

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

Bio-hidrogenação *in vitro* do ácido linoleico e seus intermediários em função do
pH ruminal

LUCIANO ANTÔNIO RITT
ZOOTECNIA/UFSM

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Zootecnia

Área de concentração Produção Animal

Porto Alegre (RS) Brasil
Março de 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Ritt, Luciano Antônio
BIO-HIDROGENAÇÃO IN VITRO DO ÁCIDO LINOLEICO E
SEUS INTERMEDIÁRIOS EM FUNÇÃO DO PH DO MEIO RUMINAL
/ Luciano Antônio Ritt. -- 2017.
102 f.
Orientadora: Maitê de Moraes Vieira.

Coorientador: Ênio Rosa Prates.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS,
2017.

1. Tempo de duração. 2. Nível de inclusão. 3.
Ácidos graxos trans. 4. CLA. 5. pH. I. Vieira, Maitê
de Moraes, orient. II. Prates, Ênio Rosa, coorient.
III. Título.

LUCIANO ANTÔNIO RITT
Zootecnista

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

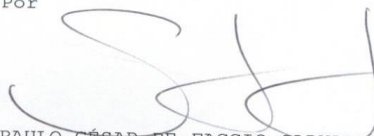
MESTRE EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 27.03.2017
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 17.05.2017
Por

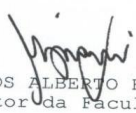

MAITÉ DE MORAES VIEIRA
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientadora


PAULO CÉSAR DE FACCIÓ CARVALHO
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia


ELISA CRISTINA MODESTO
Dep. de Zootecnia/UFRGS


MARCELO BERTOLINI
PPG Zootecnia/UFRGS


DIMAS ESTRASULAS DE OLIVEIRA
UESC


CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, à Deus pelo conforto nas horas mais sofridas, por me guiar pelos caminhos nem sempre mais fáceis, porém corretos; por me fazer acreditar que nem tudo está perdido e que as coisas acontecem no tempo e da forma que devem ser.

À minha família, pelo apoio, incentivo e compreensão durante todo o tempo, em especial aos meus pais, Elmiro e Carmen e, meus irmãos Daniel, Cleber e Marco, que de alguma forma sempre deram apoio e não mediram esforços para que eu conseguisse chegar até aqui. Tenho absoluta certeza que não teria conseguido se não fosse por vocês, muito obrigado!

À minha namorada, Catiane Orso, por ser minha grande incentivadora, pela compreensão, pelo apoio, pelo carinho e amor que tu sempre me deste. Mais uma etapa de nossas vidas que superamos juntos, rumo a um futuro cada vez melhor, muito obrigado.

Ao professor Ênio Rosa Prates, pela acolhida no curso, ensinamento, orientação e amizade.

Ao professor José Laerte Nörnberg, pela co-orientação, amizade de longa data e dedicação na viabilização de recursos e infra-estrutura do Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais da UFSM, sem os quais o presente trabalho não seria realizado.

Ao professor Gilberto Vilmar Kozlowski, pela utilização dos animais fistulados.

Aos professores do Departamento de Zootecnia, pelos ensinamentos e convívio.

À secretária do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFRGS, Ione, pela grande colaboração que sempre destes nos assuntos acadêmicos.

Aos colegas de curso, pelo convívio e amizade, em especial ao Elvis Ticiani pelo grande apoio que sempre me deste.

Aos Tropeiros do NIDAL, mestrandos, doutorandos, estagiários, funcionários e professores, foi muito valioso trabalhar com todos vocês, obrigado pela convivência agradável e aprendizado. Meus sinceros agradecimentos ao Diego Prado de Vargas, pela amizade e ensinamentos de cromatografia e na estatística.

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

Obrigado a todos!

ALTERAÇÃO DOS INTERMEDIÁRIOS DA BIO-HIDROGENAÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) EM FUNÇÃO DE MODIFICAÇÕES DO MEIO RUMINAL *IN VITRO*¹

Autor: Luciano Antônio Ritt

Orientadora: Maitê de Moraes Vieira

Co-orientador: Ênio Rosa Prates

Resumo: Um estudo foi conduzido através de incubações *in vitro* com fluido ruminal ovino para investigar fatores que podem modular a bio-hidrogenação e assim a produção e acúmulo de intermediários, além de identificar a ação destes fatores sobre as taxas e eficiências médias das três reações da bio-hidrogenação do C18:2n-6 (isomerização do C18:2n-6 a CLA, redução de CLA a C18:1 *trans* e redução de C18:1 *trans* a C18:0), combinando fatorialmente diferentes faixas de pH do meio de fermentação (pHB ~ 5,4; pHM ~ 6,2; pHA ~ 7,0), níveis de inclusão de C18:2n-6 puro (30 mg; 45 mg) e tempos de incubação (1/2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h). Como substrato, se utilizou uma ração sintética livre de lipídios e, a ela se adicionou o C18:2n-6. O conteúdo das incubações foi congelado, liofilizados e o perfil lipídico analisado por cromatografia a gás. O nível de inclusão de ácido linoleico e o pH afetaram o equilíbrio de ácidos graxos de 18 carbonos no meio incubado, observando-se interações. Em comparação com o nível de linoleico 45 mg, o de 30 mg favoreceu a produção de C18:0, de todos os isômeros C18:1-*trans*, porém o acúmulo de isômeros CLA, e também o desaparecimento do C18:2n-6 foram beneficiados pelo maior nível de inclusão. Em comparação com as faixas de pH baixo e pH médio do meio, o pH alto resultou em maior desaparecimento do C18:2n-6, produção de isômeros C18:1-*trans* e produção de isômeros CLA, exceto o CLA *trans*-10, *cis*-12 que teve maior acúmulo no pH 6,2. O baixo pH foi responsável pelo menor desaparecimento de C18:2n-6 devido a inibição da isomerização, entretanto, não é observado efeito sobre as demais reações, de forma a não haver acúmulo elevado de CLA e C18:1 *trans*. A maior inclusão inicial de C18:2n-6 em pHs elevados, causou maiores acúmulos de CLA, o qual atuou como inibidor da isomerização do C18:2n-6 e da primeira redução, uma vez que se observa grande quantidade acumulada desses isômeros, porém não teve efeito sobre a segunda redução. A combinação que levou aos maiores acúmulos de intermediários da bio-hidrogenação do C18:2n-6 foi o NL45-pHA-T24.

Palavras-chave: tempo de duração, nível de inclusão, ácidos graxos *trans*, CLA, pH, taxa, eficiência

¹Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (102 p.) Março, 2017.

ALTERATION OF BIO-HYDROGENATION INTERMEDIATES OF LINOLEIC ACID (C18: 2 *cis*-9, *cis*-12) IN THE FUNCTION OF MODIFICATIONS OF THE RUMINAL ENVIRONMENT *IN VITRO*¹

Author: Luciano Antônio Ritt
Adviser: Maitê de Moraes Vieira
Co-adviser: Ênio Rosa Prates

Abstract: A study was conducted through *in vitro* incubations with ovine ruminal fluid to investigate factors that can modulate biohydrogenation and thus the production and accumulation of intermediates, in addition to identifying the action of these factors on the rates and average efficiencies of the three bio hydrogenation-reactions of C18:2n-6 (isomerization of C18:2n-6 to CLA, reduction of CLA to C18:1 *trans* and reduction of C18:1 *trans* to C18:0), factorially combining different pH ranges of the fermentation medium (pHB ~ 5,4; pHM ~ 6,2; pHA ~ 7,0), inclusion levels of pure C18: 2n-6 (30 mg, 45 mg) and incubation times (1/2 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h). As a substrate, a lipid-free synthetic feed was used and C18: 2n-6 was added there to. The contents of the incubations were frozen, lyophilized and the lipid profile analyzed by gas chromatography. The inclusion level of linoleic acid and pH affected the equilibrium of 18-carbon fatty acids in the incubated medium, observing interactions. Compared with the linoleic 45 mg level, that of 30 mg favored the production of C18:0, of all C18:1 *trans* isomers, but the accumulation of CLA isomers, as well as the disappearance of C18:2n-6 were benefited by the higher level of inclusion. High pH resulted in higher disappearance of C18:2n-6, production of C18:1 *trans* isomers and production of CLA isomers, except CLA *trans*-10, *cis*-12 that had greater accumulation at pH 6.2. The low pH was responsible for the lower disappearance of C18:2n-6 due to inhibition of isomerization, however, no effect was observed on the other reactions, so that there was no high accumulation of CLA and C18:1 *trans*. The higher initial inclusion of C18:2n-6 at high pHs caused greater accumulations of CLA, which acted as an inhibitor of C18: 2n-6 isomerization and the first reduction, since a large accumulated amount of these isomers is observed, however, had no effect on the second reduction. The combination that led to the higher accumulations of C18:2n-6 biohydrogenation intermediates was NL45-pHA-T24.

Key words: duration time, level of inclusion, *trans* fatty acids, CLA, pH, rate, efficiency

¹Master of Science Dissertation in Animal Science - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (102 p.) March, 2017.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	10
1.INTRODUÇÃO	11
2.REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 Características dos lipídios	13
2.2 Lipólise e a bio-hidrogenação ruminal dos ácidos graxos insaturados	14
2.3 Bio-hidrogenação ruminal e a formação de intermediários do processo.....	15
2.4 Fatores nutricionais e de ambiente ruminal que afetam a bio-hidrogenação	20
2.5 Determinação dos intermediários da bio-hidrogenação do C18:2n-6	22
2.6 Isômeros CLA e a saúde humana.....	23
3.HIPÓTESE	25
4.OBJETIVO GERAL	25
CAPÍTULO II	26
Efeito do pH e dos níveis de ácido linoleico (C18:2 <i>cis</i> -9, <i>cis</i> -12) sobre a formação de intermediários da bio-hidrogenação ruminal: um estudo <i>in vitro</i>	27
Introdução	32
Material e métodos.....	33
Resultados	39
Discussão.....	43
Conclusões	57
Referências.....	58
CAPÍTULO III	76
CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
REFERÊNCIAS.....	78
APÊNDICES	87
VITA	102

RELAÇÃO DE TABELAS

CAPÍTULO II	26
Tabela 1. Efeitos do tratamentos e médias (mg/g MS) de C18:1 <i>trans</i> intermediários.....	65
Tabela 2. Efeitos do tratamentos e médias (mg/g MS) de C18:1 <i>cis</i> intermediários	67

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1. Vias de bio-hidrogenação do ácido linoleico20

Figura 2. Desaparecimento do ácido C18:2n-6 (mg/g MS) adicionado ao substrato de incubação em função dos fatores estudados – nível de ácido linoleico (NL-30 e NL45), faixa de pH (pHB=baixo, pHM=médio e pHA=alto) e tempos de incubação (0,5=30 min, 3, 6, 12 e 24 horas). SEM=0,56. Efeito (P-valor) = NL*T (<0,0001), NL*pH (0,0002), T*pH (<0,0001)69

Figura 3. Acúmulo de isômeros CLA (mg/g MS) em função dos fatores estudados – nível de ácido linoleico (30 e 45 mg), faixa de pH (pHB=baixo, pHM=médio e pHA=alto) e tempos de incubação (0,5=30 min, 3, 6, 12 e 24 horas), onde **A:** CLA-c9,t11 (SEM=0,11). Efeito (P-valor) = NL*pH*T (0,0004); **B:** CLA-t10,c12 (SEM=0,09). Efeito (P-valor) = NL*pH*T (0,0085); **C:** CLA-c9,c11 (SEM=0,02). Efeito (P-valor) = NL*T (<0,0001), NL*pH (0,0238), pH*T (0,0034); **D:** CLA-c10,c12 (SEM=0,01). Efeito (P-valor) = NL*pH*T (0,0491); **E:** CLA-c10,t12+t9,c11+c11,t13 (SEM=0,02). Efeito (P-valor) = NL*T (<0,0001), NL*pH (0,0124), pH*T (<0,0001); e **F:** CLA-t9,t11+t10,t12+t11,t13 (SEM=0,13). Efeito (P-valor) = NL*pH*T (0,0005).....70

Figura 4. Acúmulo do ácido C18:0 (mg/g MS) em função dos fatores estudados – nível de ácido linoleico (30 e 45 mg), faixa de pH (pHB=baixo, pHM=médio e pHA=alto) e tempos de incubação (0,5=30 min, 3, 6, 12 e 24 horas). SEM=0,14. Efeito (P-valor) = NL*pH*T (<0,0001).....72

Figura 5. Taxas médias (mg/L/h) e eficiências médias das três reações de bio-hidrogenação do ácido C18:2n-6 em função dos fatores estudados – nível de ácido linoleico (30 e 45 mg), faixa de pH (pHB=baixo, pHM=médio e pHA=alto) e tempos de incubação (0,5=30 min, 3, 6, 12 e 24 horas), onde: v1 e E1=taxa e eficiência média de isomerização do C18:2n-6 v2 e E2=taxa e eficiência da redução de CLA a C18:1 *trans*; v3 e E3=taxa e eficiência da redução de C18:1 *trans* a C18:0. v1: SEM=8,10. Efeito (P-valor) = NL*pH*T (<0,0001); E1: SEM=0,02. Efeito (P-valor) = NL*pH*T (0,0073); v2: SEM=9,08. Efeito (P-valor) = NL*pH*T (<0,0001); E2: SEM=0,03. Efeito (P-valor) = NL*pH*T (0,0021); v3: SEM=10,55. Efeito (P-valor) = NL*pH*T (<0,0001); E3: SEM=0,06. Efeito (P-valor) = NL*T (<0,0001), pH*T (<0,0001).....73

Figura 6. Projeção bidimensional dos escores das diferentes combinações entre os fatores estudados – nível de ácido linoleico (NL-30 e NL45), faixa de pH (pHB = baixo, pHM = médio e pHA = alto) e tempos de incubação (T0,5=30 min, T3=3 horas, T6=6 horas, T12=12 horas e T24=24 horas), além das cargas (correlações entre as variáveis e os componentes principais) das variáveis: C18:2n-6; CLA-*cis*-9, *trans*-11; CLA-*trans*-10, *cis*-12; C18:1 *trans*-11, C18:1 *trans*-10 e C18:075

RELAÇÃO DE APÊNDICES

Apêndice 1: Normas para preparação de trabalhos científicos para publicação no periódico <i>Animal Feed Science and Technology</i>	87
---	----

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BH: bio-hidrogenação
CLA: ácido linoleico conjugado
C18:2n-6: ácido linoleico
MS: matéria seca
FDN: fibra insolúvel em detergente neutro
FDA: fibra insolúvel em detergente ácido
CNF: carboidratos não-fibrosos
EE: extrato etéreo
PB: proteína bruta
PC: peso corporal
NL: nível de inclusão do ácido linoleico
T: duração da incubação em horas
pHB: pH baixo
pHM: pH médio
pHA: pH alto
v1: taxa de isomerização do C18:2n-6
E1: eficiência da isomerização do C18:2n-6
v2: taxa da redução de CLA a C18:1 *trans*
E2: eficiência da redução de CLA a C18:1 *trans*
v3: taxa da redução de C18:1 *trans* a C18:0
E2: eficiência da redução de C18:1 *trans* a C18:0.
CG: cromatografia gasosa
FID: detector de ionização em chama
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

A composição lipídica das dietas consumidas por animais ruminantes, consiste em grande parte de glicolipídios e fosfolipídios provenientes das forragens, sendo o perfil lipídico majoritariamente composto por ácido linoleico (C18:2n-6) e alfa-linolênico (C18:3n-3), enquanto que nos óleos e nos grãos usados em alimentos concentrados, a composição predominante é na forma de triglicerídeos e, os principais ácidos graxos são o linoleico e oleico (C18:1 *cis*-9). Quando consumidos por animais ruminantes, os lipídios sofrem duas importantes transformações no rúmen. A transformação inicial é a hidrólise das ligações éster, catalisadas por lipases microbianas, sendo um passo necessário para a segunda transformação, a bio-hidrogenação (BH) dos ácidos graxos insaturados.

Os ácidos graxos intermediários do processo de BH, têm a capacidade de regular alguns aspectos do metabolismo animal. Dentre esses ácidos graxos, encontram-se alguns isômeros do ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) que possuem as duplas ligações conjugadas. Esses ácidos graxos são comumente denominados CLA (do inglês, conjugated linoleic acid) e são originados do metabolismo ruminal dos ácidos graxos poli-insaturados da dieta bem como da síntese endógena, sendo encontrados em produtos de ruminantes, como na carne e, principalmente no leite.

Devido a seus efeitos biológicos dois isômeros têm sido considerados como os principais e assim, alvo de mais estudos. O primeiro deles é o CLA *cis*-9, *trans*-11, um importante agente anti-carcinogênico em alguns tipos de câncer, o outro é o CLA *trans*-10, *cis*-12, o qual afeta o metabolismo dos lipídios (Park et al., 1997) sendo responsável pela depressão da gordura do leite em ruminantes (Baumgard et al., 2000) e, em alguns casos, de particionar os nutrientes dentro do organismo animal, entretanto, não é um intermediário comum da bio-hidrogenação e ocorre no rúmen apenas sobre certas condições específicas que favoreçam a queda do pH do meio, por exemplo, dietas ricas em concentrado (Stewart et al., 1997).

A via clássica da bio-hidrogenação do C18:2n-6 proposta por Garton (1977), mudou muito pouco ao longo do tempo, mostrando que a conversão à esteárico incluía apenas dois intermediários, o CLA *cis*-9, *trans*-11 e o C18:1 *trans*-11. Esta via persistiu ao longo do tempo e é frequentemente representada de maneira idêntica nas publicações recentes (Ribeiro et al., 2011). No entanto, com a evolução das técnicas de cromatografia, novos intermediários da bio-hidrogenação do C18:2n-6 foram descobertos, sendo relatados isômeros de CLA com duplas insaturações, desde nos carbonos 6,8 até os carbonos 13,15 (Shingfield & Wallace, 2014), totalizando vinte isômeros geométricos do CLA identificados *in vitro*, dentre os quais, dez isômeros foram identificados em fluido ruminal de ovinos como intermediários do C18:2n-6. Contudo, com exceção do CLA *cis*-9, *trans*-11, que possui propriedades nutracêuticas e do CLA *trans*-10, *cis*-12, relacionado ao metabolismo lipídico, muito pouco se sabe a respeito das vias de formação dos demais isômeros, bem como os papéis que estes desempenham.

