

ISÔMEROS *TRANS*-C_{18:1} E CLA NA GORDURA DO LEITE INFLUENCIADOS POR ÓLEO DE SOJA E MONENSINA NA DIETA DE VACAS LACTANTES¹

AUTORES

EDUARDO DA COSTA EIFERT¹, ROGÉRIO DE PAULA LANA^{2*}, MARIA IGNEZ LEÃO², PEDRO BRAGA ARCURI³, DANTE PAZZANESE LANNA⁴, SEBASTIÃO DE CAMPOS VALADARES FILHO², WEBEL MACHADO LEOPOLDINO⁵;

¹ parte da Tese de Doutorado do primeiro autor, eifertec@yahoo.com.br, financiado pelo CNPq

² DZO-UFV, * rлана@mail.ufv.br

³ EMBRAPA Gado de Leite

⁴ LCNA ESALQ-USP

⁵ Doutorando em Nutrição de Ruminantes- UFV

RESUMO

Para determinar os efeitos sobre a concentração dos isômeros *trans*-C_{18:1} e o conteúdo de CLA no leite em resposta às alterações na fermentação ruminal, vacas leiteiras foram alimentadas com a combinação de óleo de soja e monensina na dieta. Foram utilizadas quatro vacas 7/8 Holandês-Gir, com 45 dias em lactação, dispostas em um quadrado latino 4x4. Os tratamentos consistiram de uma dieta controle (CT); 33 ppm de monensina (MN); 4% de óleo de soja (OL); e a combinação de óleo e monensina (OM). Os animais foram alimentados duas vezes ao dia, com 53% de volumoso e 47% de concentrado. Os isômeros *cis*-C_{18:1} foram aumentados pelo óleo de soja, mas somente isômeros específicos foram afetados pela monensina. Todos os isômeros *trans*-C_{18:1} foram aumentados pelo óleo de soja ou pela monensina (43,7 e 42,8%), com exceção de *trans*-11 C_{18:1}, que não foi influenciado pelos tratamentos. Foi observada interação entre óleo e monensina para *trans*-6-8 C_{18:1} e *trans*-10 C_{18:1}, onde as concentrações destes ácidos graxos foram aumentadas tanto pela monensina como pelo óleo, mas a combinação destes indicaram efeitos aditivos. O óleo de soja e a monensina apresentaram redução no teor de gordura do leite, correspondendo a um expressivo aumento na concentração de *trans*-10 C_{18:1} no leite ($r=-0,7239$; $P=0,0015$). Ainda que tenha apresentado diferenças numéricas (0,54 vs 0,80 g/100 g, CT vs MN, OL, OM), o CLA *cis*-9 *trans*-11 não foi influenciado pelos tratamentos e a atividade da enzima Δ^9 -desaturase foi reduzida pelas dietas contendo óleo de soja, indicando diferentes atividades ou rotas de bio-hidrogenação, e outros isômeros do CLA podem estar envolvidos.

PALAVRAS-CHAVE

Ácidos graxos, bio-hidrogenação, composição do leite, ionóforo, lipídios

TITLE

TRANS-C_{18:1} ISOMERS AND CLA IN MILK FAT INFLUENCED BY SOYBEAN OIL AND MONENSIN IN DIET OF LACTATING DAIRY COWS

ABSTRACT

To determine effects on *trans*-C_{18:1} isomers and CLA content on milk fat in response to altered rumen fermentation, cows were fed with a combination of monensin and soybean oil (SBO) diets. Four 7/8 Holstein-Gir cows, 45 DIM were used in a 4x4 Latin Square design. The treatments consisted of control diet (CT), 33 ppm of monensin (MN); 4% soybean oil (OL) and soybean oil x monensin combination (OM). The animals were fed twice a day, with 53% of corn silage and 47% of concentrate. *Cis*-C_{18:1} isomers was increased by SBO, but only specific isomers were increase by monensin, and *cis*-9 C_{18:1} was the main *cis*- C_{18:1}. All *trans*-C_{18:1} isomers were increased by SBO or monensin (43.7 and 42.8%), except *trans*-11 C_{18:1}, which was not influenced by the treatments. Interaction was observed for *trans*-6-8 C_{18:1} and *trans*-10 C_{18:1}, where the concentrations of these FA were increased by SBO and by monensin, but the combination of these indicated additive effect. SBO and monensin showed milk fat depression, corresponding with a marked increase in milk *trans*10-C_{18:1} ($r=-0.7239$; $P=0.0015$). Although numeric differences (0,54 vs 0,80 g/100 g, CT vs MN, OL, OM), *cis*-9 *trans*-11 CLA was not influenced by treatments and Δ^9 -desaturase activity was reduced by SBO

