, D., Durand, D. 2009. Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Dairy Sci.* 92, 6095–6104.
- Hino, T., Andoh, N., Ohgi, H. 1993. Effects of β -carotene and α -tocopherol on rumen bacteria in the utilization of long-chain fatty acids and cellulose. *J. Dairy Sci.* 76, 600-605.
- Jenkins, T.C. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76, 3851-3863.
- Koba, K., Yanagita, T. 2013. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obes. Res. Clin. Prac.* 8, e525-e532.
- Lima, F.E.L., Menezes, T.N., Tavares, M.P., Szarfarc, S.C., Fisberg, R.M. 2000. Ácidos graxos e doenças cardiovasculares: uma revisão. *Rev. Nutr.* 13: 73-80.
- Martin, C.A., Almeida, V.V., Ruiz, M.R., Visentainer, J.E.L., Matshushita, M., Souza, N.E., Visentainer, J.V. 2006. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr.* 19, 761-770.
- Ménard, O., Ahmad, S., Rousseau, F., Briard-Bion, V., Gaucheron, F., Lopez, C. 2010. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. *Food Chem.* 120, 544-551.
- Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska, E., Madsen, F.C. 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy Sci.* 76, 2812-2823.
- Nasri, F. 2008. O envelhecimento populacional no Brasil. *Einstein*, 6, S4-S6.
- Naziroğlu, M., Güler, T., Yüce, A. 2002. Effect of vitamin E on ruminal fermentation *in vitro*. *J. Vet. Med. A.* 49, 251–255.
- Nussio, L.G., Campos, F.P., Lima, M.L.M. 2011. Metabolismo de carboidratos estruturais, p.193- 237. in: *Nutrição de Ruminantes*. V.1, 2ed. Berchielli, T.T., Pires, A.V., Oliveira, S.G. Editora FUNEP. Jaboticabal, BR.

- Palmquist, D.L. 2006. Milk Fat: Origin of Fatty Acids and Influence of Nutritional Factors Thereon, p.43-92 in: *Advanced Dairy Chemistry, V.2. Lipids*, 3 ed. Edited by P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, Springer, New York.
- Palmquist, D.L., Mattos, W.R.S. 2011. Metabolismo de lipídios, p.299-322 in: *Nutrição de Ruminantes. V.1*, 2ed. Berchielli, T.T., Pires, A.V., Oliveira, S.G. Editora FUNEP. Jaboticabal, BR.
- Panda, N., Kaur, H., Mohanty, T.K. 2006. Reproductive performance of dairy buffaloes supplemented with varying levels of vitamin E. *Asian-Aust. J. Anim. Sci. Sciences* 19, 19-25.
- Paul, S.S., Lal, D. 2010. Nutrient Requirements of Buffaloes. In: Azadpur, Delhi, Índia: Satish Serial Publishing House. 138p.
- Rodrigues, C.F.D.C., Iapichini, J.E.C.B., Liserre, A.M., Souza, C.B., Fachini, C., Reichert, R.H. 2008. Oportunidades e desafios da bubalinocultura familiar da região sudoeste paulista. *Rev. Tecnol. & Inov. Agro* 100-109.
- Santillo, A., Caroprese, M., Marino, R., Seviand, A., Albenzio, M. 2016. Quality of buffalo milk as affected by dietary protein level and flaxseed supplementation. *J. Dairy Sci.* 99, 7725-7732.
- Santos, R.D., Gagliardi, A.C.M., Xavier, H.T., Magnoni, C.D., Cassani, R., Lottenberg A.M. 2013. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol.* 100, 1-40.
- Santos, N.W., Yoshimura, E.H., Machado, E., Matumoto-Pintro, P.T., Montanher, P.F., Visentainer, J.V., Santos, G.T., Zeoula, L.M. 2016. Antioxidant effects of apropolis extract and vitamin E in blood and milk of dairy cows fed diet containing flaxseed oil. *Livest. Sci.* 191, 132-138.
- Simopoulos, A. P. 2002. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *J. Am. Coll. Nutr.* 21: 495-505.
- Simopoulos, A. P. 2006. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomed. Pharmacother.* 60, 502-507.
- Sordillo, L.M., Aitken, S.L. 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 104-109.
- Spears, J.W., Weiss, W.P. 2008. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet. J.* 176, 70-76.
- Verruma, M.R., Salgado, J.M. 1994. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. *Sci Agric.* 51, 131-137.
- Viladomiu, M., Hontecillas, R., Bassaganya-Riera, J. 2015. Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 785, 87-95.
- Zingg, J. M., Azzi, A. 2004. Non-antioxidant activities of vitamin E. *Curr. Med. Chem.* 11, 1113-1133.

OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o efeito da adição de óleo de linhaça, da vitamina E e a associação de ambos na dieta de búfalas sobre o consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes.

Avaliar a influência da adição de óleo de linhaça, da vitamina E e a associação de ambos na dieta sobre os parâmetros sanguíneos e a composição do leite;

Avaliar a capacidade antioxidante e estabilidade oxidativa dos ácidos graxos no sangue e no leite ao utilizar vitamina E em dietas com e sem adição de óleo de linhaça;

Determinar o efeito da suplementação com óleo de linhaça, da vitamina E e associação de ambos sobre perfil lipídico do leite.

II - Composição lipídica e atividade antioxidante do leite e do sangue de búfalas suplementadas com óleo de linhaça e vitamina E na dieta

(Animal Feed Science and Technology)

Resumo

Objetivou-se avaliar o efeito da adição de óleo de linhaça e/ou da vitamina E sobre o consumo de matéria seca, digestibilidade dos nutrientes, antioxidantes e estabilidade oxidativa no sangue e no leite e perfil lipídico do leite de búfalas em lactação. Foram utilizadas quatro fêmeas bubalinas mestiças, após o pico de lactação (97 ± 22 dias de lactação), com peso corporal médio de 655 ± 37 kg, submetidas a uma ordenha diária com presença do bezerro, distribuídas em um quadrado latino 4×4 , em esquema fatorial 2×2 (óleo: presença e ausência; e vitamina E: presença e ausência). Assim, foram compostas as dietas experimentais: controle (ausência de óleo e vitamina); dieta com óleo de linhaça, 25 g/kg MS; dieta com vitamina E, 375 UI/kg MS; dieta com óleo (25 g/kg MS) e com vitamina E (375 UI/kg MS). O óleo foi pesado juntamente com o concentrado, enquanto a vitamina E foi fornecida em uma porção de aproximadamente 50g da ração total misturada, após a ingestão total dessa parcela o restante da alimentação foi fornecida. O consumo e os parâmetros sanguíneos não tiveram efeitos ($P > 0,05$) da adição de óleo de linhaça e/ou da vitamina E. Entretanto, a adição de óleo reduziu ($P < 0,01$) a digestibilidade da fibra em detergente neutro, aumentou a do extrato etéreo ($P < 0,01$) e aumentou ($P < 0,05$) a produção e a densidade do leite e também o TBARS e dieno conjugado. Ainda, ocasionou tendência de aumento dos ácidos graxos (AG) de cadeia longa ($P = 0,06$), aumentos ($P < 0,05$) dos AG de cadeia média, de cadeia curta e dos poli-insaturados, concentração de n-3 e reduziu a razão n-6/n-3 ($P = 0,01$) no leite, a atividade da enzima $\Delta 9$ -dessaturase ($P = 0,01$), a concentração de gordura do leite ($P = 0,04$) e tendência de redução de sólidos totais ($P = 0,08$). A vitamina E causou aumentos na digestibilidade da fração fibrosa ($P < 0,05$), no poder redutor do leite ($P = 0,01$), na atividade da enzima $\Delta 9$ -dessaturase, na capacidade antioxidante total no sangue ($P = 0,10$) e reduziu a produção de TBARS ($P = 0,02$). A interação entre o óleo e a vitamina E promoveu tendência de aumentos da capacidade antioxidante total ($P = 0,07$) e do poder redutor do leite ($P = 0,07$). Tanto a adição do óleo quanto da vitamina E reduziram os índices de trombogenicidade e aterogenicidade. Associando a fonte lipídica com a vitamina E, é possível obter uma melhora da atividade antioxidantes no

organismo das búfalas, assim como obter perfil lipídico melhorado e com boa estabilidade oxidativa em leite de búfalas.

Palavras-chave: ácido graxo poli-insaturado, digestibilidade, lipoperoxidação, ômega-3.