Pesquisas mostraram que os fatores que afetam a bio-hidrogenação ruminal seriam capazes de modular o processo, sendo o pH ruminal, a fonte e a

quantidade de ácidos graxos poli-insaturados responsáveis por afetar quantitativamente a bio-hidrogenação e a formação dos intermediários (Griinari & Bauman, 1999; Beam et al., 2000). No entanto, os efeitos de diferentes faixas de pH, combinada com a quantidade de C18:2n-6 suplementado, sobre a formação dos intermediários da bio-hidrogenação ruminal são escassos, necessitando mais investigações. Neste sentido, o presente trabalho, objetiva verificar a formação dos intermediários do processo de bio-hidrogenação ruminal, *in vitro*, frente a alterações no pH do meio de incubação, bem como no nível de ácido linoleico puro adicionado ao substrato de incubação e nos tempos de duração das incubações.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Características dos lipídios

Os lipídios são substâncias de baixa solubilidade em solventes polares, compondo assim, uma classe de diferentes compostos, os quais desempenham diferentes funções, desde o fornecimento de energia à atuação como hormônios. Os lipídios saponificáveis, ou seja, aqueles que ao serem hidrolisados em meio alcalino, geram sabões, têm como unidade básica os ácidos graxos, os quais consistem de ácidos carboxílicos unidos a uma cadeia carbônica, tendo como principal função para os animais, o fornecimento de energia (Graziola et al., 2002). Na maior parte dos alimentos, os ácidos graxos estão na forma de ésteres, formando os óleos e as gorduras (Graziola et al., 2002). No caso dos alimentos consumidos por ruminantes, sobretudo forragens, os ácidos graxos são componentes das membranas celulares das plantas, na forma de fosfolipídios e glicolipídios (Chilliard et al., 2007) e, dos cloroplastos na forma de diglicerídios e galactolipídios.

Além do fornecimento de energia, esses ácidos graxos atuam na regulação do metabolismo animal, relacionado aos aspectos de sua estrutura molecular, como o comprimento de cadeia, presença de duplas ligações, posição e isomeria das ligações, etc. Tratando-se especificamente dos ácidos graxos poli-insaturados, os quais são assim denominados por possuírem mais de uma dupla ligação na molécula, tem maior ação sobre a atividade e expressão gênica de enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, lipídeos (Salter & Tarling, 2007) e ciclo celular (Miglietta et al., 2006).

Os efeitos metabólicos e fisiológicos dos lipídios consumidos são fortemente determinados pelo perfil de ácidos graxos de que são compostos. A comunidade científica, nas últimas décadas, gerou uma crescente preocupação, a qual levou a questionamentos a respeito dos possíveis efeitos maléficis dos ácidos graxos *trans*, entretanto, pesquisas mais recentes têm mostrado efeitos benéficos à saúde pelo consumo de um determinado tipo desses compostos. Os ácidos graxos *trans* são formados naturalmente, através da bio-hidrogenação parcial dos ácidos graxos poli-insaturados no rúmen dos animais ruminantes, sendo esses compostos encontrados na carne e principalmente no leite e produtos lácteos produzidos por esses animais (Chin et al., 1993).

No ambiente ruminal, o metabolismo desses ácidos graxos exerce grande influência na composição dos produtos de animais ruminantes. Os ácidos graxos insaturados, como o linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) e o alfa-linolênico (C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15), são encontrados em consideráveis concentrações nas gramíneas e outros alimentos que compõem a dieta de ruminantes, entretanto esses ácidos graxos são encontrados em reduzidas concentrações nos produtos desses animais. Isso se deve ao fato de que os ácidos graxos, ao serem ingeridos, sofrem transformações no ambiente ruminal, uma vez que, neste ambiente anaeróbio, os ácidos graxos não são oxidados como as demais moléculas (Wu & Palmquist, 1991), assim, os lipídios da dieta não provêm nutrientes para as atividades de crescimento e multiplicação/reprodução dos microrganismos do rúmen. As modificações alteram o grau de insaturação da

cadeia, assim como a organização molecular e modificam a estrutura física, dessa forma, levando à modificação do comportamento metabólico e dos efeitos fisiológicos desses ácidos graxos.

Os dois principais processos que sustentam as modificações nos ácidos graxos insaturados, compreendem a lipólise seguida da hidrogenação (Jenkins et al., 2007), sendo esses processos realizados pela flora presente no rúmen. Beam et al. (2000) comentaram que a quantidade e o perfil dos ácidos graxos que chegam ao rúmen exercem forte influência sobre o grau de eficiência desses processos. Somado a isso, Fuentes et al. (2009) atribuem ao pH do meio ruminal uma forte influência sobre esses processos.

2.2 Lipólise e a bio-hidrogenação ruminal dos ácidos graxos insaturados

A lipólise resulta na libertação de ácidos graxos livres a partir da quebra de ligações ésteres dos lipídios apresentados aos microrganismos (como triglicerídios, fosfolipídios e diglicerídios), permitindo assim, a bio-hidrogenação (BH), que é a redução do número de ligações duplas na cadeia carbônica do ácido graxo. Uma vez que a hidrogenação subsequente só pode acontecer se a porção carboxila estiver livre, a lipólise é um passo necessário na bio-hidrogenação. Este conjunto de reações parece ser um processo utilizado pelos microrganismos para se proteger dos efeitos tóxicos dos ácidos graxos insaturados (Dehority, 2003; Buccioni et al., 2012).

De forma simples, na bio-hidrogenação, os ácidos graxos insaturados livres sofrem primeiramente, isomerização da forma *cis* para ácidos graxos *trans*, seguido de uma hidrogenação das ligações duplas (Bauman et al., 2000), processo também catalisado por enzimas microbianas. A hidrogenação converte ácidos graxos insaturados para saturados, determinando, desta forma o alto grau de saturação do perfil lipídico dos produtos de ruminantes, quando comparados aos de não ruminantes e de plantas (Lock & Bauman, 2004).

Dentre os microrganismos ruminais, as bactérias são as principais atuantes na bio-hidrogenação dos ácidos graxos no rúmen. A estirpe *Butirivibrio fibrosolvens* foi a primeira a ser associada com a redução dos ácidos graxos. Polan et al. (1964), utilizando o C18:2n-6 como substrato, identificaram que essa estirpe tinha a capacidade de bio-hidrogenar o ácido graxo em questão e formar o CLA *cis*-9, *trans*-11 e o ácido vacênico (C18:1 *trans*-11), sem formar ácidos graxos saturados. Posteriormente, ficou estabelecido que apenas algumas bactérias tinham a capacidade de hidrogenar os ácidos graxos monoinsaturados e formar o ácido esteárico (Harfoot & Hazlewood, 1997). Conforme a capacidade em hidrogenar determinados substratos, as bactérias foram classificadas em dois grupos como segue: as do grupo A e as do grupo B. As que tinham como substrato os ácidos graxos poli-insaturados e como produto final o C18:1 *trans*-11 foram classificadas como pertencentes ao grupo A (por exemplo, *B. Fibrosolvens*). Já as bactérias que pertencem ao grupo B se caracterizam por atuarem na hidrogenação completa dos ácidos graxos C18:3 e C18:1 *trans*-11 (por exemplo, *Fusocillus spp.* e *C. proteoclasticum*) (Kemp et al., 1984).

Os fungos anaeróbios existentes no rúmen também têm a capacidade de metabolizar ácidos graxos insaturados e formar intermediários da bio-hidrogenação (CLA *cis*-9, *trans*-11), embora em quantidade muito menor que as

bactérias (Maia et al., 2007). Considera-se que as bactérias são as principais responsáveis pela BH, enquanto a contribuição dos protozoários é considerada insignificante (Singh & Hawke, 1979). Esta atividade está principalmente associada às bactérias ligadas a partículas de alimento, e não aquelas livres no meio ruminal. O AGI livre é adsorvido sobre superfícies de partículas de alimento e ali é hidrogenado (Harfoot et al., 1975, Gerson et al., 1988). No entanto, Nam & Garnsworthy, (2007) estudaram a taxa de BH do ácido linoleico (C18:2n-6) por fungos ruminais mistos, em um estudo *in vitro* e observaram que fungos ruminais podem bio-hidrogenar o C18:2n-6, porém em menor quantidade que as bactérias do rúmen. O produto final da bio-hidrogenação fúngica é o ácido vacênico (C18:1 *trans*-11), como é para as bactérias ruminais, e *Orpinomyces* é o fungo bio-hidrogenante mais ativo. Os fungos anaeróbios existentes no rúmen também têm a capacidade de metabolizar ácidos graxos insaturados e formar intermediários da BH (CLA *cis*-9, *trans*-11), embora em quantidade muito menor que as bactérias (Maia et al., 2007).

Como os ácidos graxos não fornecem nutrientes aos microrganismos, há duas teorias que tentam explicar os motivos pelos quais as bactérias realizam a BH. A primeira teoria sugere que esta hidrogenação é uma tentativa de drenar equivalentes redutores (Jenkins et al., 2008). Já a segunda teoria sugere que esta hidrogenação é na verdade uma tentativa de detoxificação dos ácidos graxos insaturados (Kemp et al., 1984). Trabalhos recentes como os de Maia et al. (2007) e Maia et al. (2010) apontaram como causa da BH a remoção de um efeito bacteriostático causado pelos ácidos graxos insaturados (teoria da detoxificação).

Outro fator relevante é a sensibilidade das diferentes estirpes bacterianas aos ácidos graxos insaturados, que por sua vez, está relacionado com as diferentes habilidades em hidrogenar. Como exemplo, a estirpe *Butirivibrio proteoclasticus* é muito mais sensível que a *Butirivibrio fibrosolvens* a ácidos graxos monoinsaturados. Assim, a sua sensibilidade ao C18:1 *trans*-11 explica a habilidade em reduzir este ácido graxo a ácido esteárico.

Por ser um processo associado com a fermentação microbiana, a lipólise e a BH podem ser afetadas por vários fatores dietéticos que, conseqüentemente, determinam o perfil de ácidos graxos que deixam o rúmen. A quantidade e a natureza dos lipídios da dieta e sua associação com a relação volumoso:concentrado da dieta são os principais fatores que determinam a extensão da hidrogenação dos ácidos graxos no rúmen (Chilliard et al., 2007; Lourenço et al., 2010). Um exemplo de associação entre estes dois fatores é o aumento da fração lipídica na dieta através da inclusão de óleos em dietas com alta proporção de forragem. A presença de ácidos graxos insaturados nos óleos inibe a lipólise e a BH e o aumento da forragem na dieta tende a minimizar estes efeitos negativos dos ácidos graxos (Palmquist & Jenkins, 1980; Beam et al., 2000). Por sua vez, uma alta inclusão de concentrado na dieta acarreta em queda do pH ruminal, um fator do ambiente ruminal que está diretamente ligado com a diminuição da lipólise e a BH e com a geração de diferentes intermediários desse processo (Fuentes et al., 2011).

2.3 Bio-hidrogenação ruminal e a formação de intermediários do processo

A busca por compostos carcinogênicos na carne bovina levou, entretanto, à descoberta de ácidos graxos que possuíam propriedades anti-carcinogênicas, sendo estes isômeros do C18:2n-6 (Ha et al., 1987). Esses isômeros são comumente chamados de ácido linoleico conjugados, ou simplesmente CLA. Desde o seu descobrimento, no final da década de 70, o CLA vem sendo estudado de forma constante e exaustiva quanto às suas propriedades benéficas à saúde (Santos-Zago et al., 2008). O CLA é encontrado majoritariamente em produtos alimentícios gerados por ruminantes, sobretudo leite e derivados lácteos e carne, dando a estes produtos, inicialmente considerados apenas como fontes de nutrientes para dieta humana, também o caráter de alimentos funcionais ou alimentos nutracêuticos.

CLA é a terminologia utilizada para denominar a mistura de isômeros do ácido *cis*-9, *cis*-12 octadecadienóico. Estes isômeros podem apresentar duplas ligações conjugadas com a geometria *cis-cis*, *cis-trans*, *trans-trans* e *trans-cis* em diferentes posições da cadeia carbônica (Bauman et al., 2008), totalizando um total de 56 isômeros possíveis. As posições das duplas ligações dos isômeros CLA efetivamente identificados no rúmen e na gordura do leite variam de 6,8 a 13,15 na maioria das configurações geométricas possíveis, para um total de 32 isômeros (Kramer et al., 2004). O CLA é produzido naturalmente pelas bactérias fermentativas presentes no rúmen e, por este motivo, está presente em maiores concentrações em produtos derivados de animais ruminantes, como carne, leite e seus derivados, sendo o CLA-*cis*-9, *trans*-11 o isômero predominante, perfazendo cerca de 80 a 90% do total de CLA presente no leite. O isômero *trans*-7, *cis*-9 ou o *trans*-11, *cis*-13 é o segundo mais abundante no leite, compondo aproximadamente 10% do total de CLA (Yurawecz et al., 1998). Os demais isômeros estão presentes em quantidades reduzidas, onde cada um corresponde a menos de 1% do CLA total (Palmquist et al., 2005).

O CLA-*cis*-9, *trans*-11 é sintetizado em pequenas quantidades no rúmen pela isomerização do C18:2n-6, sendo principalmente sintetizado na glândula mamária por desaturação do ácido vacênico (C18:1 *trans*-11) pela ação da delta-9-dessaturase, nos ruminantes em lactação (Griinari & Bauman, 1999).

Os alimentos que compreendem as dietas de ruminantes contêm, frequentemente, C18:2n-6, C18:3n-3 (ácido linolênico) e C18:1 *cis*-9 (ácido oleico). A maioria das bactérias envolvidas na BH são celulolíticas, sendo as mais importantes *B. fibrisolvens*, identificadas por Kepler et al. (1966). Atualmente, mais de 32 cepas desta bactéria foram identificadas e caracterizadas (Buccioni et al., 2012). *Clostridium proteoclasticum*, reclassificado como *Butyrivibrio proteoclasticus*, é a única bactéria isolada do rúmen capaz de converter ácidos graxos poli-insaturados em ácidos graxos saturados. Este microrganismo converte substratos C18:1 em C18:0 (Buccioni et al., 2012).

Com base em diversos experimentos, Harfoot & Hazlewood. (1997), estabeleceram uma ordem dos eventos e descreveram uma via para a hidrogenação do C18:2n-6 e outra para o C18:3n-3. A BH do C18:2n-6, é a principal via de origem dos isômeros CLA, sendo o primeiro passo da via da BH do C18:2n-6 a isomerização pela *cis*-12, *trans*-11-isomerase a ligação *cis*-12 para *trans*-11, produzindo o isômero CLA (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) (Kepler et al., 1970). Em seguida, o isômero *cis*-9, *trans*-11 sofre uma hidrogenação na ligação

dupla *cis*-9, por uma redutase microbiana de *B. fibrisolvens*, sendo convertido a C18:1 *trans*-11 (ácido vacênico), o qual é reduzido a C18:0 (ácido esteárico), finalizando assim a completa saturação do C18:2n-6. Estas etapas iniciais ocorrem rapidamente, enquanto a BH do ácido vacênico para ácido esteárico é muito mais lenta, e resulta em acúmulo de C18:1 *trans*-11 no rúmen. Assim, quando diferentes grupos de microrganismos estão envolvidos, a hidrogenação do ácido vacênico parece ser o passo que determina a taxa de BH (Buccioni et al., 2012).

A bio-hidrogenação do ácido alfa-linolênico (C18:3 *cis*-9, *cis*-12, *cis*-15) compreende quatro etapas (Griinari & Bauman, 1999), sendo que, primeiramente, há a isomerização da dupla ligação *cis*-12 para *trans*-11, em seguida a ligação *cis*-9 é hidrogenada, formando C18:2 *trans*-11, *cis*-15 e, deste podem ser formados os intermediários C18:1 *trans*-11, C18:1 *cis*-15 ou C18:1 *trans*-15, porém somente o primeiro intermediário, o ácido *trans*-vacênico, pode ser reduzido a esteárico (Harfoot & Hazlewood, 1997).

A quantidade de ácido vacênico hidrogenada para C18:0 é afetada pelas condições no rúmen, pelo tipo e pela concentração de ácidos graxos poli-insaturados na dieta, e por substâncias polifenólicas na dieta, tais como taninos que inibem irreversivelmente o processo (Harfoot et al., 1973). Moore et al. (1969) sugeriram que grandes quantidades de C18:2n-6 livre impedem o segundo estágio da BH, embora isto não ocorra quando o C18:2n-6 está na forma esterificada. Chilliard et al. (2001; 2003) analisaram os efeitos de fatores nutricionais que afetam a composição da gordura láctea dos ruminantes e sugeriram, com base em dados da literatura, que suplementar dietas com óleo marinho diminui a BH ruminal. Chow et al. (2004) mostraram que o óleo de peixe não tem influência no grau de lipólise ou de BH aparente do C18:2n-6 e do C18:3n-3. A diminuição simultânea na quantidade de C18:0 e o aumento de C18:1 *trans*-11 e C18:2 *trans*-11, *cis*-15, nos substratos, quando óleo de peixe é adicionado, indica que este suplemento inibe o passo final da BH do C18:2n-6 e do C18:3n-3. Resultados semelhantes foram relatados por Shingfield et al. (2003; 2010) e Shingfield & Griinari (2007) *in vivo*, que também concluíram que o óleo de peixe aumenta o teor de ácido rumênico na gordura do leite devido ao aumento do ácido vacênico.

Martin & Jenkins (2002) demonstraram que alguns fatores ambientais, como o pH ruminal, parecem ter uma grande influência sobre a produção de isômeros C18:1 *trans* e CLA. Estes autores sugeriram que o pH ruminal tem de ser mantido acima de 6,0 para a síntese de CLA deve ser maximizada, porque as bactérias celulolíticas são sensíveis à condição ácida.