diets, indicating different activities or pathways of bio-hydrogenation, and others CLA isomers can be involved.

KEYWORDS

biohydrogenation, fatty acids, ionophores, lipids, milk composition

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos a pesquisa tem dado grande atenção no sentido de aumentar as concentrações de CLA no leite devido às suas propriedades anticancerígenas e de partição da energia no metabolismo animal.

O CLA *cis-9 trans-11* C_{18:2} é um produto da bio-hidrogenação ruminal dos lipídios dietéticos e que também pode ser incorporado ao leite pela ação da enzima Δ^9 -desaturase sobre o *trans-11* C_{18:1} (Bauman et al., 2000). Os maiores aumentos no CLA são observados quando óleos vegetais são adicionados às dietas, e como resultado da intensa bio-hidrogenação, também são aumentadas as concentrações dos isômeros *trans*-C_{18:1}.

Em experimentos *in vitro*, Fellner et al. (1997) observaram que a adição de ácido linoléico em cultura contínua aumentou o teor de CLA no total de ácidos graxos, com concomitante acúmulo de isômeros *trans*-C_{18:1}. Os ionóforos monensina, nigericina e tetronasina triplicaram o efeito sobre a concentração de CLA. Recentemente, Jenkins et al. (2003) observaram *in vitro* que o óleo de soja em conjunto com a monensina aumentou a concentração de *trans-10* C_{18:1} mais que quando estes foram incubados isoladamente, o que pode acarretar em redução no teor de gordura do leite (Griinari e Bauman, 2001). Isto sugere que a população microbiana selecionada pela monensina resulta em alterações nas rotas e atividades da bio-hidrogenação dos ácidos graxos no rúmen. Porém, não há relatos na literatura que validem estes resultados com animais, objetivo deste trabalho.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Campo Experimental de Coronel Pacheco – EMBRAPA Gado de Leite, no período entre maio e junho de 2002. As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. As análises cromatográficas e o processo de transesterificação dos ácidos graxos do leite foram realizados no Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal da ESALQ-USP.

Foram utilizadas quatro vacas ? Holandês-Gir, múltiparas, com 47 dias em lactação, com peso médio de 528 kg, dotadas de cânulas ruminais. Os animais foram dispostos em um quadrado latino (4x4), em um arranjo fatorial 2x2: presença ou não de monensina sódica (33 ppm) e presença ou não de óleo de soja (4,0%). Os tratamentos estão assim denominados: a) dieta sem óleo e sem monensina: controle (CT); b) sem óleo, com monensina: monensina (MN); c) com óleo, sem monensina: óleo (OL); d) com óleo, com monensina: óleo+ monensina (OM). O manejo dos animais e da alimentação, assim como as referências citadas neste Material e Métodos foram descritos por Eifert (2004).

A produção leiteira foi medida diariamente durante o período de coletas e uma alíquota de 2% da produção de leite foi retirada e congelada para a posterior análise do perfil de ácidos graxos do leite. A extração da gordura foi baseada no método descrito por Nourooz-Zadeh & Appelqvist (1988), utilizando-se hexano e isopropanol em três extrações seqüenciais da amostra. A transesterificação dos ácidos graxos foi realizada conforme descrito por Christie (1982). O perfil de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa utilizando uma coluna capilar de 100 m de sílica fundida (SP-2560) e detector de ionização de chama (FID). A corrida teve uma duração de 70 minutos, utilizando-se nitrogênio como gás de arraste a um fluxo de 40 ml/minuto. Uma manteiga padrão (CRM 164; Commission of the European Communities, Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium) foi utilizada para determinar os fatores de recuperação para os ácidos graxos. A estimativa da atividade da enzima Δ^9 -desaturase foi realizada mediante a divisão do ácido graxo precursor pelo seu produto. Os ácidos graxos foram expressos em relação à sua concentração percentual na gordura do leite (g/100 g).