Abreviações: AG, ácido graxo; AGS, ácido graxo saturado; AGPI, ácido graxo poli-insaturado; n-3, ômega-3; n-6, ômega-6; CLA, ácido linoleico conjugado; MS, matéria seca; MN, matéria natural; MM, matéria mineral; PB, proteína bruta; FDN, fibra em detergente neutro; FDA, fibra em detergente ácido; EE, extrato etéreo; CT, carboidrato totais; CNF, carboidratos não fibrosos; DC, hidroperóxidos dieno conjugados; CAT, capacidade antioxidante total; TBARS, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

II - Lipid composition and antioxidant activity of buffalo milk and blood supplemented with flaxseed oil and vitamin E in the diet

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of the addition of flaxseed oil and/or vitamin E on DM (dry matter) intake, nutrient digestibility, antioxidants and oxidative stability in blood and milk and milk lipid profile of lactating buffaloes. Four crossbred buffalo females were used, after the peak of lactation (97 ± 22 days of lactation), mean body weight of 655 ± 37 kg submitted to a daily milking with the presence of the calf, distributed in a 4×4 Latin square design, in a 2×2 factorial arrangement (Oil: presence and absence, and vitamin E: presence and absence). This is how the experimental diets were composed: control (absence of oil and vitamin); Diet with flaxseed oil, 25 g/kg DM; Diet with vitamin E, 375 IU/kg DM; Diet with flaxseed oil (25 g/kg DM) and vitamin E (375 IU/kg DM). The oil was weighed together with the concentrate, while vitamin E was supplied in a portion of approximately 50 g of the total mixed feed, after the total intake of that portion the rest of the feed was provided. The intake of ethereal extract increased and non-fibrous carbohydrates reduced in the diets with flaxseed oil. Blood parameters had no effect ($P>0.05$) on the addition of flaxseed oil and/or vitamin E. However, the addition of oil reduced the digestibility of neutral detergent fiber ($P<0.01$), increased digestibility of ethereal extract ($P<0.01$) and increased ($P<0.05$) milk production and density, as well as TBARS and conjugated diene. In addition, there was a tendency for long chain fatty acids (FA) to increase ($P=0.06$), increases ($P<0.05$) in medium chain FA, short chain and polyunsaturated, n-3 concentration and reduced the n-6/n-3 ratio in the milk and the activity of the enzyme $\Delta 9$ -desaturase ($P=0.01$), milk fat concentration ($P=0.04$) and tendency to reduce the total solids ($P=0.08$). Vitamin E increased the digestibility of the fibrous fraction ($P<0.05$), the milk reducing power ($P=0.01$), the $\Delta 9$ -desaturase enzyme activity, the total antioxidant capacity in the blood ($P=0.10$) and reduced the production of TBARS ($P=0.02$). The interaction of the oil and the vitamin E promoted a tendency of increases in total antioxidant capacity ($P=0.07$) and milk reducing power ($P=0.07$). Both the addition of the oil and vitamin E reduced the rates of thrombogenicity and atherogenicity. Associating the lipid source with vitamin E is possible to obtain an improvement of the antioxidant activity in the buffalo's body, as well as to obtain an improved lipid profile and with good oxidative stability in buffalo milk.

Introdução

O leite de búfala apresenta uma qualidade diferenciada quando comparada ao de vaca, com maior quantidade de sólidos totais (170 vs. 120 g/kg), gordura (81,6 vs. 36,8 g/kg), proteína (45 vs. 37 g/kg) e cálcio (18,8 vs. 13 g/kg) (Verruma e Salgado, 1994). Consequentemente, apresenta um maior rendimento para indústria de derivados lácteos, além de ser mais saudável, devido ao teor mais elevado de vitamina A e reduzido teor de colesterol (El-Salam e El-Shibiny, 2011).

Devido à instalação do fenômeno de envelhecimento populacional, os consumidores estão em busca de produtos saudáveis, para que se consiga chegar às idades mais avançadas com plena saúde. Os diferenciais que tornam o leite de búfala mais saudável, como citados anteriormente, têm aumentando a procura pelos queijos e seus derivados oriundos do leite, devido os novos hábitos da população.

A substituição de produtos com altas concentrações de ácidos graxos saturados (AGS) por aqueles com ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) é uma das principais mudanças no hábito alimentar, pois os AGS estão relacionados com a ocorrência de doenças do sistema cardiovascular (Santos et al., 2013).

A suplementação de animais em lactação com fontes de AGPI, como o caso do óleo de linhaça, rico em ácido linolênico, modifica o perfil lipídico do leite de búfala, tornando-o ainda mais saudável. Isso se deve ao aumento das concentrações de AGPI, CLA, além da redução da razão ômega-6/ômega-3 (Santillo et al., 2016), que, quando elevada, é capaz de prejudicar o organismo através de reações inflamatórias (Santos et al., 2013). Entretanto, o aumento dos AGPI na gordura do leite, este torna-se mais susceptível à lipoperoxidação, pois as duplas ligações são mais sensíveis à ação de radicais livres e a luz (Araujo, 2011).

Uma forma de melhorar a estabilidade oxidativa no organismo animal e no leite, com modificações no perfil lipídico, é a utilização de antioxidantes na alimentação dos animais lactantes. O principal antioxidante utilizado na nutrição animal é a vitamina E, fornecido como acetato de α -tocoferol, que age inibindo a peroxidação natural dos AGPI, além de eliminar os radicais livres (Zeoula e Geron, 2011).

No organismo, os antioxidantes são capazes de reduzir a lipoperoxidação sanguínea (Gladine et al., 2007; Gobert et al., 2009), ocorrência de retenção de placenta (Brzezinska-Slebozinsk et al., 1994), mastite clínica (Weiss et al., 1990), aumentar a atividade do sistema imune (Hogan et al., 1992; Politis et al., 2001), além de atrasar as

reações de oxidação, revertendo os problemas de lipoperoxidação ocasionados pela suplementação lipídica (Gobert et al., 2009). Enquanto que no leite, a vitamina E aumenta a estabilidade oxidativa e reduz a síndrome da depressão da gordura do leite ocasionada pela adição de AGPI na dieta (Pottier et al., 2006) e aumenta a capacidade antioxidante (Santos et al., 2016).

Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito da adição de óleo de linhaça, da vitamina E e a associação de ambos sobre o consumo e digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes, composição, antioxidantes e estabilidade oxidativa no sangue e no leite de búfalas.

1. Material e Métodos

1.1. Animais e dietas

O experimento desenvolvido atendeu às orientações do Comitê de Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá, PR, sob número de aprovação 4342160216/2015. O experimento foi conduzido no setor de Digestibilidade de Bovídeos, da Fazenda Experimental de Iguatemi, as análises dos alimentos, sobras, fezes e sangue foram realizadas no Laboratório de Alimentação e Nutrição Animal (LANA) e as análises de leite no Centro Mesorregional de Excelência em Tecnologia de Leite – Região Noroeste, ambos pertencentes à Universidade Estadual de Maringá.

Foram utilizadas quatro fêmeas bubalinas mestiças, após o pico de lactação (97 ± 22 dias de lactação), com peso corporal médio de 655 ± 37 kg, submetidas a uma ordenha diária com presença do bezerro as 08h00min. As búfalas foram mantidas em baias individuais, providas de piso de concreto, cobertura com telha de fibrocimento, bebedouro e comedouro. Os animais foram distribuídos em quadrado latino 4x4, composto por quatro dietas e quatro períodos, em esquema fatorial 2x2 (óleo: sem adição e com adição; e vitamina E: sem suplementação e com suplementação). A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, às 08h30min e às 16h00min e a ingestão foi *ad libitum* permitindo de 50 a 100 g de sobras/kg do fornecido.

O experimento consistiu de 84 dias e foi dividido em quatro períodos experimentais de 21 dias, sendo 16 dias de adaptação aos tratamentos e cinco dias de coleta de dados.

As dietas foram isoproteicas e isoenergéticas, formuladas de modo a atender às exigências nutricionais de búfalas pesando 650 kg e produção diária de 8 kg de leite

com 65 g/kg de gordura (Paul e Lal, 2010). A alimentação consistiu de 700 g/kg de matéria seca (MS) de volumoso e 300 g/kg de MS de concentrado.

Tabela 1. Proporção dos ingredientes e composição química das dietas

Item	Dietas	
	Sem óleo	Com óleo
Proporção de ingredientes (g/kg de MS)		
Silagem de milho	700	700
Milho moído	112,9	40
Farelo de soja	61,3	53,3
Farelo de trigo	92,6	148,5
Óleo de linhaça	0	25
Suplemento mineral e vitamínico	20	20
Calcário	8,8	8,8
Ureia	4	4
Sulfato de Amônia	0,4	0,4
Análises químicas		
Matéria seca (g/kg de MN)	472,6	476,4
Matéria orgânica (g/kg de MS)	928,2	922,5
Proteína Bruta (g/kg de MS)	116,3	116,7
Extrato Etéreo (g/kg de MS)	26,4	50,7
Fibra em detergente neutro (g/kg de MS)	497,9	507,0
Fibra em detergente ácido (g/kg de MS)	252,9	256,7
Carboidratos não fibrosos (g/kg de MS)	299,1	263,2
Carboidratos totais (g/kg de MS)	792,2	764,9
Nutrientes digestíveis totais	705,6	697,6
Ácidos graxos (g/kg de MS)		
16:0	5,86	6,00
18:0	3,66	4,91
18:1n9	5,27	5,71
18:1n7	0,61	0,61
18:2n6	34,76	37,39
18:3n3	4,84	18,59
n6	40,51	43,02
n3	4,84	16,84
n6/n3	8,37	2,56

MS= matéria seca; MN= matéria natural. Composição do suplemento mineral e vitamínico (por kg de produto): 145g de cálcio, 51g de fósforo, 20g de enxofre, 33g de magnésio, 28g de potássio, 93g de sódio, 30mg de cobalto, 400mg de cobre, 10mg de cromo, 2000mg de ferro, 40mg de iodo, 1350mg de manganês, 15mg de selênio, 1700mg de zinco, 510mg de flúor.