Na década de 1990, Griinari & Bauman postularam que havia uma mudança na via normal da BH quando os ruminantes eram alimentados com dietas com alto teor de concentrado e baixo teor de fibra (Griinari et al., 1997; 1998). Esta teoria foi corroborada por vários estudos que examinaram dietas de baixa fibra suplementadas com óleos vegetais e óleo de peixe (Piperova et al., 2002; Loores et al., 2004; Shingfield et al., 2005). A presença de gordura em uma dieta com carboidratos rapidamente fermentáveis e/ou uma alta proporção de amido, altera as condições ruminais, induzindo alterações na população bacteriana do rúmen. Como resultado, é muito provável que vias alternativas para metabolizar AG sejam ativadas. Demonstrou-se que o C18:2n-6 pode ser

isomerizado para C18:1 *cis*-9, *trans*-11 ou para CLA-*trans*-10, *cis*-12 (Griinari & Bauman, 2006), mas que a isomerização do C18:2n-6 para CLA-*trans*-10, *cis*-12, converte a ligação *cis*-9 a uma *trans*-10 através da atividade de uma *cis*-9, *trans*-10-isomerase. Este passo pode ocorrer por meio de uma reação iônica, como sugerido pela descoberta da estrutura *cis*-9, *trans*-10-isomerase e seu mecanismo de ação, num estudo de Liavonchanka et al. (2006). No passo seguinte, forma-se o isômero C18:2 com ligações duplas *trans*-10, *cis*-12 e a redução ocorre então até que a cadeia de carbono esteja completamente saturada. McKain et al. (2010) demonstraram que a *B. fibrisolvens* JW11 metaboliza o C18:2 *trans*-10, *cis*-12 a C18:1 *trans*-10, enquanto a *B. proteoclasticus* P-18 não cresce na presença de C18:2 *trans*-10, *cis*-12, mas cresce em meio contendo C18:2 *trans*-9, *trans*-11 para formar C18:0. Também mostraram que a *P. acnes*, uma espécie ruminal que isomeriza o ácido linoleico a C18:2 *trans*-10, *cis*-12, não metaboliza isômeros CLA e, que *B. fibrisolvens* é capaz de metabolizar pequenas quantidades de C18:1 *trans*-10.

O CLA *trans*-10, *cis*-12 não faz parte da rota de BH descrita por Harfoot & Hazlewood (1997). Forma-se no rúmen sob condições que favoreçam a queda do pH do meio, provocada pela dieta, associado ou não a presença de ácidos graxos poli-insaturados no rúmen, levando a alterações na rota de bio-hidrogenação mais conhecidas (Bauman & Griinari, 2003).

O CLA *trans*-10, *cis*-12 é o único ácido graxo que sem dúvida atua na redução da gordura do leite (Baumgard et al., 2000). Um estudo de Lock et al. (2007) sugeriu que o papel do C18:1 *trans*-10 na depressão da gordura do leite deve ser reconsiderado, e estudos posteriores confirmaram que esse isômero pode diminuir a lipogênese mamária (Shingfield et al., 2009). As discrepâncias nos resultados entre os estudos podem estar relacionadas ao efeito dose-dependente, como Kadegowda et al. (2008) sugeriram que os isômeros *trans*-6, *trans*-7 e *trans*-8, de C18:1, podem ser mais importantes do que o C18:1 *trans*-10 na depressão da gordura do leite, e mostraram que os isômeros *trans*-10, *cis*-12 e o *trans*-7, *cis*-9 de CLA foram os mais fortemente correlacionados negativamente com a proporção de gordura do leite, o que implica que o CLA-*trans*-7, *cis*-9 tem um papel possível na depressão da gordura do leite.

No entanto, estudo com vacas leiteiras identificou outros supostos inibidores da síntese de gordura de leite, tais como o C18:2 *trans*-9, *cis*-11 e o *cis*-10, *trans*-12, embora o mecanismo de inibição ainda não tenha sido confirmado (Perfield et al., 2007).

Bauman & Griinari (2003) apresentaram uma via possível da BH do C18:2n-6, na qual ocorreria a formação do CLA *trans*-10, *cis*-12 em condições de baixo pH ruminal e/ou uma alta quantidade de óleos poli-insaturados. Em princípio, o C18:2n-6 seria isomerizado para CLA *trans*-10, *cis*-12, e posteriormente reduzido para C18:1 *trans*-10. O último passo desta via seria a hidrogenação do C18:1 *trans*-10, com a formação do ácido esteárico (C18:0).

2.4 Fatores nutricionais e de ambiente ruminal que afetam a bio-hidrogenação

A bio-hidrogenação ruminal do ácido linoleico, *in vivo*, varia entre 70-95%, sendo a extensão desse processo é influenciada pela quantidade e perfil

de lipídios na dieta, tempo de retenção no rúmen e as características da população microbiana. A bio-hidrogenação é extensa, com o C18:0 (ácido esteárico) sendo o principal ácido graxo que deixa o rúmen, na maioria das dietas. No entanto, a redução de ácidos graxos insaturados de 18 carbonos até C18:0 no rúmen é incompleta e numerosos intermediários se acumulam. A redução final de C18:1-*trans* é o passo de limitante na velocidade da BH completa de ácidos graxos insaturados com 18 átomos de carbono. Diminuições no pH de 6,5 para abaixo de 6,0 diminui a extensão da bio-hidrogenação do ácido linoleico (Fuentes et al., 2009; Choi et al., 2005) e inibe a redução final, de C18:1-*trans* a C18:0 (Fuentes et al., 2009; Troegeler-Meynadier et al., 2006), *in vitro*. Os efeitos do pH abaixo dos intervalos fisiológicos normais no rúmen podem estar relacionados com a ruptura de membranas de células bacterianas resultando na inativação de isomerases e redutases ligadas à membrana (Kepler & Tove, 1967).

Durante muitos anos, a isomerização da ligação dupla *cis*-12 que conduz à formação de CLA *cis*-9, *trans*-11 foi considerada o primeiro passo comprometido da bio-hidrogenação do ácido linoleico no rúmen, seguido pela redução a C18:1-*trans* e C18:0. Estudos mais recentes (Figura 1) mostraram que os isômeros geométricos do ácido linoleico com duplas ligações entre os carbonos 9,11 e 10,12 são formados durante incubações de C18:2n-6 com fluido ruminal (Fuentes et al. 2009; Troegeler-Meynadier et al., 2003; Jouany et al., 2007; Honkanen et al., 2012) e, com culturas puras de várias bactérias ruminais (Wallace et al., 2007) e 11,13 (Or-Rashid et al., 2011) (Figura 1). As quantidades de isômeros 9,11 e 10,12 de CLA formados durante a isomerização do C18:2n-6, também parecem ser dependentes do pH, porém os relatos são conflitantes. Alguns estudos demonstraram que, com as diminuições de pH abaixo de 6,0, ocorre redução no acúmulo de CLA *cis*-9, *trans*-11 e CLA *trans*-10, *cis*-12 (Fuentes et al., 2009; Troegeler-Meynadier et al., 2003), enquanto que outros resultaram aumentos no acúmulo do segundo isômero (Choi et al., 2005). Os produtos C18:2 conjugados formados durante isomerização inicial do C18:2n-6 são transitórios e podem ser reduzidos para produzir intermediários C18:1-*trans* (-4, -5, 6-8, -9, -10, -11, -12, -13 e -14) e C18:1-*cis* (-9, -10, -11, -12 e -13). As diminuições no pH de 6,4 para 5,6 demonstraram promover a formação de C18:1 *trans*-10, acompanhadas por uma diminuição no acúmulo de C18:1 *trans*-11 (Fuentes et al., 2009). Aumentos nas quantidades de C18:2n-6 incubadas também demonstraram aumentar a proporção de C18:1 *trans*-10/C18:1 *trans*-11 (Honkanen et al., 2012; Or-Rashid et al., 2011).

A concentração de CLA nos produtos oriundos de ruminantes é devida, principalmente, à dieta. Devido a isso, muitas estratégias nutricionais têm sido implementadas visando à elevação desse composto no leite e na carne. A inclusão de diferentes fontes de óleo na dieta, ou até mesmo a suplementação com isômeros de CLA levaram ao aumento da concentração desses compostos no leite (Chouinard et al., 1999). Nos primeiros estudos que envolveram a suplementação de dietas de vacas leiteiras com misturas de isômeros de CLA, foi observada acentuada redução no teor de gordura do leite (Chouinard et al., 1999). Mais recentemente, pesquisas com isômeros purificados demonstraram que os efeitos biológicos observados previamente eram isômero-dependentes, sendo a ação anti-carcinogênica, demonstrada inicialmente por Ha et al. (1987),

atribuída ao isômero *cis*-9, *trans*-11 (Ip et al., 1999). Ao isômero *trans*-10, *cis*-12 foi atribuído como sendo responsável pela redução do teor e produção de gordura do leite em ruminantes (Baumgard et al., 2000).

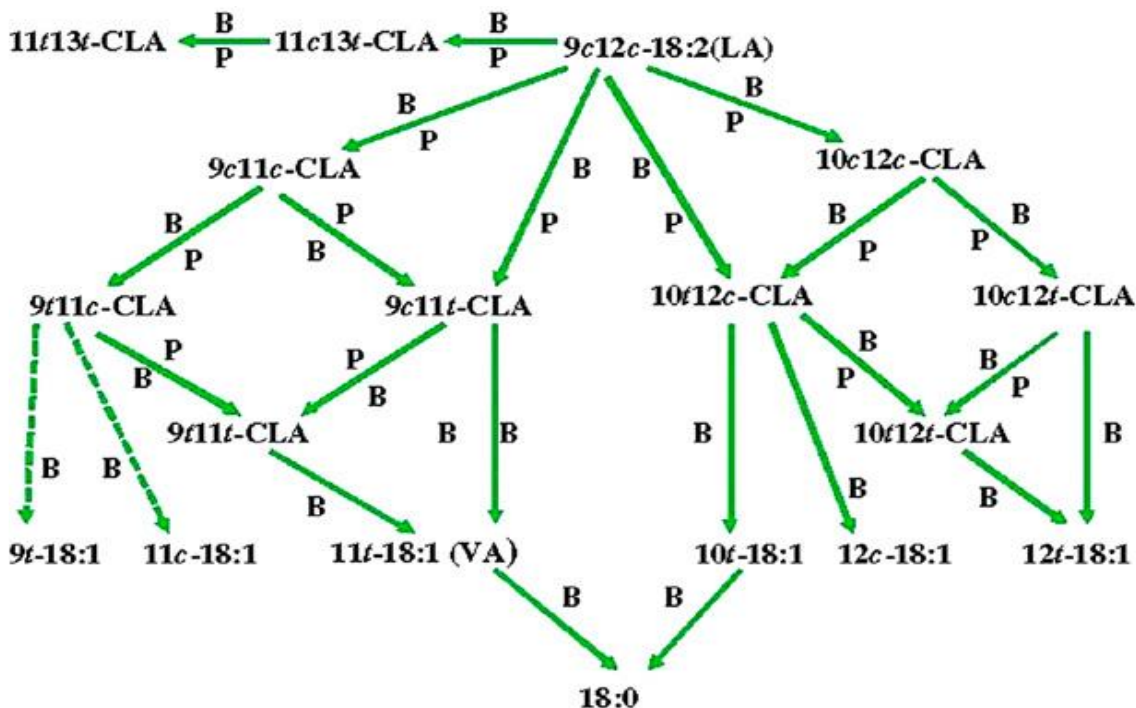


Figura 1: Vias de bio-hidrogenação do ácido linoleico.

Fonte: Or-Rashid et al., (2011).

A elevação nas quantidades de CLA em produtos de ruminantes é consequência de inibições parciais do metabolismo ruminal dos ácidos graxos e da síntese endógena. Apesar de ser um intermediário bastante estudado e documentado nas rotas de bio-hidrogenação, o isômero *cis*-9, *trans*-11 é formado, majoritariamente, na glândula mamária e em outros tecidos, pela ação da enzima Δ 9-dessaturase (Esteroil-CoA Dessaturase) (Griinari et al., 2000), pela dessaturação do C18:1 *trans*-11, o qual é o principal C18:1 na forma *trans* intermediário produzido pela bio-hidrogenação ruminal do C18:2n-6, o qual é também intermediário comum da bio-hidrogenação ruminal do ácido alfa-linolênico (Harfoot & Hazlewood, 1997).

Independente de qual seja a origem do CLA presente no leite e na carne, os fatores que afetam a bio-hidrogenação ruminal poderiam ser capazes de modular o conteúdo deste isômero nos produtos de ruminantes. Dentre os fatores, o pH ruminal, assim como a fonte e a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados são conhecidos por afetar quantitativamente o grau da bio-hidrogenação (Van Nevel & Demeyer, 1996; Griinari & Bauman, 1999; Beam et al., 2000).

Martin & Jenkins (2002) testaram incubações de cultura contínua, conduzidas a uma taxa de diluição de 0,05 e 0,10/h com valores de pH de 5,5 e 6,5, com adição de 1,0 g/L de carboidrato solúvel misto. Eles observaram que o principal fator ambiental que influenciou a formação de isômeros CLA e C18:1 *trans* a partir da bio-hidrogenação do ácido linoleico foi o pH da cultura. A um pH

de 5,5, as concentrações de CLA e C18:1 *trans* foram significativamente reduzidas.

Num estudo *in vitro* conduzido por Troegeler-Meynadier et al. (2003), variando o pH do meio, bem como as quantidades dos ácidos linoleico e linolênico inseridas, verificaram que com as mesmas quantidades iniciais de C18:2n-6, houve menor desaparecimento desse composto em pH 6,0, em relação ao pH 6,5. Quando a concentração de C18:2n-6 foi aumentada, observou-se menor desaparecimento desse composto, porém a quantidade desaparecida total deste ácido graxo foi maior, o que sugere haver um limite no primeiro passo da bio-hidrogenação, o processo de isomerização. Dessa forma, conforme Troegeler-Meynadier et al. (2003), a faixa de pH em torno da neutralidade e a inclusão de maiores quantidades de C18:2n-6 podem proporcionar maiores fluxos de CLA para ser incorporado nos produtos de ruminantes (leite e carne). Este autores observaram que as quantidades de produtos da bio-hidrogenação eram sempre menores a uma pH 6,0 do que a um pH 7,0 em 24 horas incubação *in vitro* com fluido ruminal. As baixas quantidades de CLA com o pH 6,0 poderiam ser devidas a baixa atividade da isomerase ou a uma elevada atividade das redutases. Além disso, verificaram que o pH baixo (pH 6,0) resultou em menor quantidade de C18:1 *trans*-11 em todos os tempos de incubação em comparação com pH mais elevado (pH 7,0), mas a concentração de C18:1 *trans*-10 foi maior entre 16 e 24 horas de incubação. O baixo pH inibiu a isomerização inicial e a segunda redução (C18:1 *trans*-11 para o ácido esteárico), conduzindo a um acúmulo de C18:1 *trans*-11 (Troegeler-Meynadier et al., 2006).

Choi et al. (2005) relataram que o CLA-*cis*-9, *trans*-11 é produzido a um pH superior a 6,2 por bactérias do rúmen, mas que o CLA-*trans*-10, *cis*-12 é produzido em maior quantidade do que o CLA-*cis*-9, *trans*-11 a um pH mais baixo. Concluíram que as bactérias produtoras do CLA-*trans*-10, *cis*-12 podem ser mais tolerantes ao pH ácido do que as bactérias produtoras de CLA-*cis*-9, *trans*-11.

Fuentes et al. (2009), conduziram um ensaio *in vitro* objetivando avaliar o comportamento da bio-hidrogenação sob diferentes pH do meio (5,6 vs. 6,4), avaliando juntamente a relação volumoso:concentrado. O pH mais baixo resultou num maior acúmulo de C18:1 *trans*-10 e do isômero CLA *trans*-10, *cis*-12, sendo que este isômero sofreu maior acúmulo na maior quantidade de concentrado, em detrimento desta maior quantidade de concentrado levar a diminuição do pH do meio. Desta forma, Fuentes et al. (2009) concluíram que o pH é fator que exerce efeito sobre a bio-hidrogenação. Harfoot & Hazlewood (1988) também concluíram que o fornecimento de dietas com baixo teor de volumoso, acarreta na diminuição da lipólise dos triacilgliceróis, assim como a bio-hidrogenação de ácidos graxos insaturados de cadeia longa no rúmen. *In vitro*, a atividade lipolítica e da bio-hidrogenação também foram reduzidas nestas condições (Latham et al., 1972). Entretanto, essa interpretação tem sido contestada com base em relatos recentes sobre o metabolismo do C18:2n-6 por bactérias ruminais (Maia et al., 2010) e, medições da composição de ácidos graxos no rúmen em vacas alimentadas com dietas contendo quantidades baixas ou altas de amido (Zened et al., 2013). Os resultados de ambos estudos levaram à conclusão de que a influência do amido na formação do C18:1 *trans*-

10 foi independente das diminuições de pH que ocorrem durante a fermentação do amido, mostrando haver inconsistência nos resultados.

Troegeler-Meynadier et al. (2014) em um estudo onde foram analisados, independentemente, *in vitro*, os efeitos do substrato de fermentação (feno vs. amido de milho) e do pH do tampão (6,0 vs. 7,0) na bio-hidrogenação do C18:2n-6 do óleo de semente de uva, com foco em suas vias de produção de isômeros *trans*-11 e *trans*-10, utilizando incubações com líquido ruminal com 6 horas de duração. Neste estudo, foi evidenciado que, o pH do tampão, dentro dos limites fisiológicos, teve efeitos menores do que o substrato de fermentação. O substrato composto de feno, foi responsável pelo maior acúmulo de isômeros *trans*-11, pois a fibra atuou principalmente como um substrato para o crescimento de bactérias produtoras deste tipo de isômeros. Por outro lado, o baixo pH resultou numa diminuição da produção de isômeros *trans*-11 e numa produção ligeiramente aumentada de isômeros *trans*-10, provavelmente devido a uma modulação da atividade enzimática ou bacteriana.