Os dados foram submetidos à análise de variância e os cálculos foram realizados através do comando Proc GLM do programa estatístico SAS (1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A monensina não influenciou a concentração de isômeros *cis*-C_{18:1} (Tabela 1), enquanto que a adição de óleo de soja aumentou a concentração destes isômeros em 46,9 %, possivelmente resultante do maior consumo de ácidos graxos insaturados da dieta e da atividade da Δ^9 -desaturase. Individualmente, *cis*-9 C_{18:1} foi o principal isômero *cis*-C_{18:1} e, enquanto a monensina aumentou a concentração de *cis*-12, *cis*-13 e *cis*-15 C_{18:1}, o óleo de soja elevou a concentração de todos os isômeros *cis*-C_{18:1}, exceto para *cis*-11 C_{18:1}.

Aumentos nas concentrações de AG *trans*-C_{18:1} indicam redução na velocidade de bio-hidrogenação. Com exceção de *trans*-11 C_{18:1}, tanto óleo como monensina aumentaram a concentração dos isômeros *trans*-C_{18:1} no leite (Tabela 1), e embora não se tenha observado interação significativa (P>0,05), CT, MN, OL e OM apresentaram diferentes valores, o que indica que a adição de monensina amplificou a concentração dos isômeros *trans*-C_{18:1} no leite, independente se a dieta continha ou não óleo de soja.

Os tratamentos não afetaram o *trans*-11 C_{18:1}, embora a sua concentração tenha sido aumentada numericamente em 71,2% (CT vs MN) e 235,6% (CT vs OL e OM). *Trans*-11 C_{18:1} foi o principal isômero *trans*-C_{18:1} e foi observada interação significativa (P<0,05) entre óleo e monensina para as concentrações de *trans*-10 C_{18:1} e *trans*-6-8 C_{18:1}. A Tabela 1 indica o mesmo comportamento de *trans*-10 C_{18:1} e *trans*-6-8 C_{18:1} em relação aos tratamentos, embora com diferentes magnitudes. Na ausência de óleo, a monensina não apresentou efeito sobre a concentração de *trans*-10 C_{18:1}; o óleo aumentou a participação deste AG, mas na presença do ionóforo, a concentração de *trans*-10 C_{18:1} foi ainda mais aumentada. Jenkins et al. (2003) também observaram interação entre óleo de soja e monensina sobre a concentração de *trans*-10 C_{18:1} em ensaio *in vitro*, onde o comportamento deste AG foi similar ao presente trabalho, muito embora tenham verificado maior magnitude na formação de *trans*-10 C_{18:1} quando a cevada foi comparada ao milho como fonte de carboidrato.

As bactérias responsáveis na formação do *trans*-11 C_{18:1} quando na rota clássica da bio-hidrogenação, são "Butyrivibrio fibrisolvens" e "Ruminococcus sp", que são sensíveis a monensina (Nagaraja et al., 1997), o que indica que a população selecionada pelo ionóforo pode levar à formação de outros isômeros *trans*-C_{18:1} e outros isômeros do CLA, justificando os resultados obtidos para os AG *trans*, principalmente *trans*-10 C_{18:1}. Além disto, cepas isoladas de "Clostridium" sp. formaram *trans*-10 C_{18:1} como principal intermediário da bio-hidrogenação do ácido linoléico. "Butyrivibrio fibrisolvens" e "Ruminococcus" necessitam de menor dose para controle de 50 % da população que "Clostridium" (Nagaraja et al., 1997), assim, possivelmente a população de "Clostridium" foi pouco afetada pela monensina, justificando os aumentos em *trans*-10 C_{18:1}.