As dietas experimentais foram: a) dieta controle (sem óleo e sem vitamina E); b) dieta com vitamina E (375 UI/kg de MS por dia); c) dieta com óleo de linhaça (25 g/kg do total fornecido de MS por dia); d) dieta com óleo de linhaça + vitamina E. O

volume diário de óleo de linhaça (Lino-oil, Cisbra, Panambi, RS) e da vitamina E foram fornecidos nos horários da alimentação, ambos divididos em duas doses diárias, proporcional a alimentação da manhã e da tarde. O óleo de linhaça foi pesado e misturado ao concentrado antes do fornecimento da alimentação. Para assegurar a ingestão da vitamina E, antes de fornecer toda a alimentação, esta foi previamente pesada e adicionada a uma porção de aproximadamente 50g da ração total misturada (silagem de milho e concentrado) e submetida ao animal. Somente após a total ingestão, foi fornecido o restante da alimentação. Foi utilizada a vitamina E na forma de acetato de α -tocoferol (Microvit E Promix 500.000 UI/kg, Adisseo, São Paulo, SP).

1.2. Coleta e processamento das amostras

Foram pesados e registrados diariamente a quantidade de alimentos fornecidos, sobras e produção de leite de cada animal. Os alimentos, sobras e fezes foram amostrados diariamente do 17° ao 21° dia de cada período experimental. As amostras de fezes foram coletadas diretamente da ampola retal, às 08h30min e 16h30min, totalizando 10 amostras/animal/período. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e congeladas. Posteriormente, foram secas em estufa de ventilação forçada de ar a 55°C por 72 horas, moídas individualmente em moinho de faca (Marconi MA340, Piracicaba, SP) com peneira de crivo de 2 mm para as determinação do FDNi (fibra em detergente neutro indisponível) e em seguida à 1 mm para as análises bromatológicas. As amostras de fezes e sobras constituíram uma amostra composta por período e por tratamento.

As coletas de sangue foram realizadas no 21° dia de cada período, quatro horas após o fornecimento da alimentação da manhã, por punção da veia jugular com tubos Vacutainer® contendo K₂EDTA. Em seguida os tubos foram centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos, os plasmas foram transferidos para *ependorf* e imediatamente congelados para determinação do colesterol, LDL, ureia, triglicérides e parâmetros antioxidantes.

Para análise de composição e qualidade do leite, foram coletadas amostras do 17° ao 21° dia. Parte do leite foi mantida a temperatura ambiente e conservado com 2-bromo-2-nitropropano-1, 3-diol (Bronopol, San Ramon, CA, EUA) para determinação dos teores de gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e densidade. A outra parte, sem adição de conservantes, foi armazenada sob congelamento para

determinação da concentração de ácidos graxos, parâmetros antioxidantes e nitrogênio ureico no leite (NUL).

1.3. Análises químicas

Os teores de MS das amostras foram determinados em estufa, de acordo com o método n° 924.01 da AOAC (1990). A matéria mineral (MM) foi determinada por combustão em mufla a 600°C durante 6 horas, de acordo com o método n° 924.05 da AOAC (1990), enquanto a matéria orgânica (MO) foi obtida pela diferença entre a MS e MM. A determinação do nitrogênio (N) total foi realizada de acordo com o método n° 990.03 da AOAC (1990). A fibra em detergente neutro (FDN) foi determinada de acordo com Van Soest et al. (1991), com utilização de α -amilase termo resistente, sem sulfito de sódio. A fibra em detergente ácido (FDA) foi determinada de acordo com o método n° 973.18 da AOAC (1990). O extrato etéreo (EE) foi determinado de acordo com o método n° 7.060 da AOAC (1990). Os carboidratos totais (CT) foram obtidos através da equação descrita por Sniffen et al. (1992): $CT (g/kg) = 1000 - (g/kgPB + g/kg EE + g/kg MM)$. Os carboidratos não fibrosos (CNF) e os nutrientes digestíveis totais (NDT) foram estimados através das respectivas equações descritas por Weiss (1999): $CNF (g/kg) = 1000 - (g/kg PB + g/kg FDN + g/kg EE + g/kg MM)$ e $NDT (g/kg) = g/kg CNF digestível + g/kg PB digestível + g/kg FDN digestível + (g/kg EE digestível \times 2,25)$.

Para estimativa da produção fecal, foram determinadas as concentrações de FDNi nas fezes, alimentos e sobras. As amostras moídas à 2 mm foram acondicionadas em saquinhos F57 da ANKOM®. Os saquinhos foram incubados por 288 horas em três búfalas canuladas, com duplicata por animal, alimentadas com dieta padrão de 700 g/kg de pastagem do gênero *Cynodon* spp, e 300 g/kg de concentrado formulado para búfalas em manutenção (Vanzant et al, 1998). Após retirados do rúmen, os saquinhos foram lavados com água corrente até o clareamento desta. Em seguida os saquinhos foram submetidos a solução de detergente neutro no equipamento Determinador de Fibra (Tecnal TE 149, Piracicaba, SP, Brasil) a 100°C durante 60 minutos e lavados duas vezes com água quente durante 15 minutos, imersos em acetona durante 5 minutos. Posteriormente foram secos em estufas de ventilação forçada de ar a 55°C durante 24 horas e mantidos 2 horas em estufa à 105°C (Detmann et al., 2012).

A determinação das concentrações plasmáticas de colesterol total, LDL, triglicérides e ureia foram realizadas através dos *kits* comerciais (Gold Analisa®, Belo

Horizonte, MG) e as leituras em espectrofotômetro (Bioplus 2000®, São Paulo, SP). As concentrações de VLDL e HDL foram estimadas através das respectivas equações de Friedewald: $VLDL \text{ (mg/dL)} = \text{triglicerídeos (mg/dL)}/5$ e $LDL \text{ (mg/dL)} = \text{colesterol total (mg/dL)} - HDL \text{ (mg/dL)} - VLDL \text{ (mg/dL)}$ (Friedewald et al., 1972).

A análise de hidroperóxidos dieno conjugados (DC) no sangue foi realizada com o intuito de determinar a lipoperoxidação através da adição do íon cobre, conforme descrito por Gobert et al. (2009). Foi adicionado em uma cubeta 25 μL de plasma e 3 mL de sulfato de cobre (25 μM) preparado com tampão fosfato (pH 7), a cada minuto durante 3 horas à 37°C foi realizada uma leitura de absorvância em espectrofotômetro UV-Vis. Os resultados foram analisados de acordo com Pinchuk e Lichtenberg (2002). Através da curva oriunda das absorvâncias, obteve-se a $DO_{\text{máx}}$ (densidade ótica do acúmulo máximo de DC), TVM (tempo para atingir a máxima taxa de oxidação) e a V_{max} (velocidade máxima de produção de DC).

A capacidade antioxidante total (CAT) do sangue foi determinada conforme metodologia descrita por Erel (2004), com modificações. Foi adicionado 25 μL de plasma sanguíneo a 1000 μL de tampão acetato de sódio 0,4 mol/L (pH 5,8) e 100 μL de $ABTS^+$ em tampão acetato de sódio 30 mmol/L (pH 3,6) em um tubo. A mistura foi agitada em vortex e transferida para cubeta, A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS a 660 nm e a atividade antioxidante foi expresso em equivalente Trolox (ET; mg/L).

As concentrações de gordura, proteína, lactose, extrato seco desengordurado e densidade do leite, foram determinadas por método ultrassônico (Analisador de leite Ekomilk Total®, CapLab, São Paulo, SP, Brasil). A determinação da concentração de nitrogênio ureico no leite (NUL) foi por meio do *kit* comercial (Gold Analisa®, Belo Horizonte, MG) e as leituras em espectrofotômetro (Bioplus 2000®, São Paulo, SP). As concentrações dos sólidos totais foram calculadas por meio da adição da concentração de gordura ao extrato seco desengordurado.

Os extratos das amostras de leite para proceder com as análises da capacidade antioxidante total e poder redutor, foram obtidos através da adição de 9mL de metanol em 1 mL de leite. A mistura foi agitada em vortex durante 5 minutos e centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado com filtro PTFE e utilizado nas análises.

O poder redutor das amostras de leite foi determinado de acordo com Zhu et al. (2002), com modificações de Santos et al. (2014). A leitura da absorvância foi realizada

em espectrofotômetro UV-Vis a 700 nm e o poder redutor foi expresso em equivalente ácido gálico (EAG; mg/L).

A capacidade antioxidante total (CAT) das amostras de leite foi determinada como descrito por Rufino et al. (2007) com a adição do radical ABTS⁺ (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) ao extrato. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-Vis a 734 nm após 6 minutos de reação. A CAT foi expressa em equivalente Trolox (μM Trolox/mL).

A análise de produção de hidroperóxidos dieno conjugados foi realizada conforme metodologia descrita por Kiokias et al. (2006), sendo adicionado 50 μL de leite à 2,5 mL de uma solução isooctano/2-propanol (2:1, v/v) em um tubo e agitado por um minuto em vortex. A mistura foi filtrada em filtro de membrana PTFE 0,22 μm e a absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis a 232 nm, sendo expressa em mmol/kg de gordura.

A análise de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) foi realizada segundo Vyncke (1970) com modificações, sendo adicionado 500 μL de leite à 2 mL de solução composta por ácido tiobarbitúrico (10:990, v/v), ácido tricloroacético (150:850, v/v) e ácido clorídrico (0,05:999,95, v/v). A mistura foi agitada em vortex e submetida à 100°C durante 15 minutos, seguido por um banho frio durante 5 minutos, centrifugada à 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para cubeta e a absorbância determinada em espectrofotômetro UV-Vis a 538 nm. Os valores foram expressos como mmol de malonaldeído/kg de gordura.