Qiu et al. (2004) relataram que o baixo pH ruminal pode afetar as populações microbianas, especialmente as bactérias celulolíticas. O número total de bactérias celulolíticas é reduzido, acompanhado de redução da bio-hidrogenação quando o pH é baixo. O pH do rúmen também influenciou o crescimento e o metabolismo dos fungos. A cultura de fungos ruminais a pH 6,0 e pH 7,0 retardou a bio-hidrogenação em comparação com pH 6,5. A produção de CLA foi aumentada a pH 7,0 em comparação com pH 6,0 e pH 6,5. Portanto, o pH ótimo foi de 6,5 e 7,0 para a bio-hidrogenação e produção de CLA, respectivamente, por fungos ruminais (Nam & Garnsworthy, 2007).

Relatos mostram que os fatores que afetam a bio-hidrogenação ruminal seriam capazes de modular o conteúdo de CLA no leite e carne, sendo o pH ruminal, a fonte e a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados responsáveis por afetar quantitativamente a bio-hidrogenação e a formação dos intermediários (Griinari & Bauman, 1999; Beam et al., 2000). Entender como estes fatores atuam sobre a formação do perfil de ácidos graxos intermediários da bio-hidrogenação é central para a formulação de dietas e ou suplementos, permitindo realizar mudanças estratégicas no conteúdo de ácidos graxos que compõem a gordura do leite e carne de ruminantes. Vários trabalhos tem considerado o efeito da nutrição sobre as alterações no pH do rúmen e, por sua vez, modificação nas rotas da bio-hidrogenação para formação dos isômeros CLA *cis*-9, *trans*-11 e CLA *trans*-10, *cis*-12, entretanto, até o presente momento, não se tem conhecimento de algum trabalho englobando a identificação e quantificação dos demais isômeros intermediários bem como a taxa e eficiência da bio-hidrogenação do C18:2n-6 em função da promoção de alterações no pH do meio de fermentação e nos níveis inclusão deste ácido graxo.

2.5 Determinação dos intermediários da bio-hidrogenação do C18:2n-6

A análise dos intermediários da bio-hidrogenação do C18:2n-6, sobretudo o CLA em amostras de digesta, depende de métodos confiáveis para a extração de lipídios e a preparação de derivados de ácidos graxos. Os ácidos graxos conjugados são susceptíveis à isomerização e podem desaparecer durante a exposição prolongada a catalisadores ácidos (Shingfield et al., 2003).

Nestas condições, existe também o risco de que os produtos conjugados sejam formados a partir de fontes endógenas durante a metilação. A transesterificação catalisada por meio alcalino é o método mais preciso para determinar a composição de CLA em amostras biológicas (Lee et al., 2003). No entanto, os ácidos graxos não-esterificados não são metilados nestas condições. Virtualmente todo o CLA que sai do rúmen não é esterificado (Halmemies-Beauchet-Filleau et al., 2013) e, portanto, este catalisador é ineficaz para a análise da composição de ácidos graxos em amostras de digesta. A isomerização e a produção de artefatos com catalisadores à base de ácido podem ser minimizadas usando temperaturas mais baixas durante a metilação, mas nestas condições a metilação dos fosfolipídios é incompleta (Yurawecz et al., 1999). O preparo de ésteres metílicos de ácidos graxos usando ácido sulfúrico metanólico (Shingfield et al., 2003; Kramer & Zhou, 2001), diazometano seguido de metóxido de sódio ou ácido metanólico sulfúrico seguido de metóxido de sódio, evitando a isomerização ou a síntese de derivados metóxi-alílicos.

A determinação da distribuição relativa e da abundância de isômeros CLA específicos também requer o uso de colunas longas de capilares de alta polaridade (≥ 100 m) na análise por cromatografia gasosa (CG), em combinação com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com íons de prata. Na análise, o CLA *cis*-9, *trans*-11 pode coeluir com o mesmo tempo de retenção que o CLA *trans*-8, *cis*-10 e o CLA *trans*-7, *cis*-9. O pico do CLA *trans*-11, *cis*-13 pode conter quantidades menores de CLA *cis*-9, *cis*-11, enquanto os isômeros *trans-trans* com ligações duplas entre os carbonos 7,9 e 10,12 podem coeluir tipicamente como um único pico. A ocorrência do ácido C21:0 também complica a determinação de CLA por GC. Dependendo da coluna de GC utilizada e do programa de temperatura aplicado, o C21:0 coelui-se em qualquer posição entre o CLA *cis*-11, *trans*-13 e o CLA *cis*-10, *cis*-12 e pode, portanto, ser erroneamente identificado como um isômero (Kramer et al., 2004).

2.6 Isômeros CLA e a saúde humana

Há evidências crescentes de que a nutrição desempenha um papel importante no desenvolvimento de doenças crônicas humanas, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, resistência à insulina e obesidade. O desenvolvimento de alimentos e dietas que promovem a saúde humana é central para as iniciativas de saúde pública voltadas à prevenção de doenças crônicas e, assim diminuir o impacto econômico e social destas doenças (Shingfield & Wallace, 2014). Os custos diretos e indiretos com as doenças cardiovasculares foram estimados em US\$ 445 bilhões nos Estados Unidos e € 200 bilhões na União Europeia. Os custos globais com as doenças cardiovasculares em 2010 totalizaram US\$ 863 bilhões. Esses custos deverão aumentar várias vezes até 2030, atingindo níveis insustentáveis devido ao envelhecimento da população e ao rápido aumento da obesidade nos países desenvolvidos e em desenvolvimento (Shingfield & Wallace, 2014).

Após a identificação das propriedades anti-mutagênicas de isômeros de ácido linoleico conjugado (CLA) na carne cozida (Pariza et al., 1979), numerosos estudos investigaram a atividade biológica de isômeros CLA em

cultura celular e em modelos animais. Grande parte da pesquisa se concentrou nos efeitos do CLA *cis*-9, *trans*-11 ou do CLA *trans*-10, *cis*-12. Além da inibição da mutagênese, tem sido demonstrado que os isômeros específicos do CLA modulam o metabolismo energético, a imunidade, a inflamação, a resistência à insulina e o metabolismo ósseo em vários modelos animais (Jahreis et al., 2000). No entanto, evidências de que os efeitos fisiológicos descritos *in vitro* são reproduzidas em seres humanos permanece inconclusiva (Dilzer & Park, 2012).

A ingestão ótima de um ou mais isômeros de CLA, por humanos continua não estabelecida. A extrapolação de dados provenientes de estudos no modelo de carcinogênese (rato), implica a ingestão do isômero de CLA *cis*-9, *trans*-11 entre 95 e 3500 mg por dia, para diminuir significativamente o risco de câncer em populações humanas (Collomb et al., 2006). Os isômeros de CLA estão presentes em uma grande variedade de alimentos, incluindo leite, carne de ruminantes e, em muito menor proporção, na carne suína, de aves, peixes e ovos (Fritsche & Steinhart, 1998; Lawson et al., 2001). O leite e os produtos lácteos são as principais fontes de CLA na dieta humana, contribuindo entre 66 e 80% da ingestão total (Lawson et al., 2001; Jutzeler van Wijlen & Colombani, 2010).

O consumo de CLA pela população humana pode ser aumentado utilizando suplementos orais ou fortificação de alimentos com fontes sintéticas, que tipicamente contêm quantidades iguais dos isômeros de CLA *cis*-9, *trans*-11 e CLA *trans*-10, *cis*-12 ou, de um maior consumo de alimentos derivados de ruminantes. Em contraste com as fontes sintéticas, a carne e o leite de ruminantes contêm numerosos isômeros posicionais e geométricos de CLA com ligações duplas conjugadas nas posições 6,8 até 13,15, sendo CLA *cis*-9, *trans*-11 o isômero principal e, o CLA *trans*-7, *cis*-9 ou o CLA *trans*-11, *cis*-13 como o segundo mais abundante (Schmid et al., 2006; Shingfield et al., 2013).

Produzir alimentos derivados de ruminantes que contenham maiores quantidades de CLA, oferece a oportunidade de aumentar o consumo destes isômeros geométricos posicionais do ácido linoleico, principalmente CLA *cis*-9, *trans*-11, sem necessidade de grandes mudanças na dieta habitual ou nos hábitos alimentares. Por esta razão, uma quantidade considerável de pesquisas tem sido dedicada à compreensão dos fatores nutricionais, fisiológicos e genéticos que influenciam as concentrações de CLA na carne e no leite. Nesse sentido, busca-se evidência comprobatórias sobre os fatores que influenciam a biossíntese de isômeros CLA em ruminantes.

3 HIPÓTESE

A modificação do meio de fermentação ruminal *in vitro*, bem como a quantidade de ácido graxo incubada e o tempo de incubação, influenciam a formação do perfil de ácidos graxos intermediários do C18:2n-6, as taxas e as eficiências médias das reações de bio-hidrogenação.

4 OBJETIVO GERAL

O trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da interação entre pH (5,4; 6,2 e 7,0), níveis de Inclusão de C18:2n-6 puro (30 mg e 45 mg) e tempos de incubação (0,5h, 3h, 6h, 12h, 24h) na modulação da bio-hidrogenação ruminal com ênfase na taxa e eficiência das três reações da bio-hidrogenação (isomerização do C18:2n-6 a CLA, redução de CLA a C18:1 *trans* e redução de C18:1 *trans* a C18:0) e na formação de intermediários do processo.

CAPÍTULO II
EFEITOS DO pH E DOS NÍVEIS DE ÁCIDO LINOLEICO (C18:2 *cis*-9, *cis*-12)
SOBRE A FORMAÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS DA BIO-HIDROGENAÇÃO
RUMINAL: UM ESTUDO *IN VITRO*¹

¹Artigo elaborado conforme as normas da revista Animal Feed Science and Technology (Apêndice 1)

Efeito do pH e dos níveis de ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) sobre a formação de intermediários da bio-hidrogenação ruminal: um estudo *in vitro*

L.A. Ritt^{a*}, E.R. Prates^a, J.L. Nörnberg^b, D.P. Vargas^c, E. Ticiani^a, M.M. Vieira^a

^a Departamento de Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90540-000, Brasil

^b Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil

^c Departamento de Medicina Veterinária, Universidade do Oeste de Santa Catarina, São Miguel do Oeste, SC 89900-000, Brasil.

*Correspondência do autor:

Endereço de e-mail: lucianorittzoot@gmail.com (L.A. Ritt)

HIGHLIGHTS

- Três faixas de pH, dois níveis de inclusão de ácido linoleico e cinco tempos de duração de incubação foram estudados
- Todos os fatores estudados tiveram capacidade de modular a bio-hidrogenação de ácidos graxos *in vitro*
- pH próximo a neutralidade, aliado a inclusão de aproximadamente 6% de C18:2n-6 na MS do substrato, levaram a maior acúmulo de produtos da bio-hidrogenação

- Nenhum dos pHs estudados, foi capaz de alterar a via *trans*-11 para *trans*-10 da bio-hidrogenação

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da interação entre pH (5,4; 6,2 e 7,0), níveis de Inclusão de C18:2n-6 puro (30 mg e 45 mg) e tempos de incubação (0,5h, 3h, 6h, 12h, 24h) na modulação da bio-hidrogenação ruminal com ênfase na taxa e eficiência das três reações da bio-hidrogenação (isomerização do C18:2n-6 a CLA, redução de CLA a C18:1 *trans* e redução de C18:1 *trans* a C18:0) e na formação de intermediários do processo. Como substrato, se utilizou uma ração sintética livre de lipídios e, a ela se adicionou o C18:2n-6 puro. Os conteúdos das incubações foram congelados, liofilizados e o perfil lipídico analisado por cromatografia gasosa. Houve interação ($P < 0,05$) dupla e tripla para a grande maioria dos ácidos graxos. A maior inclusão de C18:2n-6 em pHs elevados, causou maiores acúmulos de CLA, o qual atuou como inibidor da isomerização do C18:2n-6, também da primeira e segunda reduções, uma vez que foi observado menor acúmulo dos intermediários relativos a estas etapas da bio-hidrogenação. Observou-se maiores acúmulos de isômeros CLA em menores tempos de incubação. Na análise multivariada dos dados, foi possível observar o comportamento das combinações entre pH*NL*Tempo, onde a combinação NL4-pHA-T24 foi responsável pelos maiores acúmulos de intermediários da bio-hidrogenação do C18:2n-6.

Palavras-chave: C18:2n-6, eficiência, taxa, tempo de duração, incubação, CLA, fluído ruminal

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the interaction between pH (5.4, 6.2 and 7.0), levels of C18:2n-6 pure (30 mg and 45 mg) and incubation times (0,5h, 3h, 6h, 12h, 24h) in the modulation of ruminal biohydrogenation with emphasis on the rate and efficiency of the three reactions of biohydrogenation (isomerization of C18:2n-6 to CLA, reduction of CLA to C18:1 *trans* and Reduction of C18:1 *trans* to C18:0) and in the formation of process intermediates. As substrate, a lipid-free synthetic feed was used and pure C18:2n-6 was added thereto. The contents of the incubations were frozen, lyophilized and the lipid profile analyzed by gas chromatography. There was a double and triple interaction ($P < 0.05$) for the great majority of fatty acids. The higher inclusion of C18:2n-6 in high pHs caused higher accumulations of CLA, which acted as inhibitor of the C18:2n-6 isomerization, also of the first and second reductions, since less accumulation of the relative intermediates To these stages of biohydrogenation. Greater accumulations of CLA isomers were observed in shorter incubation times. In the multivariate analysis of the data, it was possible to observe the behavior of the combinations between pH*NL*Tempo, where the NL4-pHA-T24 combination was responsible for the greater accumulations of C18:2n-6 biohydrogenation intermediates.

Keywords: C18: 2n-6, efficiency, rate, duration, incubation, CLA, ruminal fluid

Abreviações: BH, bio-hidrogenação; CLA, ácido linoleico conjugado; C18:2n-6, ácido linoleico; MS, matéria seca; FDN, fibra em detergente neutro; FDA, fibra em detergente ácido; CNF, carboidratos não-fibrosos; EE, extrato etéreo; PB, proteína bruta; PC, peso corporal; NL, nível de inclusão do ácido linoleico; T, duração da incubação em horas; pHB, pH baixo; pHM, pH médio; pHA, pH alto; v1, taxa de isomerização do C18:2n-6; E1, eficiência da isomerização do C18:2n-6; v2, taxa da redução de CLA a C18:1 *trans*; E2, eficiência da redução de CLA a C18:1 *trans*; v3, taxa da redução de C18:1 *trans* a C18:0; E2, eficiência da redução de C18:1 *trans* a C18:0; CG, cromatografia gasosa; FID, detector de ionização em chama.

1. Introdução

Caracterizar a formação de metabólitos intermediários da bio-hidrogenação ruminal é importante no que diz respeito à compreensão das origens metabólicas dos ácidos graxos *trans* em produtos derivados de ruminantes e também os mecanismos de respostas fisiológicas aos lipídios na dieta de ruminantes. Ao entrar no rúmen, os lipídios provenientes da dieta são expostos a lipases microbianas e os ácidos graxos não-esterificados liberados estão sujeitos a sofrer bio-hidrogenação. As bactérias são consideradas as principais responsáveis pelo processo, mas poucas cepas capazes de realizar bio-hidrogenação foram identificadas (Harfoot & Hazlewood, 1988; Lourenço et al., 2010). Numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* têm permitido a elucidação das principais vias de bio-hidrogenação do ácido linoleico (C18:2n-6) no rúmen (Harfoot & Hazlewood, 1988), mas a informação sobre outros metabólitos é limitada (Troegeler-Meynadier et al., 2003; Jouany et al., 2007; Wallace et al., 2007).

Os ácidos linoleicos conjugados (CLA) referem-se a uma série de isômeros posicionais e geométricos do C18:2n-6, podendo apresentar ligações duplas nas posições 7 e 9, 8 e 10, 9 e 11, 10 e 12 e, 11 e 13. Atualmente, há um interesse crescente em como estes vários isômeros de CLA causam seus impactos biológicos.

Uma pequena parte do CLA nos produtos derivados de ruminantes provem diretamente do CLA ruminal, mas o CLA majoritário do leite (CLA-*cis*-9, *trans*-11) é sintetizado na glândula mamária por dessaturação do C18:1 *trans*-11 (Griinari et al., 2000), que é o principal C18:1-*trans* produzido pela bio-

hidrogenação do C18:2n-6. Qualquer que seja a origem do CLA nos produtos, os fatores que afetam o processo de bio-hidrogenação poderiam modular o conteúdo de CLA. Sabe-se que o pH ruminal, bem como a fonte e a quantidade de ácidos graxos polinsaturados afetam quantitativamente a bio-hidrogenação (Van Nevel e Demeyer, 1996; Griinari e Bauman, 1999; Martin e Jenkins, 2002). Do ponto de vista qualitativo, Griinari et al. (1998) notaram que as condições ácidas no rúmen aumentam C18:1 *trans*-10. No entanto, os efeitos do pH, da quantidade de C18:2n-6, dos tempos de fermentação e as interações destes fatores sobre os intermediários da bio-hidrogenação, têm sido pouco estudados.

O objetivo deste estudo foi identificar a capacidade de fatores em modular a bio-hidrogenação e assim a produção de intermediários, utilizando-se um sistema de incubações *in vitro*, combinando diferentes faixas de pH do meio de fermentação, níveis de inclusão de C18:2n-6 puro e tempos de incubação, além de verificar a ação destes fatores sobre a taxa e a eficiência das três reações da BH (isomerização do C18:2n-6 a CLA, redução de CLA a C18:1 *trans* e redução de C18:1 *trans* a C18:0).

2. Material e métodos

2.1. Incubações *in vitro*

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 3x2x5 (3 faixas de pH x 2 níveis de inclusão de C18:2n-6 x 5 tempos de incubação). O líquido ruminal foi coletado de três ovinos machos castrados da raça Santa Inês ($67,0 \pm 6,53$ kg de peso corporal (PC)), pertencente Laboratório de Bromatologia e Nutrição de Ruminantes, do Departamento de

Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria. Os animais foram alimentados com feno de Alfafa (*Medicago sativa*) fornecido *ad libitum* e concentrado comercial, fornecido duas vezes ao dia (às 8:00 e às 17:00 horas).