Embora os tratamentos tenham permitido grandes diferenças nas concentrações de *trans*-10 C_{18:1}, não foi detectada a presença no leite de seu precursor, o CLA *trans*-10 *cis*-12 C_{18:2} (Tabela 2). Possivelmente, devido à forte bio-hidrogenação ruminal deste ácido graxo e à baixa eficiência de absorção deste CLA pela glândula mamária.

Tanto o óleo quanto a monensina foram eficientes ao elevar as concentrações do ácido linoléico (*cis*-9 *cis*-12 C_{18:2}) no leite, muito embora os valores observados sejam baixos principalmente em relação à quantidade de óleo fornecido nas dietas. As dietas contendo óleo proporcionaram aumentos nas concentrações de *trans*-11 *cis*-15, possivelmente por este ser um intermediário da bio-hidrogenação do ácido linolênico, justificando-se seus baixos valores. O CLA *cis*-9 *trans*-11 não foi influenciado pelos tratamentos, embora se tenha verificado aumentos em relação ao CT da ordem de 34,2, 29,9 e 33,3 %, respectivamente para MN, OL e OM.

Bauman et al. (2000) observam que a principal forma de incorporação do CLA é a partir do *trans*-11 C_{18:1} pela Δ^9 -desaturase e a falta de resposta em relação ao CLA pode ser decorrente da inibição desta enzima pelo *trans*-10 C_{18:1}, o que concorda com Bauman & Griinari (2001). Por outro lado, outros isômeros do CLA têm sido determinados, sendo que *trans*-7 *cis*-9 C_{18:2} é considerado com o segundo CLA em abundância (Chilliard et al., 2000), assim, é possível que outros isômeros do CLA sejam formados em um desvio da bio-hidrogenação ruminal e que os padrões utilizados na análise cromatográfica não foram hábeis o suficiente para a sua detecção.

CONCLUSÕES

A associação de óleo de soja e monensina na dieta não eleva o conteúdo de CLA do leite. Óleo de soja e monensina aumentam de forma aditiva os isômeros *trans*-C_{18:1} no leite. A população microbiana selecionada por estes dois ingredientes leva à modificação da bio-hidrogenação ruminal, induzindo à redução do teor de gordura do leite.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAUMAN, D.E., GRINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v.70, p. 15-29, 2001.
2. BAUMAN, D.E., BAUMGARD, L.H., CORL, B.A. et al. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. In: **Proceedings of the American Society of Animal Science**. 2000. Disponível em: <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf>.
3. CHILLIARD, Y., FERLAY, A., MANSBRIDGE, R.M. et al. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. **Annales de Zootechnie**, v. 49, p. 181-205, 2000.
4. FELLNER, V., SAUER, F.D., KRAMER, J.K.G. Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermentors **Journal of Dairy Science**, v.80. p. 921–928, 1997.
5. EIFERT, E.C. **Fontes de carboidratos, óleo de soja e monensina para vacas lactantes: desempenho, digestibilidade, parâmetros ruminais e perfil de ácidos graxos do leite**. Viçosa, MG:UFV, 2004. 117 p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
6. JENKINS, T.C., FELLNER, V., MCGUFFEY, R.K. Monensin by fat interactions on *trans* fatty acids in cultures of mixed ruminal microorganisms grown in continuous fermentors fed corn or barley. **Journal of Dairy Science**, v.86. p. 324-330, 2003

Tabela 1 – Perfil dos ácidos graxos *cis* e *trans* octadecenóicos do leite de vacas alimentadas com a combinação de óleo de soja e monensina (g/100 g)