Os lipídios totais dos alimentos concentrados foram extraídos com clorofórmico, metanol e água, na proporção 2:2:1,8, conforme descrito por Bligh e Dyer (1959). Os lipídios totais das amostras de leite foram extraídos com clorofórmio, metanol e água, na proporção 2:1:1, conforme descrito por Folch et al. (1957). A transesterificação foi realizada através da metilação das amostras, de acordo com a metodologia de Hartman e Lago (1973), modificado por Maia e Rodrigues-Amaya (1993).

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados por um cromatógrafo à gás (Thermo, modelo Trace Ultra 3300), equipado com coluna capilar de sílica fundida (CP – 7420, Select FAME, 100 m x 0,25 mm d.i. e 0,25 μm de cianopropil) e detector de ionização de chama (Martin et al., 2008). O fluxo dos gases foi de 1,2 mL/min para o gás de arraste (H_2), 30 mL/min para o gás auxiliar (N_2) e 35 mL/min para o H_2 e 350 mL/min para o gás sintético. O volume do material injetado foi de 2,0 μL , com uso de

divisão da amostra de 1:80. As temperaturas do injetor e do detector foram 240°C. A temperatura da coluna foi de 165°C durante 7 minutos, seguida pela primeira rampa de aquecimento de 4°C/min até atingir 185°C, mantida por 12 minutos, seguida por outra rampa de aquecimento de 6°C/min, até atingir 235°C, totalizando 25 minutos de análise. As áreas dos picos e os tempos de retenção foram determinados através do software ChromQuest 5.0. Os AG identificados baseados em comparações dos tempos de retenção com o padrão 189-19 (Sigma- Aldrich, São Paulo, Brasil). Para a quantificação absoluta dos AG foi realizada a normalização interna, sendo utilizado como padrão o éster metílico do ácido tricosanoico (Sigma-Aldrich Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

Os cálculos foram realizados conforme o método de Joseph e Ackman (1992) e os fatores correção teóricos (Visentainer, 2012) foram empregados para determinar as concentrações. As quantidades de AG foram calculadas em mg/g de lipídios totais (mg AG/g LT).

Os índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT) foram obtidos através das equações a seguir, propostas por Ulbricht e Southgate (1991):

$$IA = (C12:0 + 4.C14:0 + C16:0)/[\Sigma AGMI + \Sigma AGPI(n-6 + n-3)]$$

$$TI = (C14:0 + C16:0 + C18:0)/[0.5 . \Sigma AGMI + 0,5 . \Sigma AGPI (n-6) + 3.\Sigma AGPI (n-3) + (n-3)/(n-6)].$$

A atividade da enzima $\Delta 9$ -dessaturase foi estimada de acordo com as equações a seguir, propostas por Schennink et al. (2008):

$$\text{cis } 9-14:1/14:0 = [C14:1 \text{ cis-9}/(C14:0 + C14:1 \text{ cis-9})].100;$$

$$\text{cis } 9-16:1/16:0 = [C16:1 \text{ cis-9}/(C16:0 + C16:1 \text{ cis-9})].100;$$

$$\text{cis } 9-18:1/18:0 = [C18:1 \text{ cis-9}/(C18:0 + C18:1 \text{ cis-9})].100.$$

1.4. Análises estatísticas

Os resultados foram submetidos ao procedimento MIXED do SAS (Statistical Analysis System, 9.0) para uma análise de variância. Utilizou-se um delineamento experimental, em quadrado latino 4x4, em esquema fatorial 2x2. O modelo estatístico utilizado foi: $Y_{ijkl} = \mu + A_i + P_j + O_k + V_l + O_k^*V_l + e_{ijkl}$, em que: Y_{ijkl} = variáveis observadas; μ = média geral; A_i = efeito do animal i , variando de 1 a 4; P_j = efeito do período j , variando de 1 a 4; O_k = efeito do óleo de linhaça k , sem e com; V_l = efeito da vitamina E_l , sem e com; $O_k^*V_l$ = efeito da interação entre óleo de linhaça e vitamina E; e_{ijk} = erro aleatório. Para avaliar as diferenças entre as média foi utilizado o teste de Tukey, com nível de significância de $P \leq 0,05$ e tendência de $P \leq 0,10$.

2. Resultados

A adição de óleo de linhaça na dieta aumentou o consumo de EE ($P<0,01$) e reduziu o consumo de CNF ($P=0,01$) (Tabela 2). O consumo de MS e dos demais nutrientes, não tiveram influência das dietas ($P>0,05$).

Tabela 2. Consumo da matéria seca e dos nutrientes (kg/dia) por búfalas em lactação com adição de óleo de linhaça e vitamina E na dieta.

Consumo	Sem Óleo		Com Óleo		EPM	P		
	Sem Vit E	Com Vit E	Sem Vit E	Com Vit E		1	2	3
Matéria seca (kg/100kgPC)	2,08	2,02	2,04	1,89	0,05	0,20	0,13	0,46
Matéria seca (kg/dia)	13,30	13,59	12,76	12,88	0,31	0,35	0,75	0,89
Matéria orgânica	14,20	11,33	10,98	12,35	0,30	0,15	0,72	0,87
Proteína bruta	1,59	1,61	1,59	1,58	0,05	0,79	0,90	0,80
FDN	6,43	6,62	6,26	6,36	0,17	0,55	0,68	0,89
FDA	3,34	3,33	3,24	3,17	0,09	0,42	0,79	0,88
Extrato etéreo	0,37	0,38	0,64	0,66	0,04	<0,01	0,62	0,98
Carboidratos não fibrosos	4,08	4,13	3,45	3,45	0,13	0,01	0,90	0,87
Carboidratos totais	10,44	10,74	9,60	9,77	0,28	0,12	0,66	0,90

Efeitos testados: 1= efeito da adição do óleo de linhaça; 2= adição de vitamina E; 3= efeito da interação entre o óleo e a vitamina E; EPM= erro padrão da média; PC= peso corporal; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra em detergente ácido. Nível de significância de $P\leq 0,05$ e tendência de $P\leq 0,10$.

Não houve interação de óleo de linhaça e vitamina E sobre a digestibilidade de matéria seca e dos nutrientes, com exceção para a digestibilidade dos CNF que mostrou tendência para interação ($P=0,08$) (Tabela 3).

Tabela 3. Digestibilidade da matéria seca e dos nutrientes de búfalas em lactação com adição de óleo de linhaça e vitamina E na dieta

Digestibilidade total	Sem Óleo		Com Óleo		EPM	P		
	Sem Vit E	Com Vit E	Sem Vit E	Com Vit E		1	2	3
Digestibilidade Total (kg/kg)								
Matéria Seca	0,68	0,69	0,67	0,68	<0,01	0,02	0,08	0,49
Matéria Orgânica	0,70	0,70	0,67	0,68	<0,01	<0,01	0,07	0,37
Proteína Bruta	0,67	0,65	0,69	0,70	0,01	0,07	0,76	0,53
FDN	0,58	0,61	0,55	0,57	0,01	<0,01	0,02	0,71
FDA	0,59	0,57	0,53	0,53	0,01	<0,01	0,75	0,50
Extrato Etéreo	0,85	0,85	0,90	0,93	0,01	<0,01	0,32	0,16
Carboidratos não fibrosos	0,89	0,87	0,87	0,88	<0,01	0,62	0,12	0,08
Carboidratos totais	0,70	0,71	0,66	0,68	<0,01	<0,01	0,01	0,43
NDT	0,70	0,71	0,69	0,70	<0,01	0,08	0,06	0,28

Efeitos testados: 1= efeito da adição do óleo de linhaça; 2= adição de vitamina E; 3= efeito da interação entre o óleo e a vitamina E; EPM= erro padrão da média; FDN= fibra em detergente neutro; FDA= fibra

em detergente ácido; NDT= nutrientes digestíveis totais. Nível de significância de $P \leq 0,05$ e tendência de $P \leq 0,10$.

Houve efeito isolado do óleo de linhaça e da vitamina E sobre a digestibilidade. A adição de óleo reduziu a digestibilidade da MS ($P=0,02$), da MO ($P<0,01$), da FDN ($0,01$), da FDA ($P<0,01$) e dos CT ($P<0,01$) e aumentou a digestibilidade do EE ($P<0,01$) (Tabela 3). Entretanto, foram observadas tendências para o aumento da digestibilidade da PB ($P=0,07$) e para redução do NDT ($P=0,08$) ao utilizar óleo nas dietas. A adição de vitamina E aumentou ($P=0,02$) a digestibilidade da FDN, promovendo o aumento da digestibilidade dos CT ($P=0,01$) e tendências de aumentos para digestibilidade da MS ($P=0,08$), MO ($P=0,07$) e NDT ($P=0,06$).

Não houve interação do óleo e vitamina E, assim como efeitos isolados da adição do óleo de linhaça ou da vitamina E sobre os parâmetros sanguíneos e na análise dos hidroperóxidos dienos conjugado (DC). Contudo, a adição de vitamina E apresentou tendência em aumentar ($P=0,10$) a capacidade antioxidante total (CAT) no sangue (Tabela 4).