O substrato de incubação consistiu de um alimento sintético constituído de celulose, amido e caseína, representando 41,0%, 41,0% e 18,0%, respectivamente, o qual não apresentava lipídios em sua composição. Aproximadamente 500mg de substrato foi adicionado a cada tubo de fermentação. Aos tubos contendo substrato, se adicionou 30 e 45 mg (NL 30 e NL 45, respectivamente) de C18:2n-6 puro, como única fonte de lipídios. O C18:2n-6 foi adicionado aos frascos dissolvidos em 500 µL de éter dietílico e o solvente foi evaporado a 39° C sob uma corrente de N₂ gasoso.

A coleta do inóculo foi realizada uma hora após a alimentação da manhã. Pela abertura da tampa da cânula e com auxílio de bomba de vácuo de baixa potência, foi retirado aproximadamente 500 mL de líquido ruminal de cada animal, misturados e, condicionados em garrafa térmica a 39° saturada com CO₂. Após, o inóculo, foi coado e diluído com solução tampão de McDougall (McDougall, 1948), contendo: 0,570 g/L de KCl, 0,470 g/L de NaCl, 0,120 g/L de MgSO₄ · 7H₂O, 0,040 g/L de CaCl₂, 9,80 g/L de NaHCO₃ e 9,30 g/L de Na₂HPO₄ · 12H₂O numa proporção de 1:4 (líquido ruminal:solução tampão, v/v), sob fluxo de CO₂ constante. Após a mistura, os níveis de pH baixo (pHB: 5,4), pH médio (pHM: 6,2) e pH alto (pHA: 7,0), foram ajustados adicionando-se HCl a 5 N diretamente à solução tampão, imediatamente antes da incubação.

Sob fluxo de CO₂, cinquenta mililitros do meio de incubação com os diferentes pHs, foram adicionados aos tubos contendo substrato e o C18:2n-6.

Os tubos foram fechados com tampas de borracha butílica adaptada com válvula de busen para liberação de gases de fermentação e incubados durante 0,5, 3, 6, 12 e 24 horas em incubadora de bancada. Para cada faixa de pH e nível de inclusão de C18:2n-6, quatro tubos tiveram a fermentação encerrada imediatamente após seu fechamento (tempo zero), para ser descontado o perfil lipídico dos microrganismos.

No final de cada tempo designado, as incubações foram interrompidas colocando os frascos em água gelada e o pH do conteúdo do frasco foi medido. O conteúdo de cada tubo foi transferido para um frasco com tampa e congelado (-80°C), (Thermo Scientific 900 series, USA), liofilizados (Terroni LS300, São Carlos, São Paulo, Brasil) e armazenado a -20°C até a determinação do perfil de ácidos graxos. Para cada faixa de pH, nível de inclusão de C18:2n-6 e tempo de incubação, foram realizadas quatro repetições.

2.2. Análise do perfil de ácidos graxos:

A análise do perfil lipídico foi realizada no Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais – NIDAL, pertencente ao Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria. Para determinar o perfil lipídico, as amostras liofilizadas foram submetidas a transesterificação em ésteres metílicos de ácidos graxos seguindo a metodologia de Jenkins (2010). De forma resumida, esta metodologia adiciona 1 mL de tolueno e 1 mL de padrão interno (C19:0 em tolueno, 1 mg/mL) a cerca de 250 mg de amostra liofilizada. Após, foram adicionados 2 mL de metóxido de sódio em metanol a 0,5 M, então homogeneizada em vórtex de bancada e posta em banho-maria a 50°C para reagir durante por cerca de 10 minutos. Após

arrefecimento até à temperatura ambiente adicionou-se 3 mL de solução de HCl a 10% em metanol, em seguida colocada para reagir em banho-maria a 80°C durante 15 minutos. Uma vez arrefecida, carbonato de potássio aquoso a 6% foi adicionado em duas porções de 2 mL para evitar excessiva efervescência, seguido da adição de 2 mL de hexano. A solução foi então agitada em vórtex, centrifugada e se fez a transferência da camada orgânica para outro tubo, sendo esse passo repetido por mais duas vezes. A solução final foi seca sobre sulfato de sódio anidro e, após centrifugação, o solvente foi recolhido para um outro tubo e evaporado sob fluxo de N₂ a 39°C. O resíduo, então foi dissolvido em 1 mL de hexano (grau GC).

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa (modelo 6890, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA), equipado com um detector de ionização em chama (GC-FID) e uma coluna capilar SP-2560 (100m; 0,25mm i.d.; espessura de filme 0,20 µm; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EUA). As temperaturas do injetor e do detector foram 250°C e 280°C, respectivamente. A rampa de temperatura iniciou com 100°C, mantida por 1 minuto, então aumentada a 50°C/minuto até 150°C e mantida durante 20 minutos, então aumentada a 1°C/minuto até 190°C e mantida durante 5 minutos, e em seguida aumentada a 1°C/minuto até 200°C e mantida durante 35 minutos. Como gás de arraste, utilizou-se nitrogênio, a uma vazão de 1 mL/minuto e, um microlitro de amostra foi injetada. A razão de separação usada para a análise dos ésteres metílicos foi de 1:10.

A identificação dos ésteres metílicos foi realizada por comparação com a ordem de eluição de acordo com outros trabalhos (Alves et al., 2013) e

confirmados pela comparação dos picos com os de padrões autênticos do éster metílico do ácido vacênico (18:1n7-*t*11) (46905-U, *trans*-11-octadecenoic methyl ester), com mistura dos isômeros do éster metílico do ácido rumênico (CLA, 18:2n7-*c*9,*t*11) e ácido *t*10,*c*12-octadecadienoico (CLA, 18:2n6-*t*10,*c*12) (O5632, Linoleic acid, conjugated methyl ester).

2.3. Cálculos

Os balanços de cada ácido graxo intermediário (expresso em mg/g MS) foram calculados através da subtração da quantidade após a incubação (quantidade final) a quantidade inicial, calculada como a quantidade nos frascos não incubados (tempo zero) mais as doses (30 e 45 mg) de C18:2n-6. Valores negativos representaram o desaparecimento de ácidos graxos e, valores positivos, o acúmulo.

As taxas médias (expressas em mg/L/h) e as eficiências médias de isomerização do C18:2n-6 (v_1 e E_1 , respectivamente), da redução de CLA (v_2 e E_2 , respectivamente) e da redução de 18:1-*trans* (v_3 e E_3 , respectivamente), foram calculadas como descrito por Troegeler-Meynadier et al. (2006):

$$v_1 = [(C18:2n-6)_i - (C18:2n-6)_f] / \Delta t,$$

$$E_1 = [(C18:2n-6)_i - (C18:2n-6)_f] / [(C18:2n-6)_i]$$

Onde (C18: 2n-6)_i e (C 18: 2n-6)_f representam a concentração de C18: 2n-6 no início e no final do período de incubação Δt , respectivamente.

$$v_2 = [(C18:2n-6)_i - (C18:2n-6)_f + (CLA)_i - (CLA)_f] / \Delta t,$$

$$E_2 = [(C18:2n-6)_i - (C18:2n-6)_f + (CLA)_i - (CLA)_f] / [(C18:2n-6)_i - (C18:2n-6)_f + (CLA)_i]$$

Onde (CLA)_i e (CLA)_f representam a concentração de CLA no início e no final do período de incubação Δt , respectivamente.

$$v3 = [(C18:2n-6)_i - (C18:2n-6)_f + (CLA)_i - (CLA)_f + (C18:1-trans)_i - (C18:1-trans)_f] / \Delta t,$$

$$E3 = [(C18:2n-6)_i - (C18:2n-6)_f + (CLA)_i - (CLA)_f + (C18:1-trans)_i - (C18:1-trans)_f] / [(C18:2n-6)_i - (C18:2n-6)_f + (CLA)_i - (CLA)_f + (C18:1-trans)_i]$$

Onde (C18:1-*trans*)_i e (C18:1-*trans*)_f representada a concentração de C18:1-*trans* no início e no final do período de incubação Δt , respectivamente

2.4. Análise estatística

Os resultados foram analisados em delineamento inteiramente casualizado, com medida repetida no tempo, utilizando o procedimento MIXED e empregando estrutura paramétrica especial nas matrizes de (co)variância, onde as testadas foram: AR (1), auto regressiva de primeira ordem, VC, componentes de variância; CS, simetria composta; ARH(1), auto regressiva heterogênea de primeira ordem; ARMA(1,1), média móvel auto regressiva de primeira ordem e; TOEP, Toeplitz. As medidas foram estimadas com o comando LSMEANS (Least Squares Means).

No conjunto original das variáveis que representam os ácidos graxos resultantes da bio-hidrogenação ruminal, procedeu-se a análise de variância multivariada pelo procedimento GLM e o comando MANOVA, onde foi realizado o teste de Wilks, para testar a hipótese de que os vetores de médias das distintas combinações entre pH, níveis de linoleico e tempos de incubação fossem nulos.

Após, foi utilizada a análise de componentes principais (Principal component analysis – PCA), seguida da análise de agrupamento (Cluster

analysis), utilizando o algoritmo hierárquico aglomerativo de Ward como método de agrupamento e a distância euclidiana quadrática como medida de dissimilaridade.

As análises estatísticas foram executadas no aplicativo SAS[®] System for Windows[™] versão 9.0 (SAS Institute Inc., Cary - NC, USA).

3. Resultados

3.1. Desaparecimento do C18:2n-6

Em relação ao desaparecimento do C18:2n-6 (Figura 2), houve interação ($P < 0,0001$) entre NL e T. Observa-se uma maior desaparecimento no nível de inclusão de 45 mg, bem como um aumento gradativo com os maiores tempos de incubação. Houve interação ($P = 0,0002$) entre o NL e pH, para o desaparecimento do C18:2n-6, onde no NL mais elevado ocorreram as maiores taxas de desaparecimento. Além disso, os maiores desaparecimentos foram observadas no pH_A, em relação ao pH_M e pH_B. Para esta mesma variável houve interação ($P < 0,0001$) entre T e pH. Neste sentido, observa-se que no pH_B, houve taxa de desaparecimento crescente, acompanhando os tempos de incubação. No pH_M e pH_A, observou-se um decréscimo na taxa de desaparecimento após 6 horas de incubação.

3.2. Produção de CLA

De forma isolada, o isômero de CLA mais abundantemente encontrado em todos os tratamentos testados (isto é, T, NL e pH) foi o *cis*-9, *trans*-11, seguido pelo *trans*-10, *cis* 12 (Figura 3). Na formação do CLA-*cis*-9, *trans*-11, houve interação ($P = 0,0004$) entre os três fatores estudados. No NL mais

elevado, encontram-se os maiores acúmulos deste isômero, da mesma forma que a quantidades do isômero são maiores nas faixas de pHM e pHA, respectivamente. Em média, o acúmulo deste isômero foi maior, tanto no NL de 30 e 45 mg, quanto no pHM e pHA após 6 horas de incubação. Entretanto, no pHB, em ambos NL, a quantidade do isômero aumentou no decorrer do tempo, chegando ao maior acúmulo após de 24 horas de incubação.

O segundo isômero de CLA mais abundante, foi o *trans*-10, *cis*-12. Houve interação entre todos fatores estudados ($P=0,0085$). De forma geral, observa-se que o CLA-*cis*-10, *trans*-12 teve maior acúmulo no pHM, pHA e pHB, respectivamente, em ambos NL em todos os T de incubação, sendo os maiores acúmulos observados no T 24 de incubação. Uma considerável quantidade de mistura de isômeros *trans-trans* (*trans*-9, *trans*-11+*trans*-10, *trans*-12+*trans*-11, *trans*-13) foi encontrada (Figura 3). O acúmulo foi maior no NL e pH mais elevados (45 mg e pHA, respectivamente), sendo a máxima quantidade acumulada observada no T 24 horas. Alguns outros isômeros em quantidades menos expressivas também foram encontrados, tais como *cis*-9, *cis*-11; *cis*-10, *cis*-12 e, uma mistura de isômeros *trans-cis* e *cis-trans* (*cis*-10, *trans*-12+*trans*-9, *cis*-11+*cis*-11, *trans*-13) (Figura 3).

3.3. Produção e acúmulo de intermediários isômeros C18:1

O desaparecimento do C18:2n-6 nos meios de incubação foi associado com a elevação das quantidades de todos os isômeros de CLA e de C18:1, como uma representação normal do metabolismo lipídico no rúmen, aqui representado pelo ensaio *in vitro*. Entretanto, os isômeros C18:1 *trans*-6/*trans*-7/*trans*-8, C18:1 *trans*-9, C18:1 *trans*-12 e C18:1 *trans*-16 (Tabela 1) e, os C18:1 *cis*-9, C18:1 *cis*-

11, C18:1 *cis*-12 e C18:1 *cis*-13 (Tabela 2), sofreram poucas alterações em relação às suas quantidades ao longo dos períodos de incubação.

A produção do isômero 18:1 *trans*-10 (Tabela 1) foi influenciada por todos os fatores estudados ($P < 0,0001$). No NL 30 mg, em geral, houve maior acúmulo desse isômero, se comparado ao NL mais alto. No pHA observa-se os maiores acúmulos, sendo que estes atingem o pico no T 24 horas. O mesmo comportamento pode ser observado no acúmulo do isômero 18:1 *trans*-11 (Tabela 1), na qual houve interação entre todos os fatores estudados ($P < 0,0001$). Observa-se que, a partir do T 3 horas, o NL 30 mg apresenta o maior acúmulo deste isômero, quando comparado com o NL 45 mg e, que o pHA, independente do NL, apresenta as maiores quantidades acumuladas, as quais tem seu pico no T 24 horas de incubação.

3.4. Acúmulo de C18:0

Na Figura 5, estão apresentadas as médias de acúmulo do ácido esteárico. A produção de C18:0 foi influenciada pela interação de todos os fatores estudados ($P < 0,0001$). Observa-se que no NL 45 mg, houve maior quantidade deste ácido graxo acumulada, exceto no pHA, onde o NL 30 mg resultou num maior acúmulo a partir do T 6 horas.

3.5. Etapas da BH do C18:2n-6

Os parâmetros relacionados com as etapas da bio-hidrogenação foram fortemente afetados pelos fatores estudados (Figura 5). A taxa e a eficiência média na isomerização do C18:2n-6 foram modificadas pela interação entre todos os fatores. A taxa média ($P < 0,0001$) foi mais elevada no NL 45 mg, sendo também maior no pHA em todos os T de incubação. A eficiência média da

primeira etapa da BH também foi afetada significativamente ($P=0,0073$). Observa-se interação entre os fatores, entretanto, as maiores eficiências médias são observadas no NL 30 mg. A taxa e a eficiência médias da primeira e da segunda redução foram influenciadas pelos fatores estudados. A primeira redução foi afetada pela interação dos três fatores utilizados ($P<0,0001$ e $P<0,0021$, respectivamente), sendo que os maiores valores encontrados para ambos parâmetros foram no NL 45 mg e relação ao NL 30 mg e, o mesmo se observa em relação ao nível de pH, onde pHA foi superior aos demais em todos os T analisados. Na segunda redução, observa-se que a taxa média sofreu influência pela interação de todos os fatores ($P<0,0001$), enquanto que a eficiência média foi afetada pela interação isolada entre os fatores, isto é, NL*T ($P<0,0001$) e pH*T ($P<0,0001$), porém as variáveis apresentaram o mesmo comportamento observado na taxa média, onde os maiores valores foram encontrados no NL 45 mg em combinação com o pHA em relação ao nível de inclusão inferior e às demais faixas de pH, em todos os T de incubação estudados.

3.6. Componentes principais dos produtos da BH majoritários

Aplicando-se a análise de variância multivariada, se verificou diferença significativa entre os vetores de médias, para as diferentes combinações dos fatores estudados, pelo teste de Lipkovich e Smith. Os três primeiros autovalores foram significativos pelo teste da razão de verossimilhança; o primeiro autovalor explicou 64,98% (CP1), e o segundo, 22,80% (CP2), ou seja, os dois primeiros autovalores explicaram 87,78% da variação total dos dados relacionados aos principais AG intermediários da BH do C18:2n-6 (Figura 6). Portanto, a análise

de componentes principais permite visualizar a similaridade e dissimilaridade entre as diferentes combinações dos fatores estudados. As variáveis 18:2n-6 ($p>0,05$), C18:1 *trans*-10 ($P<,0001$), C18:1 *trans*-11 ($P<0,0001$), CLA *cis*-9, *trans*-11 ($P=0,0007$), CLA *trans*-10, *cis*-12 ($P=0,0085$) e 18:0 ($P<0,0001$) explicaram a variabilidade do CP1 (componente principal 1), ao passo que a variável 18:2n-6 ($p>0,05$), C18:1 *trans*-10 ($P<,0001$), CLA *cis*-9, *trans*-11 ($P=0,0007$) e C18:0 ($P<0,0001$) explicaram a variabilidade do CP2 (Figura 6).

4. Discussão

4.1. Desaparecimento do C18:2n-6

O metabolismo completo do C18:2n-6 a ácido esteárico (C18:0), não se trata de uma reação de etapa única, mas sim de complexas rotas no rúmen (Kepler et al., 1966; Xu et al., 2008). Como já mencionado, o desaparecimento do ácido linoleico foi afetado pela interação dupla dos fatores estudados. O NL interagiu com o T de incubação, onde os maiores desaparecimentos foram observados no maior nível de inclusão às 6 horas, quando comparados aos demais tempos. Troegeler-Meynadier et al. (2006), observaram a ocorrência de uma redução na isomerização do ácido linoleico, devido a uma inibição pelos produtos da bio-hidrogenação, cujas concentrações aumentaram com os tempos de incubação e, não pela concentração de C18:2n-6, a qual diminuiu com o tempo. Beam et al. (2000) demonstraram que o aumento de C18:2n-6 não conduz a uma saturação da isomerase, sendo que a concentração máxima de C18:2n-6 foi semelhante a do presente ensaio (200 mg em 200 ml vs. 45 mg em 50 ml). O desaparecimento do C18:2n-6 também sofreu influência da interação

entre o NL e o pH, onde observam-se que as maiores quantidades desapareceram em condições de pH mais elevado e no maior nível de inclusão do ácido linoleico.