Variável	Média dos Tratamentos ¹				Desvio padrão	Efeitos			
	CT	MN	OL	OM		Monensina		Óleo	
						0	33 ppm	0	4 %
----- Isômeros C _{18:1} -----									
<i>cis</i>	18,39	18,68	27,16	27,29	0,705	22,77	22,98	18,53 ^a	27,22 ^b
<i>trans</i>	1,86	2,77	4,69	6,58	0,468	3,27	4,67 ^B	2,31 ^a	5,63 ^b
<i>trans</i> -6-8*	0,22	0,26	0,52	0,76	0,033	0,37 ^A	0,51 ^B	0,24 ^a	0,64 ^b
<i>trans</i> -9	0,13	0,21	0,35	0,57	0,059	0,24 ^A	0,39 ^B	0,17 ^a	0,46 ^b
<i>trans</i> -10*	0,48	0,70	1,55	2,73	0,169	1,01 ^A	1,71 ^B	0,59 ^a	2,14 ^b
<i>trans</i> -11	0,59	1,01	1,39	1,39	0,344	0,99	1,20	0,79	1,39
<i>trans</i> -12	0,23	0,32	0,46	0,64	0,034	0,34 ^A	0,48 ^B	0,27 ^a	0,55 ^b
<i>trans</i> -16	0,21	0,28	0,43	0,49	0,017	0,32 ^A	0,39 ^B	0,24 ^a	0,46 ^b
<i>cis</i> -9	17,65	17,89	26,16	26,09	0,799	21,90	21,99	17,77 ^a	26,12 ^b
<i>cis</i> -11	0,49	0,53	0,65	0,52	0,104	0,57	0,53	0,51	0,59
<i>cis</i> -12	0,13	0,15	0,18	0,37	0,030	0,16 ^A	0,26 ^B	0,14 ^a	0,27 ^b
<i>cis</i> -13	0,02	0,065	0,063	0,132	0,015	0,04 ^A	0,10 ^B	0,04 ^a	0,10 ^b
<i>cis</i> -15	0,02	0,05	0,10	0,19	0,017	0,06 ^A	0,11 ^B	0,04 ^a	0,14 ^b

¹ CT= óleo e monensina ausentes; MN= 33 ppm de monensina; OL = 4 % de óleo de soja; OM = 4 % de óleo + 33 ppm monensina ;

^{a, b} letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P<0,05) * interação Monensina vs. Óleo (P<0,05)

^{A, B} letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia

19 de Julho a 22 de Julho de 2004 - Campo Grande, MS

Tabela 2 – Isômeros do ácido linoléico e estimativa da atividade da enzima Δ^9 -desaturase nos ácidos graxos do leite de vacas alimentadas com a combinação de óleo de soja e monensina, em g/100g

Variável	Média dos Tratamentos ¹				Desvio padrão	Efeitos			
	CT	MN	OL	OM		Monensina		Óleo	
						0	33 ppm	0	4 %
----- Isômeros C _{18:2} n-6 -----									
c-9 c-12	1,47	1,90	2,06	2,48	0,170	1,76 ^A	2,19 ^B	1,69 ^a	2,27 ^b
CLA totais	2,01	2,76	2,90	3,38	0,406	2,29 ^A	3,07 ^B	2,22 ^a	3,14 ^b
t-11 c-15	nd	0,03	0,07	0,10	0,019	0,03	0,07	0,02 ^a	0,08 ^b
c-9 t-11	0,54	0,82	0,77	0,81	0,131	0,65	0,81	0,68	0,79
t-10 c-12	nd ²	nd	nd	nd	-	-	-	-	-
----- Atividade da Δ^9 -desaturase -----									
Δ^9 CLA ³	1,14	1,18	1,81	1,61	0,264	1,48	1,39	1,16 ^a	1,71 ^b
Δ^9 C _{18:1} ⁴	0,59	0,54	0,72	0,67	0,035	0,65	0,61	0,57 ^a	0,69 ^b

^{a, b} letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

^{A, B} letras diferentes na mesma linha diferem pelo teste de Tukey (P<0,05)

¹ CT= óleo e monensina ausentes; MN= 33 ppm de monensina; OL = 4 % de óleo de soja; OM = 4 % de óleo + 33 ppm monensina ;

² não detectado; ³ *trans*-11/ *cis*-9 *trans*-11; ⁴ C_{18:0}/C_{18:1}; ⁵ C_{16:0}/C_{16:1}; ⁶ C_{14:0}/C_{14:1}; ⁷ C_{12:0}/C_{12:1};