Tabela 4. Composição e capacidade antioxidante sanguínea de búfalas em lactação com adição de óleo de linhaça e vitamina E na dieta

	Sem Óleo		Com Óleo		EPM	P		
	Sem Vit E	Com Vit E	Sem Vit E	Com Vit E		1	2	3
Composição (mg/100mL)								
Ureia	36,50	34,25	33,75	33,25	1,20	0,16	0,28	0,48
Triglicérides	12,25	13,25	12,50	17,50	1,10	0,48	0,30	0,27
Colesterol total	119,25	121,75	115,25	113,25	3,25	0,41	0,97	0,76
HDL	65,00	67,50	67,00	65,25	2,26	0,93	0,98	0,63
LDL	50,28	51,80	45,13	44,40	1,99	0,16	0,11	0,30
VLDL	2,48	2,70	2,63	3,60	0,21	0,20	0,92	0,80
Antioxidante								
Vmax (DO/min)	0,08	0,07	0,08	0,06	0,01	0,58	0,23	0,48
TVM (min)	16,63	20,13	16,75	18,38	1,06	0,71	0,26	0,66
DOMax	2,53	2,82	2,55	2,14	0,37	0,16	0,76	0,14
CAT (μ M Trolox/mL)	283,02	342,52	208,61	314,06	24,14	0,26	0,10	0,60

Efeitos testados: 1= efeito da adição do óleo de linhaça; 2= adição de vitamina E; 3= efeito da interação entre o óleo e a vitamina E; EPM= erro padrão da média; DC= hidroperóxidos dieno conjugados; DOMax= densidade óptica do acúmulo máximo de DC; TVM= tempo para atingir a máxima taxa de oxidação; Vmax= velocidade máxima de produção de DC; CAT= capacidade antioxidante total. Nível de significância de $P \leq 0,05$ e tendência de $P \leq 0,10$.

A suplementação com óleo aumentou a produção de leite ($P=0,04$) (Tabela 5). Por outro lado, nos mesmos tratamentos, observou-se redução nas concentrações de gordura do leite ($P=0,04$), aumento da densidade ($P=0,02$) e tendência de redução dos

sólidos totais ($P=0,08$). A adição da vitamina E não resultou em modificação ($P>0,05$) da composição, produção e densidade do leite. A produção de leite corrigido para teor de gordura não diferiu ($P>0,05$) entre os tratamentos, assim como para o teor de extrato seco desengordurado.

Tabela 5. Produção, composição e qualidade oxidativa do leite de búfalas em lactação com adição de óleo de linhaça e vitamina E na dieta

Item	Sem Óleo		Com Óleo		EPM	P		
	Sem Vit E	Com Vit E	Sem Vit E	Com Vit E		1	2	3
PL (kg/dia)	6,15	5,50	7,26	6,68	0,57	0,04	0,20	0,93
PLC 35 g/kg ¹ (kg/dia)	9,03	8,51	9,92	9,54	0,75	0,21	0,53	0,92
Densidade (g/mL)	1,0318	1,0313	1,0325	1,0321	<0,01	0,02	0,82	0,45
Concentrações (g/kg)								
Gordura	64,84	68,20	59,24	61,23	1,67	0,04	0,29	0,77
Proteína	39,89	39,83	40,07	40,42	0,11	0,18	0,59	0,45
Lactose	48,96	48,83	49,21	49,92	0,18	0,13	0,48	0,31
ESD	96,13	95,88	96,88	97,78	0,32	0,11	0,67	0,45
Sólidos totais	161,00	164,10	156,10	169,00	1,60	0,08	0,25	0,96
NUL (mg/100mL)	18,26	17,09	17,85	17,38	0,66	0,94	0,30	0,65
Antioxidantes								
Poder redutor(mgEAG/L)	20,67	22,50	19,29	27,710	1,23	0,25	0,01	0,07
CAT (μ M Trolox/mL)	236,60	222,20	230,10	249,90	5,78	0,23	0,75	0,07
TBARS (mg MDA/L)	27,69	24,73	39,15	28,59	0,34	<0,01	0,02	0,12
DC (mmol/kg gord)	20,34	24,37	42,20	38,85	2,67	<0,01	0,87	0,12

Efeitos testados: 1= efeito da adição do óleo de linhaça; 2= adição de vitamina E; 3= efeito da interação entre o óleo e a vitamina E; EPM= erro padrão da média; PL= produção de leite; ¹= Produção de leite corrigida para 35 g/kg de gordura= $(0,432 + 0,1625 \times \text{g/kg gordura}) \times \text{produção de leite (kg/dia)}$ (Sklan et al., 1992), ESD= extrato seco desengordurado; NUL= nitrogênio ureico no leite; CAT= capacidade antioxidante total; TBARS= substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; DC= hidroperóxidos dienos conjugado. Nível de significância de $P \leq 0,05$ e tendência de $P \leq 0,10$.

Ao adicionar vitamina E nas dietas, foi observado aumento ($P=0,01$) do poder redutor do leite (Tabela 5). Houve tendências nas interações do óleo de linhaça e vitamina E para o aumento do poder redutor ($P=0,07$) e CAT ($P=0,07$). A adição de óleo de linhaça na dieta aumentou ($P<0,01$) a produção de DC e TBARS no leite. Contudo, a vitamina E melhorou a estabilidade oxidativa, pois a concentração de TBARS no leite foi menor ($P=0,02$) com sua adição.

Não houve interação entre o óleo de linhaça e vitamina E sobre a composição de ácidos graxos da gordura do leite (Tabela 6).

Tabela 6. Composição de ácidos graxos da gordura do leite (mg/g de lipídios totais) de búfalas em lactação com adição de óleo de linhaça e vitamina E na dieta

Ácido graxo	Sem Óleo		Com Óleo		EPM	P		
	Sem Vit E	Com Vit E	Sem Vit E	Com Vit E		1	2	3
8:0	8,73	5,96	4,49	3,31	0,63	<0,01	0,03	0,28
10:0	17,95	14,67	9,38	13,75	1,32	0,17	0,87	0,26
11:0	0,64	0,83	0,50	0,51	0,06	0,08	0,37	0,41
12:0	22,33	21,72	13,60	17,03	1,27	0,03	0,56	0,41
13:0	0,85	0,64	0,62	0,69	0,07	0,52	0,65	0,35
14:0	98,88	96,50	75,04	70,80	4,41	0,02	0,67	0,90
14:1n-9	7,98	9,56	4,22	6,52	0,69	<0,01	0,04	0,64
14:1n-7	4,20	4,92	3,49	4,26	0,26	0,11	0,09	0,95
15:0	8,02	9,22	5,00	6,43	0,52	<0,01	0,04	0,82
15:1n-7	3,49	3,30	2,85	3,20	0,21	0,25	0,80	0,39
16:0	251,66	259,97	194,45	198,03	9,07	<0,01	0,66	0,86
16:1n-11	0,48	0,50	0,58	0,76	0,05	0,09	0,29	0,40
16:1n-9	1,52	1,73	1,40	1,76	0,06	0,67	0,03	0,53
16:1n-7	14,53	20,39	8,83	10,65	1,34	<0,01	0,02	0,17
16:1n-5	2,41	3,07	2,26	2,60	0,17	0,34	0,15	0,61
17:0	4,42	5,44	3,62	4,54	0,23	0,03	0,02	0,87
17:1n-9	1,41	1,78	1,98	1,21	0,19	0,99	0,56	0,14
18:0	87,82	88,54	118,37	125,02	5,88	0,02	0,74	0,79
18:1n-11t	5,14	5,87	11,09	11,14	1,25	0,04	0,87	0,88
18:1n-9c	161,96	195,27	180,72	185,37	7,31	0,75	0,21	0,33
18:1n-7	3,09	4,53	3,61	2,66	0,41	0,42	0,77	0,18
18:2n-6t	1,52	1,57	3,53	4,75	0,50	<0,01	0,16	0,19
18:2n-6c	15,91	20,10	13,41	14,84	8,49	<0,01	0,02	0,17
18:3n-3	3,83	2,81	7,68	12,24	1,45	0,01	0,40	0,20
18:2 c9 t11 – CLA	3,33	3,40	4,12	5,12	0,34	0,06	0,37	0,43
18:2 t10 c12- CLA	2,00	1,52	1,40	1,77	0,11	0,42	0,78	0,08
20:1n-9	1,32	0,88	0,93	0,97	0,13	0,38	0,24	0,17
20:3n-6	0,79	0,67	0,40	0,41	0,08	0,10	0,75	0,70
20:4n-6	0,93	1,57	1,58	0,79	0,19	0,86	0,85	0,11
20:5n-3	0,24	0,47	0,21	0,39	0,07	0,66	0,14	0,83
21:0	0,13	0,44	0,11	0,29	0,05	0,36	0,02	0,44
22:0	0,75	0,68	0,74	0,82	0,10	0,79	0,97	0,76
22:4n-6	0,71	1,16	0,85	1,42	0,18	0,44	0,08	0,81
22:5n-6	0,23	0,38	0,46	0,22	0,06	0,77	0,70	0,12
22:6n-3	0,16	0,39	0,69	1,14	0,16	0,05	0,40	0,69
24:0	0,46	0,49	0,86	0,40	0,11	0,43	0,29	0,23
24:1n-9	0,60	0,84	1,12	0,69	0,09	0,33	0,60	0,09

Efeitos testados: 1= efeito da adição do óleo de linhaça; 2= adição de vitamina E; 3= efeito da interação entre o óleo e a vitamina E; EPM= erro padrão da média. Nível de significância de $P \leq 0,05$ e tendência de $P \leq 0,10$.