Uma proteção da bio-hidrogenação por um pH baixo poderia primeiramente ser explicada por uma inibição da lipólise, à medida que o crescimento das principais bactérias lipolíticas, como a *Anaerovibrio lipolytica*, mostrou ser diminuído em pH baixo (Fuentes et al., 2011). No entanto, estes autores observaram que somente a lipólise foi afetada pelo pH baixo, ao invés de uma forte redução na bio-hidrogenação. No presente estudo, o pH baixo foi associado a uma inibição na isomerização do C18:2n-6. Conforme relatado anteriormente, uma vez que, o nível de inclusão do ácido linoleico não causou efeitos de toxicidade sobre a isomerização, a redução no pH do meio de incubação resultou num menor desaparecimento do ácido linoleico devido uma redução na isomerização, corroborando com o estudo de Troegeler-Meynadier et al. (2006), onde estes autores constataram que faixas de pH abaixo de 6,0, podem inibir a isomerização. A interação entre o T de incubação e o pH também afetou o desaparecimento do C18:2n-6, sendo as maiores médias de desaparecimento observadas nas faixas de pH mais elevadas e aumentam acompanhando os T de incubação, apresentando maiores desaparecimentos às 24 horas de incubação, exceto pHM no NL30 mg e, no pHM e pHA no NL45 mg que, como relatado anteriormente, apresentaram maiores desaparecimentos com 12, 6 e 6 horas, respectivamente. É provável que o menor desaparecimento em pH baixo, seja devido, como já mencionado, a um efeito da faixa de pH inferior de forma a proteger o C18:2n-6 da isomerização, resultando no

desaparecimento mais lento e gradual nestas condições de meio de incubação, com maiores acúmulos observados no T 24 horas. Enquanto que, em faixas de pH mais elevadas, os maiores desaparecimentos são observados em tempos de incubação inferiores, fato que pode ser atribuído a efeitos tóxicos dos produtos da bio-hidrogenação sobre a isomerização, uma vez que a quantidade destes produtos é superior em faixas de pH elevado, em comparação faixas de pH baixo.

4.2. Produção de isômeros CLA

As incubações confirmaram que uma das vias de bio-hidrogenação do C18:2n-6 envolve a formação de CLA-*cis*-9, *trans*-11 e a subsequente redução a C18:1 *trans*-11 e a C18:0, corroborando com os resultados de estudos muito anteriores (Harfoot & Hazlewood, 1988). No entanto, verificou-se que vários isômeros geométricos CLA com duplas ligações $\Delta_{9,11}$; $\Delta_{10,12}$ e $\Delta_{11,13}$ se acumularam, sendo o CLA-*trans*-10, *cis*-12 o outro intermediário conjugado majoritário, consistente com resultados anteriores da bio-hidrogenação do C18:2n-6 pela microbiota ruminal mista ou estirpes puras de microrganismos ruminais (Jouany et al., 2007; Maia et al., 2007; Wallace et al., 2007) e protozoários ruminais (Or-Rashid et al., 2011).

A interação entre NL*pH*T influenciou o acúmulo de CLA-*cis*-9, *trans*-11 (Figura 3). Observa-se que, em ambos níveis de inclusão do C18:2n-6, com o aumento das faixas de pH dos meios de fermentação, os maiores acúmulos são encontrados em menores tempos de incubação, enquanto que, no pH_B, o maior acúmulo deste isômero se deu no maior T de incubação. Além disso, observa-se que a elevação do pH e do nível de inclusão, levam aos maiores acúmulos do

isômero. Choi et al. (2005), Fuentes et al. (2011) e Troegeler-Meynadier et al. (2003, 2006, 2014) também notaram que a produção de isômeros *trans*-11 foi favorecida por um pH elevado. Como a duração da incubação no presente estudo provavelmente não foi suficiente para induzir uma modificação notável da microflora, a menor produção de isômeros *trans*-11 em culturas com baixo pH foi provavelmente devido a uma inibição da Δ -12-isomerase produzidas pela *Butirivibrio fibrisolvens*, cujo pH ótimo está entre 7,0 e 7,2 (Kepler e Tove, 1967). Esta inibição inicia com pH 6,3 (Choi et al., 2005) e se agrava abaixo de pH 6,0 (Troegeler-Meynadier et al., 2006). De fato, observou-se uma grande inibição da produção de isômeros *trans*-11 nas incubações com baixo pH. O acúmulo elevado no NL 45 mg, pode ser atribuído à maior quantidade de substrato disponível para a isomerização, uma vez que, como anteriormente mencionado, este não causa inibição do processo da isomerização da dupla ligação do carbono 12 do ácido linoleico, maximizando a formação do CLA *cis*-9, *trans*-11 e elevando seu acúmulo nestas condições. Entretanto, corroborando com Troegeler-Meynadier et al. (2006), esse rápido acúmulo de produtos, inibe a isomerização do C18:2n-6, assim os maiores acúmulos são observados em tempos de incubação inferiores.

O acúmulo de CLA-*trans*-10, *cis*-12 (Figura 3), foi afetado pela interação entre NL*pH*T (P=0,0085). Independente do nível de inclusão e da faixa de pH do meio de fermentação, os maiores acúmulos foram observados no T 24 horas, sendo que o aumento ocorreu de forma gradativa ao longo dos tempos de incubação. O pHM, parece desempenhar um efeito positivo na produção deste isômeros, uma vez que individualmente, dentro de cada nível de inclusão, os

maiores acúmulos se deram nesta faixa de pH, em todos os tempos de incubação estudados, exceto no NL45, onde o registro mais elevado de acúmulo se deu no pHA, mesmo que o acúmulo tenha sido inferior ao observado na demais faixas de pH nesse nível de inclusão, nos tempos de incubação inferiores. São conhecidas poucas espécies bacterianas capazes de sintetizar CLA-*trans*-10, *cis*-12, a partir do ácido linoleico, tais como o *Propionibacterium acnes* (Verhulst et al., 1987; Devillard et al., 2006) e/ou a *Megasphaera elsdenii* (Kimet al., 2002). Entretanto, o envolvimento de outras bactérias não é descartado (Zened et al., 2011). A hipótese mais provável para explicar o aumento observado de CLA-*trans*-10, *cis*-12 nas condições acima mencionadas, é que a faixa de pH favoreceu um melhor crescimento e/ou atividade das bactérias envolvidas na produção deste isômero. Os resultados deste estudo não corroboram com os encontrados por Choi et al. (2005) que, em um estudo *in vitro*, relataram um aumento significativo no isômero CLA-*trans*-10, *cis*-12 quando o pH diminuiu de 6,6-6,5 para 5,6-5,4. AbuGhazaleh & Jacobson (2007) e Fuentes et al. (2009, 2011) obtiveram, *in vitro*, uma relação de isômeros *trans*-10/*trans*-11 acima de 1, porém a comparação com o presente estudo é difícil, uma vez que em seus experimentos, utilizaram culturas ruminais contínuas ao longo de 10, 8 e 7 dias, respectivamente, a um de pH 5,6. Neste caso, as bactérias produtoras de isômeros *trans*-10 provavelmente tiveram tempo suficiente para se desenvolverem e serem selecionadas pelo baixo pH, o que provavelmente não ocorreu no presente estudo, onde a máxima duração de incubação de 24 horas, o que, provavelmente não foi suficiente para induzir uma modificação notável das abundâncias relativas de bactérias, corroborando com

Troegeler-Meynadier et al. (2014). Como pode ser observado, tanto o CLA-*cis*-9, *trans*-11 como o CLA-*trans*-10, *cis*-12, sofreram reduções no acúmulo à medida que o pH do meio de incubações é inferior a 6,2. O mesmo comportamento foi observado por Hudson et al. (2000) e Proell et al. (2002) em seus trabalhos, onde demonstraram que a diminuição de pH abaixo de 6,0 acarreta redução no acúmulo de ambos isômeros.

Observou-se a ocorrência de outros isômeros conjugados do C18:2n-6 minoritários no presente estudo (CLA-*cis*-9, *cis*-11; CLA-*cis*-10, *cis*-12; CLA-*cis*-10, *trans*-12 + *trans*-9, *cis*-11 + *cis*-11, *trans*-13; CLA-*trans*-9, *trans*-11 + *trans*-10, *trans*-12 + *trans*-11, *trans*-13). Jouany et al. (2007) e Or-Rashid et al. (2011), relataram a ocorrência desses isômeros em seus estudos como sendo produzido pela bio-hidrogenação do ácido linoleico. Entretanto, não há relatos sobre o acúmulo destes isômeros relacionados com os fatores aqui estudados. O CLA-*cis*-9, *cis*-11 e o "pool" (CLA-*cis*-10, *trans*-12 + *trans*-9, *cis*-11 + *cis*-11, *trans*-13) são semelhantes em seu acúmulo. Em ambos casos, o NL interagiu com o T, de forma que os maiores valores foram observados (Figura 3) no maior nível de inclusão e foi crescente, acompanhando os T de incubação, atingindo máximo acúmulo com 12 horas de incubação. Isto pode ser devido a um efeito tóxico do acúmulo dos produtos da bio-hidrogenação sobre a isomerização do ácido linoleico. Observou-se que o NL teve interação com o pH do meio, resultando em maiores acúmulos destes isômeros no maior nível de inclusão e na faixa de pH mais elevado em comparação aos demais, podendo ser devido a uma maior atividade da Δ -12-isomerase, que tem sua atividade máxima em pH em torno da neutralidade (Kepler & Tove, 1967; Troegeler-Meynadier et al., 2014), sendo

menos efetiva em faixas de pH inferiores. Além disso, o pH interagiu com o T de incubação. No pH inferior, o maior acúmulo ocorreu no T 24 horas, enquanto no pHM e pHA para o CLA-*cis*-9, *cis*-11 e, no pHA para o “pool”, os acúmulos foram superiores em 12 horas de incubação, o que pode ter ocorrido por um efeito tóxico dos produtos da bio-hidrogenação sobre a atividade de isomerização do ácido linoleico, assim reduzindo o acúmulo desses isômeros no T 24 horas nestas condições. O acúmulo do CLA-*cis*-10, *cis*-12 e do “pool” de isômeros *trans-trans* (CLA-*trans*-9, *trans*-11 + *trans*-10, *trans*-12 + *trans*-11, *trans*-13) foi influenciado pela interação de todos os fatores (NL*pH*T). Observou-se que a maior produção destes isômeros se deu em ambos níveis de inclusão de ácido linoleico, combinado com as maiores faixas de pH do meio e, com o tempo máximo de incubação (CLA-*cis*-10, *cis*-12); enquanto o “pool” de isômeros *trans-trans* apresentou os maiores acúmulos em 12 horas de incubação, exceto no pHM no NL45. A coeluição destes isômeros é comum (Alves et al., 2013). Estes autores encontraram maiores quantidades destes isômeros em fluido ruminal de cordeiros alimentados com leucena associado à inclusão de óleo de soja. O consumo de volumoso, não resulta em grandes acúmulos de ácidos graxos voláteis, o que, não leva a drásticas reduções do pH ruminal, mantendo este sempre próximo da neutralidade, sendo que o presente trabalho concorda com o observado por estes autores. Como discutido anteriormente, os maiores pHs associados a níveis de inclusão de ácidos graxos poli-insaturados correspondem a um ambiente favorável e uma grande quantidade de substrato para isomerização, acarretando em rápidos acúmulos de isômeros conjugados, os quais podem ser tóxicos às isomerases, de forma que inibem crescimento da

Butyrivibrio fibrisolvens, além de inibir a redução a C18:1 *trans*, observando-se acúmulo máximo destes produtos em menores tempos de fermentação. Maia et al. (2007) observaram que o isômero *trans*-11, *trans*-13 pode ter como precursor o CLA-*cis*-9, *trans*-11. Porém até o momento, não foi identificada uma via para essa formação. Por outro lado, foi relatado que a bactéria do rúmen, *Butyrivibrio fibrisolvens* e alguns *lactobacilos* são capazes de sintetizar o CLA-*trans*-9, *trans*-11 pela isomerização do C18:2n-6, enquanto o isômero *trans*-10, *trans*-12 foi observado como sendo produzido por *P. acnes* (Wallace et al., 2007).

4.3. Produção de intermediários C18:1

Os produtos conjugados formados durante a isomerização inicial do C18:2n-6 são transitórios e, tendem a ser reduzidos, formando intermediários C18:1 *trans* (-4, -5, 6-8, -9, -10, -11, -12, -13, -14) e C18:1 *cis* (-9, -10, -11, -12, -13) (Jouany et al., 2007; Honkanen et al., 2012). Entretanto, alguns destes intermediários não foram encontrados neste estudo (Tabelas 1 e 2) e outros, como já mencionado, não apresentaram grandes modificações em suas quantidades iniciais e finais.

Os dois intermediários C18:1 majoritários foram o *trans*-11 e o *trans*-10, sendo que o acúmulo de ambos foi afetado pela interação dos três fatores estudados (NL*pH*T). Observa-se (Tabela 1) que o aumento das faixas de pH dos meios de incubação e o aumento dos tempos de incubação parecem afetar positivamente o acúmulo de ambos intermediários, enquanto que a elevação no nível de inclusão do ácido linoleico afetou de forma negativa a produção destes intermediários. Troegeler-Meynadier et al. (2006), observaram que as concentrações mais elevadas de C18:2n-6 levaram a uma maior acumulação de

CLA que poderia, em segundo lugar inibir altamente as redutases. Kim et al. (2000) mostraram que o acúmulo de CLA poderia inibir culturas puras de *Butyrivibrio fibrisolvens*. O presente estudo corrobora com estes relatos, uma vez que ao maior nível de inclusão de linoleico, observam-se os maiores acúmulos de todos os isômeros de CLA, o que, por sua vez pode ter inibido as redutases responsáveis pela redução de CLA a C18:1 *trans*. De forma inesperada, o C18:1 *trans*-10, como ocorreu com o CLA *trans*-10, *cis*-12, acumulou mais em faixas de pH mais elevado. Zened et al. (2011) e Toral et al. (2016) observaram em seus estudos, que o principal fator responsável pelo aumento no acúmulo de intermediários *trans*-10 são dietas com altas quantidade de carboidratos fermentáveis no rúmen e baixa fibra. Embora pareça existir alguma relação entre o baixo pH ruminal e o acúmulo de intermediários *trans*-10 (Zened et al., 2013; Colman et al., 2012), o cenário parece mais complexo, considerando que as mudanças no pH ruminal são rápidas e o tempo necessário para o estabelecimento de um ambiente ruminal que propicie a produção destes intermediários parece ser cerca de 10-15 dias (Zened et al., 2013), sugerindo que uma mudança progressiva na microbiota precisa ocorrer (Bessa et al., 2015).

4.4. Acúmulo de C18:0

A bactéria *Butyrivibrio proteoclasticus* é a principal responsável pela última redução para C18:0 (Wallace et al., 2006). Observa-se que os maiores acúmulos deste ácido graxo se deram em faixas de pH mais elevados, em combinação com os maiores tempos de incubação, porém no maior nível de inclusão do ácido linoleico, os acúmulos foram ligeiramente inferiores, se comparados ao nível mais baixo de inclusão. Observação semelhante se faz com

relação ao acúmulo de intermediários C18:1 *trans*, enquanto que os maiores acúmulos de CLA se deram no nível mais elevado de inclusão, fato que pode ter causado uma inibição nas duas redutases subsequentes. Troegeler-Meynadier et al. (2006) observaram que as maiores concentrações de C18:2n-6 levaram a um maior acúmulo de CLA, o que poderia inibir altamente as redutases. Entretanto, estes autores também relatam ser válida a hipótese de um efeito direto do CLA sobre as enzimas, onde haveria uma inibição por excesso de substrato (CLA) para a primeira redutase, e uma inibição competitiva com C18:1 *trans* para a segunda redutase. Além disso, uma baixa especificidade da segunda redutase também poderia explicar as inibições competitivas entre os intermediários C18:1 para sua redução a C18:0 (Griinari & Bauman, 1999).

4.5. Etapas da BH do C18:2n-6

As taxas médias da isomerização diminuíram com a duração da incubação devido ao esgotamento dos respectivos substratos, conduzindo a uma melhoria da sua eficiência média. A elevação no pH do meio de incubação, aumentou v1 e E1 (taxa e eficiência média da isomerização, respectivamente), em todos os tempos de incubação estudados, levando a aumentos no desaparecimento de C18:2n-6 e acúmulo total de isômeros CLA, entretanto, a elevação no NL, de 30 para 45 mg reduziu a eficiência média da isomerização. Troegeler-Meynadier et al. (2003) mostraram que o aumento das concentrações de C18:2n-6 (100 para 300 mg de C18:2n-6 em frascos de 160 mL, na forma de óleo de soja) diminuiu a eficiência média da isomerização, mas aumentou a quantidade de C18:2n-6 que desapareceu, sugerindo um limite da capacidade da isomerização, ao invés de uma inibição total do processo. No presente

estudo, em função do pequeno aumento de 30 para 45 mg de C18:2n-6, em meios de cultura com 50 mL, não foi capaz de explicar ter sido observada saturação da isomerização, mas sim, por uma inibição da isomerização pelos produtos da BH. Troegeler-Meynadier et al. (2006) relataram haver inibição por produtos da bio-hidrogenação, cujas concentrações aumentaram com o tempo. A menor faixa de pH apresentou menor v_1 e E1. Zened et al. (2011) observaram uma relação linear entre estes dois parâmetros, sugerindo que as reduções na E1 poderiam ser parcialmente devidas ao pH. Van Nevel & Demeyer, (1996), utilizando uma fonte esterificada de ácidos graxos, mostraram que o desaparecimento de C18:2n-6, liberado pela lipólise, foi de 80% quando o pH era 5,5, mas diminuiu para 60% com pH 5,2.

Observa-se que a taxa e a eficiência média da segunda reação da bio-hidrogenação foram fortemente afetadas pela interação de todos fatores estudados. A diminuição da v_2 no decorrer dos tempos de incubação, foi, provavelmente, consequência da inibição da isomerização pelo excesso de produtos, reduzindo a geração de substratos (CLA) para a segunda reação (primeira redução), uma vez que a E2 desta reação também reduziu, no decorrer do tempo, de acordo com o aumento do pH. Isto poderia explicar por que a eficiência média foi maior no pHB de ambos níveis de linoleico, em comparação aos demais pHs para a maioria dos tempos de incubação, pois a baixa quantidade de CLA produzida a partir de C18:2n-6 no pH baixo foi imediatamente reduzida em C18:1 *trans*. Estes resultados corroboram com as observações de Troegeler-Meynadier et al. (2006).

A redução na taxa média da terceira reação no decorrer dos tempos de incubação foi, aparentemente, uma consequência da inibição da redução de C18:1 *trans* a C18:0, provavelmente devido a um maior acúmulo de produtos da bio-hidrogenação nos níveis de pH mais elevados, uma vez que a sua eficiência média também diminuiu com essas faixas de pH. Os padrões opostos das eficiências médias das duas redutases e a concentração de CLA, sugerem uma inibição das duas redutases pelo acúmulo de CLA. As maiores concentrações de C18:2n-6 no NL 45 mg, levaram a um maior acúmulo de CLA, o que poderia inibir altamente as redutases. Já foi relatado que concentrações de C18:2n-6 superiores a 1,0 mg/mL de cultura, interferem na segunda redução, conduzindo à acumulação de C18:1 *trans* e menos de C18:0 (Harfoot et al., 1973). Entretanto, no presente estudo, o maior nível de inclusão levou a uma concentração de 0,9 mg/mL, desta forma, não se pode atribuir a isto, a menor taxa e eficiência média da segunda redução.

4.6. Análise dos componentes principais dos principais produtos da bio-hidrogenação do C18:2n-6

A partir das correlações dos componentes principais com as variáveis, pode-se observar que quanto mais à direita (variação explicada pelo CP1) e acima (variação explicada pelo CP2) as combinações se localizarem no plano cartesiano, maior será a quantidade de produtos da bio-hidrogenação acumulados, uma vez que essas posições apresentam valores mais elevados de C18:1 *trans*-10, C18:1 *trans*-11, CLA-*trans*-10, *cis*-12 e C18:0 e menores de C18:2n-6; exceto pela variação explicada pelo CP2 em relação ao C18:2n-6, que apresentou maiores valores em posições mais elevadas. A análise de

agrupamento mostrou que foi seis o número ideal de grupos formados entre as 30 possíveis combinações entre níveis de inclusão de C18:2n-6, faixas de pH do meio e tempos de incubação, em que: o grupo I englobou a combinação NL45-pHA-T24; o grupo II, a combinação NL30-pHA-T24; o grupo III, as classes NL30-pHM-T24, NL30-pHM-T12, NL30-pHA-T12, NL45-pHM-T24 e NL45-pHB-T24; o grupo IV, as combinações NL45-pHM-T12, NL45-pHM-T6, NL45-pHA-T12, NL45-pHA-T6, NL45-pHA-T3, NL30-pHA-T6 e NL20-pHA-T3; o grupo V, as combinações NL45-pHM-T0,5, NL30-pHM-T0,5, NL30-pHM-T3, NL30-pHA-T0,5, NL45-pHM-T3, NL45-pHA-T0,5 e NL30-pHM-T6 e; o grupo VI, as combinações NL30-PHB-T0,5, NL30-pHB-T3, NL45-pHB-T0,5, NL30-pHB-T6, NL30-pHB-T12, NL45-pHB-T12, NL45-pHB-T6 e NL30-pHB-T24 (Figura 6).

No grupo VI situaram-se todos pHB, exceto o NL45-pHB-T24, o qual migrou para o grupo III, sendo esse o segundo maior responsável pelo acúmulo de C18:0, uma vez que foram observadas, a maior taxa e eficiência na redução de C18:1 *trans* a esteárico nesta combinação, variação explicada pelo CP1 e CP2 (Figura 6). As faixas de pH inferiores, são responsáveis por menores desaparecimentos de C18:2n-6, pois nestas condições a atividade das isomerases é reduzida, resultando em menores acúmulos de intermediários e/ou produtos finais. Isso manteve no grupo VI estas combinações, sobretudo em razão dos maiores valores de C18:2n-6 (variação explicada pelos CP1 e CP2) e os menores valores de C18:1 *trans*-10, C18:0, CLA-*cis*-9, *trans*-11 (explicados pelos CP1 e CP2), C18:1 *trans*-11 e CLA-*trans*-10, *cis*-12 (explicados pelo CP1). Além desta combinação, outras quatro assentam-se no grupo III, compostas pelo NL30-pHM-T12 e T24, NL30-pHA-T12 e NL45-pHM-T24, no entanto, observa-

se que duas combinações de NL45-pHM/pHA-T12 migraram para o grupo IV. Esta migração pode ser explicada pela semelhança destas combinações em relação a influência das maiores acumulações de produtos da bio-hidrogenação gerados por elas, de forma que estes maiores acúmulos atuem sobre as redutases, levando a uma menor taxa de reduções subsequentes e, conseqüentemente maior acúmulo do isômero CLA-*cis*-9, *trans*-11. Como já dito anteriormente, por Troegeler-Meynadier et al. (2006), e relatado também neste trabalho, maiores concentrações de C18:2n-6 levaram a uma maior acumulação de CLA, o que poderia inibir altamente as redutases e, Kim et al. (2000), também demonstraram que o CLA poderia inibir culturas puras de *Butyrivibrio fibrisolvens*, assim um efeito direto de CLA sobre estas enzimas poderia existir, de forma a causar uma inibição por excesso de substrato para a primeira redutase, e uma inibição competitiva com C18:1 *trans* para a segunda.

O maior incremento de ácido linoleico ao substrato das incubações, combinado a um pHA, mostrou maior acúmulo em 24 horas de incubação para alguns intermediários. Como já visto, esperava-se que os maiores acúmulos de intermediários *trans*-10 fossem observados em faixas de pH mais baixas. Entretanto, provavelmente não ocorreu tempo suficiente para a adaptação dos microrganismos responsáveis pela isomerização do linoleico para este tipo de intermediário. Por este motivo, a combinação NL45-pHA-T24 migrou do grupo IV, assentando-se no grupo I, principalmente pelo aumento de CLA-*trans*-10, *cis*-12, variação esta explicada pelo CP1, uma vez que o CP2 não foi significativo.

As menores inclusões de ácido linoleico ao substrato nas incubações, aliado a um elevado pH, levam a maiores acumulações de alguns intermediários

ao final do tempo máximo de incubação (24 horas), da mesma forma que há maior percentual de desaparecimento da fonte lipídica nesse tempo de incubação, se comparado ao percentual que desapareceu numa maior inclusão. Isso se deve, principalmente, pelo fato de não haver limitação de nenhuma etapa da bio-hidrogenação imposta pelo pH, nem pelo acúmulo de produtos (intermediários), o que se observa em maiores inclusões de C18:2n-6, que poderia inibir enzimas e/ou levar enzimas a competir por substrato, visto que há demasiado acúmulo de um determinado intermediário. No grupo III, além das combinações de NL45-pHB/pHM-T24, ocorreram todas as combinações com NL30-pHM/pHA-T12/24, exceto a combinação NL30-pHA-T24, que foi a única representante do grupo II, caracterizado pelo maior acúmulo de intermediários da biohidrogenação do C18:2n-6 ao final do tempo máximo de incubação, além de maior percentual de desaparecimento da quantidade inicial do C18:2n-6. Essa variação foi explicada pelo CP1 e pelo CP2.

5. Conclusões

No presente estudo, observou-se que todos os fatores estudados (nível de ácido linoleico, faixa de pH do meio, tempo de duração da incubação), apresentaram ações, tanto individuais, quanto conjuntas, sobre a bio-hidrogenação *in vitro*, do ácido linoleico puro. Dentre as diversas interações observadas entre os fatores estudados, destaque pode ser dado a menor faixa de pH que, em média, proporcionou menores desaparecimentos da fonte lipídica adicionada ao substrato, somado a menores acúmulos de intermediários da bio-hidrogenação, independentemente do nível de inclusão e do tempo de duração

da incubação. De forma geral, NL30-pHA-T24 foi a combinação responsável pelos maiores acúmulos de intermediários da bio-hidrogenação do ácido linoleico.

Conflito de interesses

Não há conflito de interesse.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Ênio Rosa Prates, agradeço pela orientação e aquisição do ácido linoleico puro. Ao Prof. Dr. José Laerte Nörnberg, agradeço pela viabilização de recursos e infra-estrutura do Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais da UFSM. Ao Prof. Dr. Diego Prado de Vargas, pelo grande auxílio na análise estatística e pelas colaborações referentes ao trabalho.

Referências

- Alves, S. P., Santos-Silva, J., Cabrita, A. R. J., Fonseca, A. J. M., Bessa, R. J. B., 2013. Detailed dimethylacetal and fatty acid composition of rumen content from lambs fed lucerne or concentrate supplemented with soybean oil. Plos one. 8, e5838.
- AbuGhazaleh, A., Jacobson, B. N., 2007. Production of *trans* C18:1 and conjugated linoleic acid in continuous culture fermenters fed diets containing fish oil and sunflower oil with decreasing levels of forage. Animal. 1, 660–665.

- Beam, T. M., Jenkins, T. C., Moate, P. J., Kohn, R. A., Palmquist, D. L., 2000. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *J. Dairy Sci.* 83, 2564-2573.
- Bessa, R. J. B., Alves, S. P., Santos-Silva, J., 2015. Constraints and potentials for the nutritional modulation of the fatty acid composition of ruminant meat. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, 1325–1344.
- Choi, N. J., Imm, J. Y., Oh, S., Ki, B. C., Hwang, H. J., Kim, Y. J., 2005. Effect of pH and oxygen on conjugated linoleic acid (CLA) production by mixed rumen bacteria from cows fed high concentrate and high forage diets. *Animal Feed Science and Technology.* 123, 124, 643–653.
- Colman, E., Tas, B. M., Waegeman, W., De Baets, B., Fievez, V., 2012. The logistic curve as a tool to describe the daily ruminal pH pattern and its link with milk fatty acids. *J. Dairy Sci.* 95, 5845–5865.
- Devillard, E., McIntosh, F. M., Newbold, C. J., Wallace, R. J., 2006: Rumen ciliate protozoa contain high concentrations of conjugated linoleic acids and vaccenic acid, yet do not hydrogenate linoleic acid or desaturate stearic acid. *British Journal of Nutrition.* 96, 697–704.
- Fuentes, M. C., Calsamiglia, S., Cardozo, P. W., Vlaeminck, B., 2009: Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. *J. Dairy Sci.* 92, 4456–4466.
- Fuentes, M. C., Calsamiglia, S., Fievez, V.; Blanch, M., Mercadal, D., 2011. Effect of pH on ruminal fermentation and biohydrogenation of diets rich in omega-

- 3 or omega-6 fatty acids in continuous culture of ruminal fluid. *Animal Feed Science and Technology* 169, 35–45.
- Griinari, J. M., Dwyer, D. A., Mac Guire, M. A., Bauman, D. E., Palmquist, D. L., Nurmela, K.V., 1998. *trans*-Octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81, 1251–1261.
- Griinari, J. M., Corl, B. A., Lacy, S. H., Chouinard, P. Y., Nurmela, K. V., Bauman, D. E., 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta(9)-desaturase. *J. Nutr.* 130, 2285–2291.
- Griinari, J. M., Bauman, D. E., 1999. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. Vol. 1 ed. AOCS press, Champaign, IL. 180–200.
- Harfoot, C. G., Noble, R. C., Moore, J. H., 1973. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen micro-organisms *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* 24, 961–970.
- Harfoot, C.G., Hazelwood, G.P., 1988. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P.N. (Ed.), *The Rumen Microbial Ecosystem*. Elsevier Applied Science, Amsterdam, Netherlands. 285–322.
- Honkanen, A. M., Griinari, J. M., Vanhatalo, A., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Shingfield, K. J., 2012. Characterization of the disappearance and formation of biohydrogenation intermediates during incubations of linoleic acid with rumen fluid *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 95, 1376-1394.
- Hudson, J. A., Cai, Y., Corner, R. J., Morvan, B., Joblin, K. N., 2000. Identification and enumeration of oleic acid and linoleic acid hydrating bacteria in the rumen of sheep and cows. *J Appl Microbiol.* 88, 286–292

- Jenkins, T. C., 2010. Technical note: Common analytical errors yielding inaccurate results during analysis of fatty acids in feed and digesta samples¹. *J Dairy Sci.* 93, 1170–1174.
- Jouany, J.-P., Lassalas, B., Doreau, M., Glasser, F., 2007. Dynamic features of the rumen metabolism of linoleic acid, linolenic acid and linseed oil measured *in vitro*. *Lipids.* 42, 351–360.
- Kepler, C. R., Tove, S. B., 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: Purification and properties of a linoleate Δ^{12} *cis* - Δ^{11} *trans* isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 242, 5686–5692.
- Kepler, C. R., Hirons, K. P., McNeill, J. J., Tove, S. B., 1966. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 241, 1350–1354.
- Kim, Y. J., Liu, R. H., Bond, D. R., Russell, J. B., 2000. Effect of linoleic acid concentration on conjugated linoleic acid production by *Butyrivibrio fibrisolvens* A38. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5226–5230.
- Lourenco, M., Ramos-Morales, E., Wallace, R. J., 2010. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. *Animal*, 4, 1008–1023.
- Maia, M. R. G., Chaudhary, L. C., Figueres, L., Wallace, R. J., 2007. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek.* 91, 303–314.
- Martin, S. A., Jenkins, T. C., 2002. Factors affecting conjugated linoleic acid and *trans*-C18:1 fatty acid production by mixed ruminal bacteria. *J. Anim. Sci.* 80, 3347–3352.

- McDougall, E. I., 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheeps saliva. *Biochemical Journal*. 43, 99-109.
- Or-Rashid, M. M., AlZahal, O., McBride, B. W., 2008. Studies on the production of conjugated linoleic acid from linoleic and vaccenic acids by mixed rumen protozoa. *Appl Microbiol Biotechnol*. 81, 533–541.
- Or-Rashid, M. M., AlZahal, O., McBride, B. W., 2011. Comparative studies on the metabolism of linoleic acid by rumen bacteria, protozoa, and their mixture *in vitro*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 89, 387–395.
- Proell, J. M., Mosley, E. E., Powell, G. L., Jenkins, T. C., 2002. Isomerization of stable isotopically labeled elaidic acid to *cis* and *trans* monoenes by ruminal microbes. *J Lipid Res*. 43, 2072–2076.
- Toral, P. G., Bernard, L., Belenguer, A., Rouel, J., Hervás, G., Chilliard, Y., Frutos, P., 2016. Comparison of ruminal lipid metabolism in dairy cows and goats fed diets supplemented with starch, plant oil, or fish oil. *J. Dairy Sci*. 99, 301–316.
- Troegeler-Meynadier, A., Nicot, M. C., Bayourthe, C., Moncoulon, R., Enjalbert, F., 2003. Effects of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation *in vitro*. *J. Dairy Sci*. 86, 4054–4063.
- Troegeler-Meynadier, A., Bret-Bennis, L., Enjalbert, F., 2006. Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. *Reproduction Nutrition Development*. 46, 713–724.

- Troegeler-Meynadier, A., Palagiano, C., Enjalbert, F., 2014. Effects of pH and fermentative substrate on ruminal metabolism of fatty acids during short-term *in vitro* incubation. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 98, 704-713.
- Wallace, R.J., Chaudhary, L.C., McKain, N., McEwan, N.R., Richardson, A.J., Vercoe, P.E., Walker, N.D., Paillard, D., 2006. *Clostridium proteoclasticum*: a ruminal bacterium that forms stearic acid from linoleic acid. *FEMS Microbiol. Lett.* 265, 195–201.
- Wallace, R. J., McKain, N., Shingfield, K. J., Devillard, E., 2007. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. *Journal of Lipid Research*. 48, 2247–2254.
- Van Nevel, C. J., Demeyer, D. I., 1996. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean rumen contents *in vitro*. *Reproduction Nutrition Development*. 36, 53–63.
- Verhulst, A., Janssen, G., Parmentier, G., Eyssen, H., 1987. Isomerisation of polyunsaturated fatty acids by Propionibacteria. *Systematic and Applied Microbiology*. 9, 12–15.
- Xu, H., Lee, H. Y., Hwang, B., Nam, J. H., Kang, H. Y., Ahn, J., 2008. Kinetics of microbial hydrogenation of free linoleic acid to conjugated linoleic acids. *J Appl Microbiol.* 105, 2239–2247.
- Zened, A., Troegeler-Meynadier, A., Nicot, M. C., Combes, S., Farizon, Y., Enjalbert, F., 2011. Starch and oil in the donor cow diet and starch in substrate differently affect the *in vitro* ruminal biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. *J. Dairy Sci.* 94, 5634–5645.

Zened, A., Enjalbert, F., Nicot, M. C., Troegeler-Meynadier, A., 2013. Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a trans-11 to trans-10 shift of biohydrogenation. *J. Dairy Sci.* 96, 451–459.