Nas dietas com adição do óleo de linhaça, a concentração dos ácidos graxos de cadeia longa C16:0, C16:1n-7, C17:0 e C18:2n-6 *cis* foi reduzida ($P<0,05$) na gordura do leite, enquanto houve aumento ($P<0,05$) das concentrações dos AG C18:0, C18:1 *trans*11, C18:3n-3, C18:2n-6 *trans* e C22:6 n-3.

A suplementação lipídica reduziu ($P<0,05$) as concentrações de AG de cadeia curta e média C8:0, C12:0, C14:0, C14:1n-9 e C15:0. Desta forma, a adição de óleo reduziu a soma dos AG de cadeia curta ($P=0,04$) (Tabela 7) e média ($P<0,01$), apresentou tendência de aumento à soma dos AG de cadeia longa ($P=0,06$), reduziu a razão n6/n3 ($P=0,01$) de 9,3 para 2,44 e aumentou a soma dos AGPI ($P=0,03$) e dos AG n-3 ($P=0,01$).

Tabela 7. Concentração de CLA total, ácidos graxos de cadeia curta, média e longa, n-6, n-3 (mg/g de lipídios totais), razão n-6/n-3, índices de aterogenicidade (IA), trombogenicidade (IT) e atividade da enzima $\Delta 9$ -dessaturase de búfalas em lactação com adição de óleo de linhaça e vitamina E na dieta

Item	Sem Óleo		Com Óleo		EPM	P		
	Sem Vit E	Com Vit E	Sem Vit E	Com Vit E		1	2	3
CLA Total	5,33	4,91	5,52	6,90	0,51	0,16	0,33	0,91
AG Cadeia Curta	50,48	43,82	28,59	35,29	3,03	0,04	0,99	0,30
AG Cadeia Média	398,98	416,37	303,70	310,74	15,17	<0,01	0,57	0,81
AG Cadeia Longa	290,89	338,61	351,85	370,43	12,07	0,06	0,23	0,64
AGS	502,59	505,09	426,78	441,62	14,77	0,08	0,80	0,86
AGMI	208,13	252,63	223,06	231,76	8,95	0,85	0,13	0,29
AGPI	29,62	34,00	34,31	43,08	1,70	0,03	0,04	0,43
n-6	20,07	25,44	20,22	22,43	1,14	0,20	<0,01	0,16
n-3	4,22	3,66	8,57	13,76	1,62	0,01	0,30	0,21
n-6/n-3	9,65	8,94	2,64	2,24	1,51	0,01	0,74	0,93
AL:AAL	11,91	12,51	5,35	3,33	1,79	0,01	0,72	0,59
IA	2,90	2,43	2,03	1,86	0,13	<0,01	0,06	0,31
IT	3,50	3,04	2,66	2,34	0,16	<0,01	0,02	0,57
Atividade da enzima $\Delta 9$ -dessaturase								
cis 9-14:1/14:0	0,063	0,076	0,042	0,066	0,005	0,01	<0,01	0,06
cis 9-16:1/16:0	0,006	0,007	0,007	0,009	0,0004	0,03	0,12	0,48
cis 9-18:1/18:0	1,87	2,18	1,58	1,52	0,10	0,01	0,34	0,17

Efeitos testados: 1= efeito da adição do óleo de linhaça; 2= adição de vitamina E; 3= efeito da interação entre o óleo e a vitamina E; EPM= erro padrão da média; CLA= ácido linoleico conjugado; AG= ácidos graxos; AGS= ácidos graxos saturados; AGMI= ácidos graxos monoinsaturados; AGPI= ácidos graxos poli-insaturados; LA= ácido linoleico; ALA= ácido alfa-linolênico. Nível de significância de $P\leq 0,05$ e tendência de $P\leq 0,10$.

A adição de vitamina E reduziu a concentração do AG C8:0 ($P=0,03$) (Tabela 6), e aumentou dos AG C14:1n-9 ($P=0,04$), C15:0 ($P=0,04$), C16:1n-9 ($P=0,03$),

C16:1n-7 (P=0,02), C17:0 (P=0,02), C18:2n-6c (P=0,02), C21:0 (P=0,02) na gordura do leite, assim como, aumentou concentração da soma dos AG n-6 (P<0,01) e dos AGPI (P=0,04) (Tabela 7).

A concentração de CLA total não teve efeito (P>0,05) das dietas, entretanto o isômero C18:2 *cis9-trans11* apresentou tendência de aumento (P=0,06) com a suplementação lipídica. A suplementação com óleo de linhaça aumentou (P=0,01) a razão AL:AAL (ácido linoleico:ácido alfa-linolênico) em 64,4%.

Os índices de aterogenicidade e trombogenicidade foram reduzidos (P<0,01) nas dietas com adição de óleo de linhaça (Tabela 7), assim como pela adição de vitamina E (P=0,01 e P=0,06, respectivamente). A adição de óleo reduziu a atividade da enzima $\Delta 9$ -dessaturase sobre o AG C16:0 (P=0,03), contudo, aumentou sobre os AG C14:0 (P=0,01) e C18:0 (P=0,01). A vitamina E aumentou (P<0,01) a atividade da $\Delta 9$ -dessaturase sobre o AG C14:0.

3. Discussão

A adição do óleo de linhaça elevou a concentração de extrato etéreo em 92 % na MS da dieta e consequentemente elevou o NDT das dietas. Para formular dietas isoenergéticas, o tratamento sem óleo demandou maior proporção de milho moído, fonte de carboidratos não fibrosos, desta forma, aumentou a ingestão diária de carboidratos não fibrosos (Tabela 2).

Apesar da concentração de EE das dietas não exceder o limite máximo para ruminantes, a suplementação lipídica promoveu redução da digestibilidade da fração fibrosa, que acarretou na queda da digestibilidade da MS e MO (Tabela 3). Essa redução é justificada pela toxicidade dos ácidos graxos poli-insaturados aos microorganismos ruminais, que afeta principalmente os que degradam a parede celular, pois esses AG são capazes de romper as estruturas da membrana celular (Palmquist e Mattos, 2011). É provável, que a maior população de bactérias celulolíticas (Paul e Lal, 2010) e protozoários no rúmen do búfalo que atuam sobre a fibra (Franzolin e Franzolin, 2000) em relação aos bovinos, e pelo fato do óleo utilizado estar na forma líquida, pode ter ocorrido intensificação da redução da digestibilidade da fibra para esta espécie.

Por outro lado, o aumento da digestibilidade da FDN pela adição de vitamina E na dieta (Tabela 3) pode ser explicado pelas observações de alguns autores. Naziroğlu et

al. (2002) ao avaliarem, a adição de vitamina E na fermentação ruminal *in vitro*, observaram aumento da produção de acetato e do número de protozoários. O acetato é oriundo da degradação da fibra, seu aumento indica possível melhora da digestibilidade da fração fibrosa no rúmen. Também Hino et al. (1993) observaram estímulo na digestão da celulose em dietas com adição de vitamina E, devido a um aumento da população de bactérias celulolíticas.

A adição de óleo de linhaça aumentou a digestibilidade do EE, pois este óleo é rico em ácidos graxos poli-insaturados, que apresentam elevada taxa de absorção intestinal, devido à facilidade na formação de micelas e movimentos mais eficientes através das microvilosidades do intestino (NRC, 2001).

A tendência de aumento da CAT no sangue é visto como favorável (Tabela 4), pois o organismo promove uma ação mais eficiente contra os radicais livres presentes na corrente sanguínea. A adição do óleo aumenta a concentração de AGPI no sangue, tornando-o mais susceptível à lipoperoxidação. Contudo, verificou-se através dos componentes da análise de DC, que a densidade ótica do acúmulo máximo de dieno, tempo para atingir a máxima taxa de oxidação e velocidade máxima de produção de dieno não foram influenciados ($P>0,05$) pela suplementação lipídica, sendo este um aspecto positivo.

Scislowski et al. (2005) observaram que a suplementação com óleo de linhaça acarretou em um aumento indesejado sobre a lipoperoxidação, responsável por favorecer alterações na estrutura das células atingidas. As alterações desencadeiam morte celular, que pode influenciar negativamente no desempenho do animal, assim como aumenta a ocorrência de problemas metabólicos devido a estresse oxidativo (Sordillo e Aitken, 2009).

O aumento da produção de leite em dietas com suplementação lipídica (Tabela 5), provavelmente foi oriundo do maior aporte de energia disponível para o animal desempenhar suas funções produtivas (Ashes et al., 1997; Schingoethe e Casper, 1991). A redução na concentração de gordura do leite dos animais suplementados com óleo de linhaça pode ser justificada por três fatores, ao aumento da produção de leite, que promove efeito de diluição na concentração da gordura. Aliado a este efeito, a redução na digestibilidade da FDN observada, pode ter diminuído a produção de acetato (Palmquist, 2006) ou ainda ao fornecimento dietético de ácidos graxos de cadeia longa proveniente do óleo de linhaça influenciando na síntese *de novo*.

Devido à redução de gordura no leite, os animais que receberam óleo apresentaram o leite com maior densidade, pois como os demais sólidos não foram influenciados, à medida que se reduziu a gordura, ocorreu aumento da densidade. O teor de sólidos totais é muito importante para o rendimento de derivados lácteos, haja vista que o leite de búfala é utilizado principalmente para produção de mozzarella, portanto a redução observada no experimento é um ponto negativo da adição de AGPI na dieta para a indústria.

O aumento do poder redutor do leite, ocasionado pela adição de vitamina E nas dietas, indica a capacidade da amostra em combater os radicais livres e inibir a peroxidação lipídica (Zhu et al., 2002). Esse aumento confirma que os antioxidantes fornecidos na dieta são transferidos para o leite, melhorando sua estabilidade oxidativa. As interações entre o óleo e vitamina E para o poder redutor e CAT (Tabela 5), provavelmente ocorreram devido à vitamina E ser lipossolúvel e apresentar melhor absorção intestinal ao adicionar o óleo (Zeoula e Geron, 2011).

O aumento do DC e TBARS (Tabela 5) no leite das búfalas alimentadas com dietas com suplementação lipídica são ocasionados pelo aumento da concentração de AGPI, que sofrem lipoperoxidação mais facilmente quando comparado aos AGS (Lindmark-Mansson e Akesson, 2000). Esse efeito se deve às duplas ligações, que favorecem a perda de elétrons (Araujo, 2011). Todavia, a redução do TBARS no leite pela adição de vitamina E, confirma que a capacidade antioxidante do leite foi eficiente em reduzir a lipoperoxidação.

O aumento da concentração dos AG C18:0 e C18:1 *trans*11 na gordura do leite (Tabela 6), se deve ao fato de que ao fornecer o C18:3 n-3, este pode sofrer biohidrogenação completa ou incompleta no rúmen, como proteção das bactérias, conseqüentemente, aumentando suas concentrações no leite. O aumento do AG C18:2 *cis*9-*trans*11 é resultado da ação da enzima Δ 9-dessaturase na glândula mamária (Palmquist, 2006), que forma este isômero do CLA a partir do AG C18:1 *trans*11. O AG C18:2 *cis*9-*trans*11 impacta negativamente na expressão dos genes envolvidos na síntese *de novo* do leite (Baumgard et al., 2000; 2002). Portanto, em dietas com adição de óleo de linhaça, houve redução nas concentrações de AG de cadeia curta e média (P=0,04 e P<0,01, respectivamente) (Tabela 7). O óleo de linhaça fornece quantidade de C18:3 n-3 (principal AG da família n-3) superior ao que as bactérias ruminais são capazes de biohidrogenar e parte da gordura da dieta torna-se sobrepassante, promovendo aumento da concentração do C18:3 n-3 na gordura do leite.

O isômero do CLA C18:2 *cis9-trans11* exerce papel de grande importância na saúde humana, devido às suas propriedades antimutagênica, anticarcinogênica, capacidade de reduzir a obesidade e diabetes, prevenção de aterosclerose, melhora do sistema imunológico e anti-hipertensivo (Koba e Yanagita, 2013). Portanto, aumentar sua concentração na gordura do leite, destinado à produção de derivados lácteos, através da suplementação lipídica é benéfico.

Vale destacar o aumento do AG C22:6 n-3 (ácido docosapentaenóico, DHA) observado na gordura do leite de búfalas (Tabela 6), pela adição de óleo de linhaça na dieta, pois apresenta inúmeros benefícios ao consumidor dos produtos oriundos do leite enriquecido. Este ácido graxo está relacionado à melhora da função autonômica, reduz incidências de doenças cardiovasculares, por prevenir agregação plaquetária, controle da pressão arterial e estabilizar a formação de placas de ateromas e triglicérides (Santos et al., 2013).

Como observado em outros trabalhos utilizando vacas (Santos et al., 2016) e búfalas (Santillo et al., 2016) suplementadas na dieta com óleo de linhaça, houve aumento na concentração de AGPI (Tabela 7) e, em especial, na concentração de n-3 do leite, pois grande parte destes ácidos graxos presentes no leite são originários da dieta (Palmquist et al., 1993). Além da redução dos AGS do leite originários da menor síntese *de novo*, o aumento dos AGPI também reduziu a concentração dos AGS, neste caso, por efeito de diluição por grama de lipídios totais. Os AGS estão associados a problemas cardiovasculares e o consumo de AGPI com a redução destes problemas. Observa-se na Tabela 7, o aumento de aproximadamente 183% na concentração de n-3 no leite ao comparar os tratamentos com adição de óleo e os sem adição.

Mais importante do que a quantidade de n-3 consumido na dieta, é a razão n-6/n-3. Quando essa razão fica muito alta ocorrem reações de inflamação no organismo, pois o n-6 compete pelas enzimas responsáveis pela dessaturação e alongação com o n-3 (Martin et al., 2006). Como consequência, promove redução da síntese dos ácidos DHA e eicosapentanoicos (EPA), precursores de compostos importantes para o sistema reprodutivo, circulatório, nervoso e de defesa do indivíduo (Palmquist e Mattos, 2011), além de aumentar a concentração do ácido araquidônico, substrato para produção de substâncias pró-inflamatórias, vasoconstritoras e pró-agregantes (Santos et al., 2013). Nas dietas com adição de óleo, a razão n6/n3 reduziu em aproximadamente 74%. O aumento das concentrações de n-3 é interessante, pois torna o leite mais saudável ao

consumidor, e a razão observada se aproximou (2,4:1) do ideal recomendado pela World Health Organization (2003), que varia entre 2,5:1 e 4:1.

Os índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT) foram reduzidos tanto pela suplementação lipídica, quanto pela adição de vitamina E. O óleo reduziu os índices, pois diminuiu a concentração dos principais AG envolvidos na ocorrência de trombose e ateromas (Ulbricht e Southgate, 1991), além de aumentar a concentração de n-3, responsáveis pela prevenção das mesmas. A vitamina E, por sua vez, não alterou a concentração dos AGS que promovem a trombose e ateromas, mas em contra partida aumentou a concentração dos AGPI e n-6, impactando na redução dos IA e IT.

De modo geral, em dietas com adição de óleo, a atividade da enzima $\Delta 9$ -dessaturase foi reduzida, pois apesar do C16:0 ter sua dessaturação aumentada, os valores são muito baixos quando comparados com o efeito de redução da dessaturação sobre o C14:0 e C18:0. A explicação sobre a atividade da $\Delta 9$ -dessaturase é que dietas ricas em AGPI afetam negativamente a expressão do gene responsável pelo seu funcionamento (Ntambi, 1999). A vitamina E aumentou a atividade da enzima $\Delta 9$ -dessaturase, provavelmente devido à sua atuação como cofator das enzimas responsáveis pela dessaturação dos ácidos graxos (Zingg e Azzi, 2004). O aumento da atividade da enzima $\Delta 9$ -dessaturase promove aumento da concentração de AGI e reduz AGS no leite, agregando melhorias ao perfil lipídico.

Santos et al. (2016), ao suplementar vacas holandesas com concentração semelhantes de óleo de linhaça e vitamina E do presente trabalho, também observaram no leite um aumento da concentração de AGPI, do AG C18:2 *cis*-9, *trans*-11, n-3, e reduções dos AGS, dos índices IA e IT e das razões n-6/n-3 e LA:ALA, assim como redução da concentração de gordura total e aumento da produção de hidroperóxidos dieno conjugado.

4. Conclusão

A utilização do óleo de linhaça melhorou o perfil de ácidos graxos do leite, entretanto reduziu a estabilidade oxidativa do leite e a digestibilidade da fibra, enquanto a vitamina E aumentou a capacidade antioxidante do sangue e do leite e aumentou a digestibilidade da fibra em detergente neutro. Portanto, por meio da adição de óleo de linhaça e vitamina E na dieta de búfalas lactantes é possível obter um produto final de melhor qualidade sem trazer prejuízos para o animal e conservação do produto final.

5. Referências

- AOAC International. 1990. Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC International, Arlington, VA, USA.
- Araujo, J. 2011. Química de alimentos: teoria e prática. 5 ed. Editora UFV. Viçosa, BR.
- Ashes, J.R., Gulati, S.K., Scott, T.W. 1997. Potential to alter the content and composition of milk fat through nutrition. *J. Dairy Sci.* 80, 2204–2212.
- Baumgard, L.H., Matitashvili, E., Corl, B.A., Dwyer, D.A., Bauman, D.E. 2002. *Trans*-10, *cis*-12 CLA decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85, 2155–2163.
- Baumgard, L.H., Corl, B.A., Dwyer, D.A., Saebo, A., Bauman, D.E. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 278, 179–184.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* 37, 911-917.
- Brzezinska-Slebodzinska, E., Miller, J.K., Quigley, J.D., Moore, J.R., Madsen, F.C. 1994. Antioxidant status of dairy cows supplemented prepartum with vitamin E and selenium. *J. Dairy Sci.* 77, 3087-3095.
- Detmann, E., Souza, M.A., Valadares Filho, S.C., Queiroz, A.C., Berchielli, T.T., Saliba, E.O.S., Cabral, L.S., Pina, D.S., Ladeira, M.M.E., Azevedo, J.A. 2012. Métodos para análise de alimentos - Inct Ciência Animal. Editora UFV, Viçosa, BR.
- El-Salam, M.H.A., El-Shibiny, S. 2011. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. *Dairy Sci. & Technol.* 91, 663-699.
- Erel, O. 2004. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 37, 277-285.
- Folch, J., Less, M., Sloane, S.G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Franzolin, R., Franzolin, M.H.T. 2000. População protozoários ciliados e degradabilidade ruminal em búfalos e bovinos zebuínos sob dieta à base de cana-de-açúcar. *R. Bras. Zootec.* 29, 1853-1861.
- Friedewald, W.T., Levy, R.I., Fredrickson, D.S. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical Chemistry.* 18, 499-502.
- Gladine, C., Morand, C., Rock, E., Bauchart, D., Durand, D. 2007. Plant extracts rich in polyphenols (PERP) are efficient antioxidants to prevent lipoperoxidation in plasma lipids from animals fed n-3 PUFA supplemented diets. *Anim. Feed Sci. Technol.* 136, 281-296.
- Gobert, M., Martin, B., Ferlay, A., Chilliard, Y., Graulet, B., Pradel, P., Bauchart, D., Durand, D. 2009. Plant polyphenols associated with vitamin E can reduce plasma lipoperoxidation in dairy cows given n-3 polyunsaturated fatty acids. *J. Dairy Sci.* 92, 6095–6104.
- Hartman, L., Lago, R.C. 1973. A Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab. Pract.* 22, 475-476.
- Hino, T., Andoh, N., Ohgi, H. 1993. Effects of β -carotene and α -tocopherol on rumen bacteria in the utilization of long-chain fatty acids and cellulose. *J. Dairy Sci.* 76, 600-605.
- Hogan, J.S., Weiss, W.P., Todhunter, D.A., Smith, K.L., Schoenberger, P.S. 1992. Bovine neutrophil responses to parenteral vitamin E. *J. Dairy Sci.* 75, 399-405.

- Joseph, J.D., Ackman, R.G. 1992. Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. *J AOAC Int.* 75, 488-506.
- Kiokias, S.N., Dimakou, C. P., Tsaprouni, I. V., Oreopoulou, V. 2006. Effect of compositional factors against the thermal oxidative deterioration of novel food emulsions. *Food Biophys.* 3, 155-123.
- Koba, K., Yanagita, T. 2014. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). *Obes. Res. Clin. Pract.* 8, e525-e532.
- Lindmark-Mansson, H., Akesson, B. 2000. Antioxidative factors in milk. *Brit. J. Nutr.* 84, 103-110.
- Maia, E.L., Rodriguez-Amaya, D.B. 1993. Evaluation of a simple and economical method for methylation of fatty acids from lipids of several species of fish. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 53, 27-35.
- Martin, C.A., Oliveira, C.C., Visenteiner, J.V., Matsushita, M., De Souza, N.E. 2008. Optimization of the selectivity of a cyanopropyl stationary phase for gas chromatographic analysis of *trans* fatty acids. *J. Chromatogr. A.* 1194, 111-117.
- Martin, C.A., Almeida, V.V., Ruiz, M.R., Visentainer, J.E.L., Matshushita, M., Souza, N.E., Visentainer, J.V. 2006. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev. Nutr.* 19, 761-770.
- Naziroğlu, M., Güler, T., Yüce, A. 2002. Effect of vitamin E on ruminal fermentation *in vitro*. *J. Vet. Med. A.* 49, 251-255.
- National Research Council (NRC). 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Ntambi, J.M. 1999. Review: Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol. *J. Lipid Res.* 40, 1549-1558.
- Palmquist, D.L. 1991. Influence of source and amount of dietary fat on digestibility in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 74, 1354-1360.
- Palmquist, D.L., Beaulieu, A.D., Barbano, D.M. 1993. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76, 1753-1771.
- Palmquist, D.L. 2006. Milk fat: origin of fatty acids and influence of nutritional factors thereon, p.43-92 in: *Advanced Dairy Chemistry, V.2. Lipids*, 3 ed. Edited by P.F. Fox and P.L.H. McSweeney, Springer, New York.
- Palmquist, D.L., Mattos, W.R.S. 2011. Metabolismo de lipídios, p.299-322 in: *Nutrição de Ruminantes. V.1, 2ed.* Berchielli, T.T., Pires, A.V., Oliveira, S.G. Editora FUNEP. Jaboticabal, BR.
- Paul, S.S., Lal, D. 2010. *Nutrient Requirements of Buffaloes*. In: Azadpur, Delhi, Índia: Satish Serial Publishing House. 138p.
- Pinchuk, I., Lichtenberg, D. 2002. The mechanism of action of antioxidants against lipoprotein peroxidation, evaluation based on kinetic experiments. *Prog. Lipid Res.* 41, 279-314.
- Politis, I., Hidiroglou, N., Cheli, F., Baldi, A. 2001. Effects of vitamin E on urokinase-plasminogen activator receptor expression by bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 62, 1934-1938.
- Pottier, J., Focant, M., Debier, C., De Buysser, G., Goffe, C., Mignolet, E., Froidmont, E., Larondelle, Y. 2006. Effect of dietary vitamin E on rumen biohydrogenation pathways and milk fat depression in dairy cows fed high-fat diets. *J. Dairy Sci.* 89, 685-692.
- Rufino, M.S.M., Alves, R.E., Brito, E.S., Morais, S.M., Sampaio, C.G., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F.D. 2007. *Metodologia científica: Determinação da atividade*

- antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{•+}. Comunicado Técnico Embrapa 128. Junho, Fortaleza, CE.
- Santillo, A., Caroprese, M., Marino, R., Seviand, A., Albenzio, M. 2016. Quality of buffalo milk as affected by dietary protein level and flaxseed supplementation. *J. Dairy Sci.* 99, 7725-7732.
- Santos, R.D., Gagliardi, A.C.M., Xavier, H.T., Magnoni, C.D., Cassani, R., Lottenberg A.M. 2013. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. *Arq. Bras. Cardiol.* 100, 1-40.
- Santos, N.W., Santos, G.T., Silva-Kazama, D.C., Grande, P.A., Pintro, P.M., De Marchi, F.E., Jobim, C.C., Petit, H. V. 2014. Production, composition and antioxidants in milk of dairy cows fed diets containing soybean oil and grape residue silage. *Livest. Sci.* 159, 37-45.
- Santos, N.W., Yoshimura, E.H., Machado, E., Matumoto-Pintro, P.T., Montanher, P.F., Visentainer, J.V., Santos, G.T., Zeoula, L.M. 2016. Antioxidant effects of a propolis extract and vitamin E in blood and milk of dairy cows fed diet containing flaxseed oil. *Livest. Sci.* 191, 132-138.
- Schennink, A., Heck, J.M., Bovenhuis, H., Visker, M.H.P., Van Valenberg, H.J.F., Van Arendonk, J.A.M. 2008. Milk fatty acid unsaturation: Genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*) and acyl CoA:diacylglycerolacyltransferase 1 (*DGAT1*). *J. Dairy Sci.* 91, 2135–2143.
- Schingoethe, D.J.; Casper, D.P. 1991. Total lactational response to added fat during early lactation. *J. Dairy Sci.* 74, 2617-2622.
- Scislowski, V., Bauchart, D., Gruffat, D., Laplaud, P.M., Durand, D. 2005. Effects of dietary *n*-6 or *n*-3 polyunsaturated fatty acids protected or not against ruminal hydrogenation on plasma lipids and their susceptibility to peroxidation in fattening steers. *J. Anim. Sci.* 83, 2162–2174.
- Sniffen, C.J., O'Connor, J.D., Van Soest, P.J., Fox, D.G., Russell, J.B. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets II. Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* 70, 3562-3577.
- Sordillo, L.M., Aitken, S.L. 2009. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 104-109.
- Ulbricht, T.L.V., Southgate, D.A.T. 1991. Coronary heart disease: Seven dietary factors. *Lancet.* 338, 985–992.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarchpolysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Anim. Sci.* 74, 3583-3597.
- Vanzant, E.S., Cochran, R.C., Titgemeyer, E.C. 1998. Standardization of *in situ* techniques for ruminant feedstuff evaluation. *J. Anim. Sci.* 76, 2717-2729.
- Verruma M.R., Salgado, J.M. 1994. Análise química do leite de búfala em comparação ao leite de vaca. *Sci. Agric.* 51, 131-137.
- Visentainer, J.V. 2012. Analytical aspects of the flame ionization detector response of fatty acid esters in biodiesels and foods. *Quím. Nova* 35, 274-279.
- Vyncke, W. 1970. Direct determination of the thiobarbituric acid value in trichloroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. *Fette. Seifen. Anstrichm.* 72, 1084-1087.
- Weiss, W.P., Hogan, J.S., Smith, K.L., Hoblet, K.H. 1990. Relationships among selenium, vitamin e, and mammary gland health in commercial dairy herds. *J. Dairy Sci.* 73, 381-390.

- Weiss, W. 1999. Energy prediction equations for ruminant feeds. In: Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers. Proc, Ithaca: Cornell University. 61, 176-185.
- World Health Organization (Who). 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of joint WHO/FAO expert consultation. WHO Technical Report Series 916. Geneva, Suíça.
- Zeoula, L.M., Geron, L.J.V. 2011. Vitaminas, p.385-386 in: Nutrição de Ruminantes. V.1, 2ed. Berchielli, T.T., Pires, A.V., Oliveira, S.G. Editora FUNEP. Jaboticabal, BR.
- Zhu, Q.Y., Hackman, R.M., Ensunsa, J.L., Holt, R.R., Keen, C.L. 2002. Antioxidative activities of oolong tea. J. Agric. Food Chem. 50, 6929-6934.
- Zingg, J. M., Azzi, A. 2004. Non-antioxidant activities of vitamin E. Curr. Med. Chem. 11, 1113-1133.