Tabela 1

Efeitos do tratamentos e médias (mg/g MS) de C18:1 *trans* intermediários

	Tempo	Concentrações de linoleico						SEM	Efeito (p-valor)							
		30 mg			45 mg				NL	T	pH	NL*T	NL*pH	pH*T	NL*pH*T	
		pHB	pHM	pHA	pHB	pHM	pHA									
C18:1t6/t7/t8	0.5	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	-0,01	-0,01									
	3	0,00	-0,01	-0,01	0,00	-0,01	-0,01									
	6	-0,01	-0,01	-0,01	0,00	0,00	-0,01	0,00	0,2961	<,0001	0,079	0,002	0,021	<,0001	0,1363	
	12	0,00	0,00	0,03	0,00	0,00	0,01									
	24	0,01	0,00	0,04	-0,01	0,01	0,02									
C18:1t9	0.5	0,00	-0,01	-0,01	-0,01	-0,01	0,00									
	3	0,00	0,00	-0,01	-0,01	0,00	0,00									
	6	0,00	-0,01	0,00	-0,01	0,00	-0,01	0,00	0,1514	3E-04	4E-04	0,299	0,11	0,226	0,0011	
	12	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00									
	24	0,00	-0,01	-0,03	0,00	0,00	0,00									
C18:1t10	0.5	0,00	0,03	0,02	0,02	0,04	0,03									
	3	0,13	0,13	0,08	0,09	0,08	0,08									
	6	0,16	0,14	0,14	0,16	0,14	0,14	0,04	0,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	12	0,19	0,28	0,71	0,12	0,17	0,23									
	24	0,22	0,47	2,06	0,24	0,36	0,88									
C18:1t11	0.5	0,05	0,38	0,64	0,09	0,42	0,50									
	3	0,43	0,99	1,89	0,22	0,89	1,59									
	6	0,48	1,34	2,77	0,44	1,25	2,13	0,07	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
	12	0,64	1,98	5,66	0,47	1,68	3,63									

	24	1,16	3,20	8,17	0,99	2,98	6,30								
C18:1n12	0.5	-0,01	0,01	0,00	0,00	0,01	0,00								
	3	0,01	0,01	0,02	0,00	0,00	0,01								
	6	0,00	0,01	0,01	0,00	0,02	0,01	0,01	0,2509	<,0001	0,1118	0,0001	0,1039	<,0001	0,3395
	12	0,00	0,01	0,05	0,01	0,03	0,03								
	24	0,01	0,03	0,10	0,00	0,02	0,05								
C18:1n16	0.5	0,00	0,03	0,00	0,04	0,00	-0,02								
	3	0,00	-0,02	0,00	0,01	0,00	-0,01								
	6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,01	0,01	0,82	0,141	0,723	0,232	0,141	0,08	0,0147
	12	0,00	0,01	0,01	0,00	0,01	0,00								
	24	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00								

pHB = pH baixo; pHM = pH médio; pHA = pH alto.

NL, nível de ácido linoleico; T tempo de incubação; pH, faixa de pH do meio de incubação.

SEM = Erro padrão da média

Tabela 2

Efeitos do tratamentos e médias (mg/g MS) de C18:1 *cis* intermediários

	Tempo	Concentrações de linoleico						SEM	Efeito (p-valor)						
		30 mg			45 mg				NL	T	pH	NL*T	NL*pH	pH*T	NL*pH*T
		pHB	pHM	pHA	pHB	pHM	pHA								
C18:1c9	0.5	0,02	-0,01	-0,02	-0,23	-0,20	-0,47								
	3	1,09	0,09	-0,10	-0,07	-0,23	-0,31								
	6	0,04	0,01	-0,09	-0,20	-0,18	-0,42	0,18	0,0084	0,0260	0,1286	0,5375	0,2630	0,0036	0,5574
	12	0,16	0,09	0,14	-0,15	-0,01	0,13								
	24	-0,11	0,26	0,30	-0,20	0,32	0,30								
C18:c11	0.5	-0,01	-0,02	-0,01	-0,03	-0,03	-0,05								
	3	0,04	0,00	0,00	-0,02	-0,01	-0,02								
	6	0,00	0,03	0,03	-0,02	0,03	0,02	0,02	0,5823	<,0001	<,0001	0,0035	0,0169	<,0001	0,0462
	12	0,02	0,15	0,37	0,00	0,15	0,43								
	24	0,03	0,20	0,40	0,01	0,24	0,50								
C18:1c12	0.5	0,01	0,00	0,02	0,00	0,02	0,01								
	3	0,00	0,01	0,07	-0,01	0,02	0,05								
	6	-0,01	0,00	0,09	0,00	0,03	0,05	0,04	0,2256	0,0142	0,0249	0,6231	0,4242	0,6869	0,3496
	12	0,02	0,04	0,13	0,02	0,02	0,08								
	24	0,01	0,04	0,11	0,01	0,05	0,12								
C18:1c13	0.5	0,00	0,00	-0,01	-0,02	-0,01	-0,01								
	3	0,04	0,02	0,00	0,02	0,00	0,01								
	6	0,01	-0,01	-0,01	-0,02	-0,01	-0,02	0,01	0,0499	<,0001	0,2530	0,7146	0,4324	0,2977	0,5173
	12	0,00	0,01	0,00	-0,01	0,00	-0,01								

24 0,01 0,00 -0,01 0,00 -0,01 -0,01

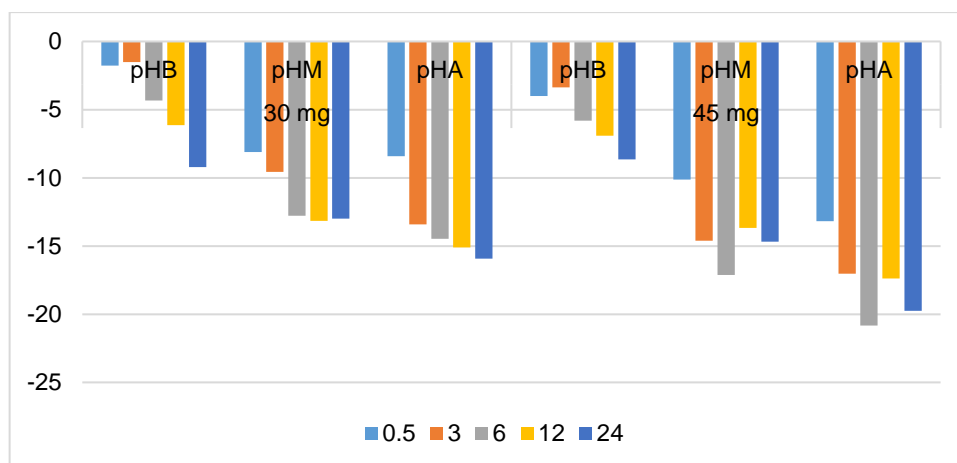
pHB = pH baixo; pHM = pH médio; pHA = pH alto.

NL, nível de ácido linoleico; T tempo de incubação; pH, faixa de pH do meio de incubação.

SEM = Erro padrão da média

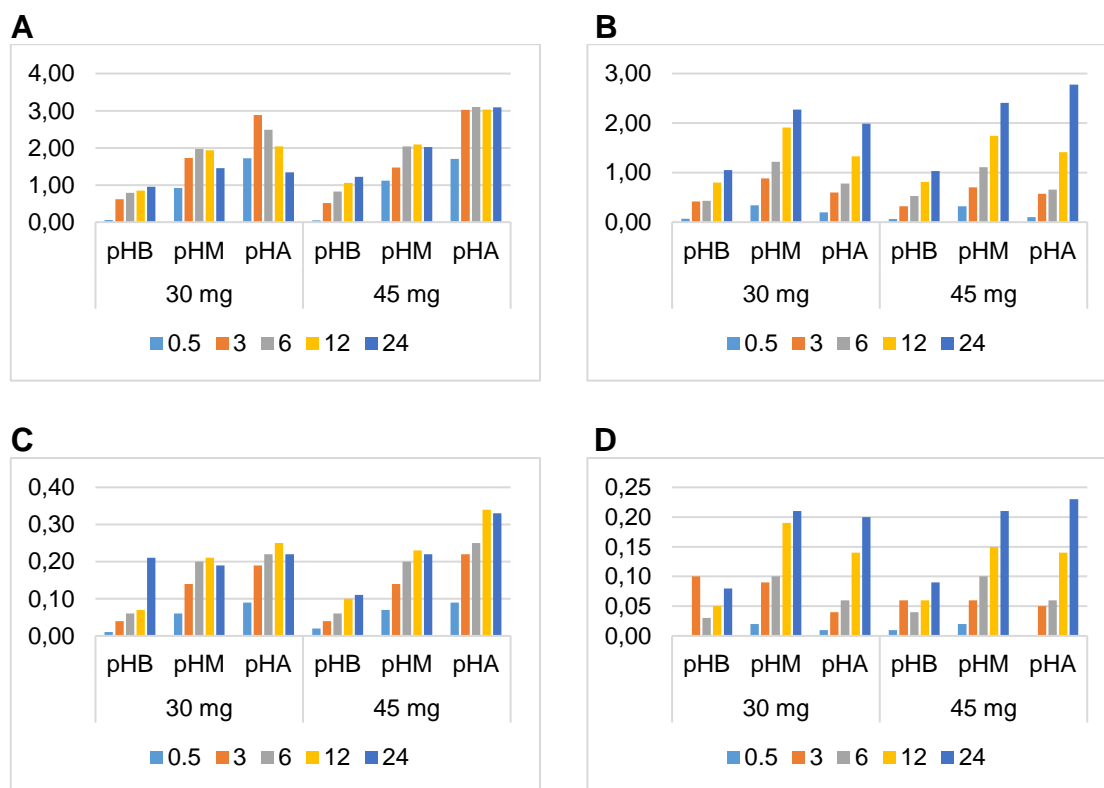
LEGENDA DA FIGURA

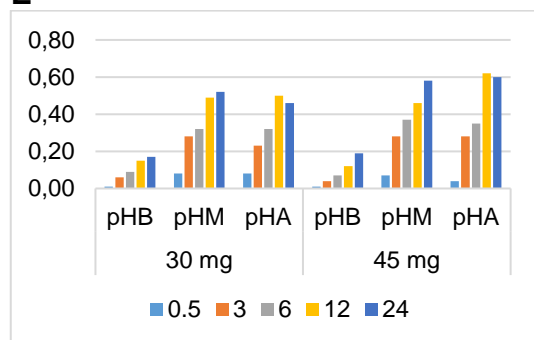
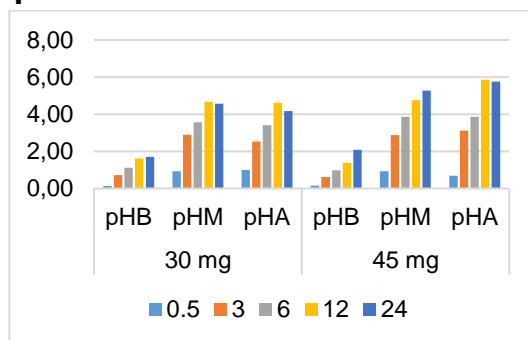
Figura 2. Desaparecimento do ácido C18:2n-6 adicionado ao substrato de incubação em função dos fatores estudados – nível de ácido linoleico (NL-30 e NL45), faixa de pH (pHB=baixo, pHM=médio e pHA=alto) e tempos de incubação (0,5=30 min, 3, 6, 12 e 24 horas). SEM=0,56. Efeito (P-valor) = NL*T (<0,0001), NL*pH (0,0002), T*pH (<0,0001)



LEGENDA DA FIGURA

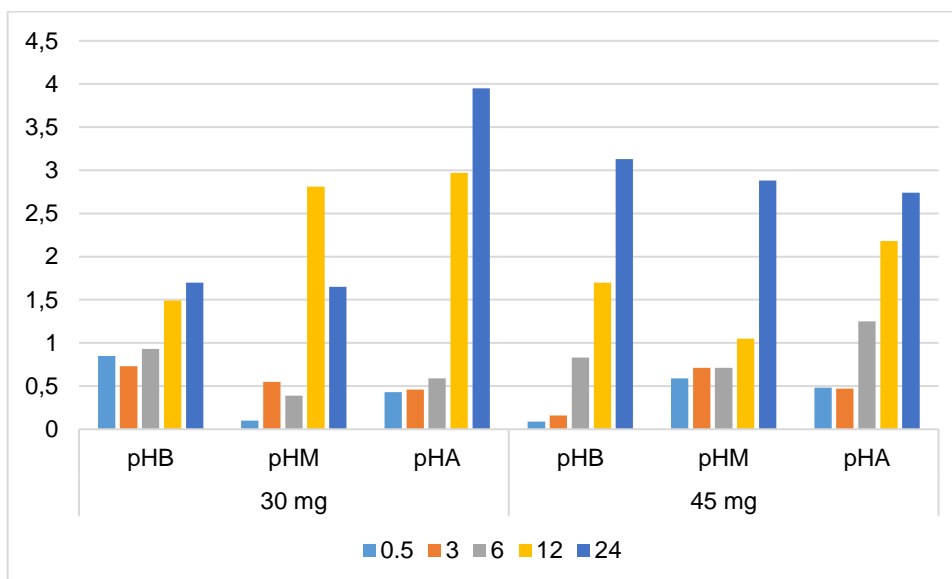
Figura 3. Acúmulo de isômeros CLA (mg/g MS) em função dos fatores estudados – nível de ácido linoleico (30 e 45 mg), faixa de pH (pHB=baixo, pHM=médio e pHA=alto) e tempos de incubação (0,5=30 min, 3, 6, 12 e 24 horas), onde A: CLA-c9,t11 (SEM=0,11). Efeito (P-valor) = NL*pH*T (0,0004); B: CLA-t10,c12 (SEM=0,09). Efeito (P-valor) = NL*pH*T (0,0085); C: CLA-c9,c11 (SEM=0,02). Efeito (P-valor) = NL*T (<0,0001), NL*pH (0,0238), pH*T (0,0034); D: CLA-c10,c12 (SEM=0,01). Efeito (P-valor) = NL*pH*T (0,0491); E: CLA-c10,t12+t9,c11+c11,t13 (SEM=0,02). Efeito (P-valor) = NL*T (<0,0001), NL*pH (0,0124), pH*T (<0,0001); e F: CLA-t9,t11+t10,t12+t11,t13 (SEM=0,13). Efeito (P-valor) = NL*pH*T (0,0005).



E**F**

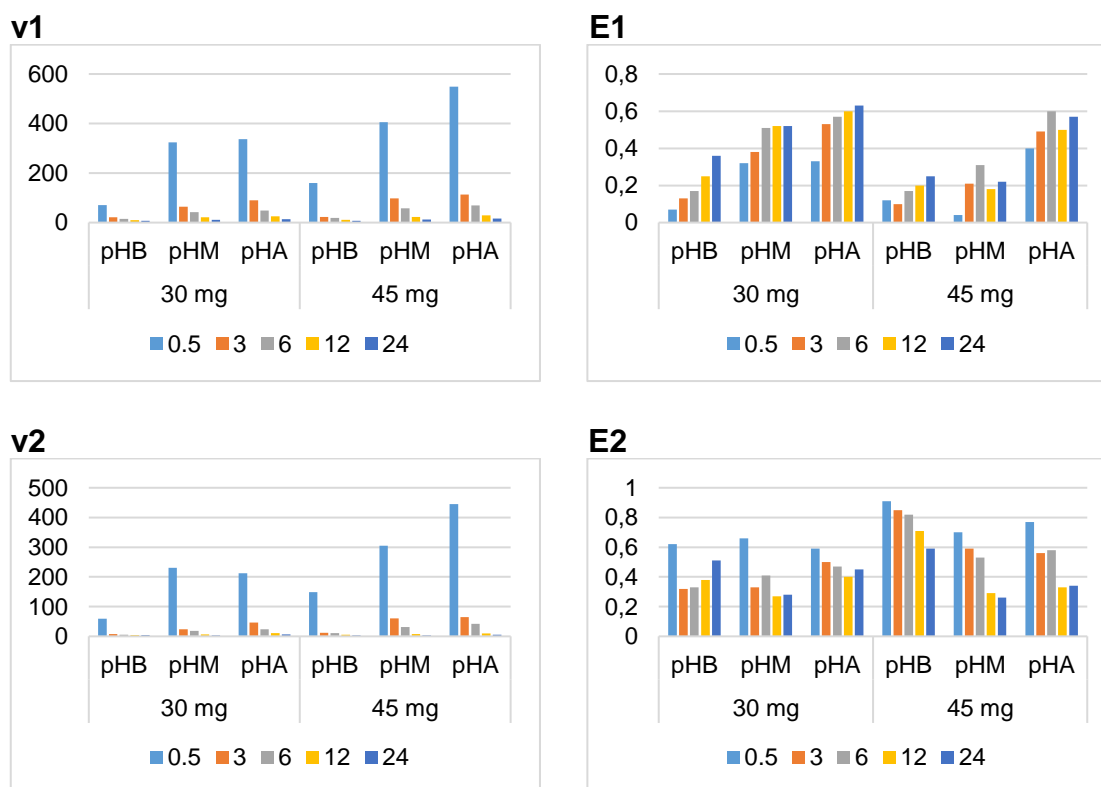
LEGENDA DA FIGURA

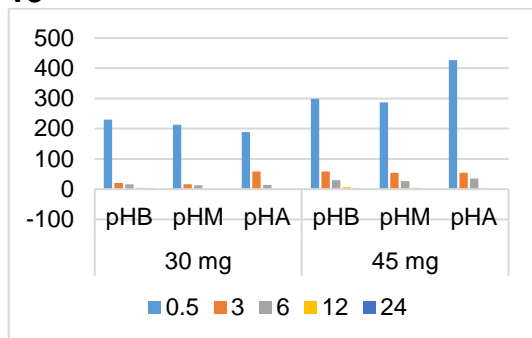
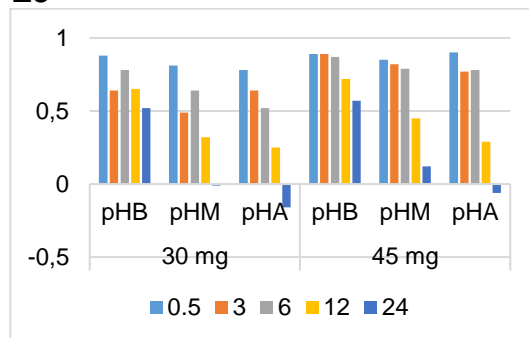
Figura 4. Acúmulo do ácido C18:0 (mg/g MS) em função dos fatores estudados – nível de ácido linoleico (30 e 45 mg), faixa de pH (pHB=baixo, pHM=médio e pHA=alto) e tempos de incubação (0,5=30 min, 3, 6, 12 e 24 horas). SEM=0,14. Efeito (P-valor) = NL*pH*T (<0,0001).



LEGENDA DA FIGURA

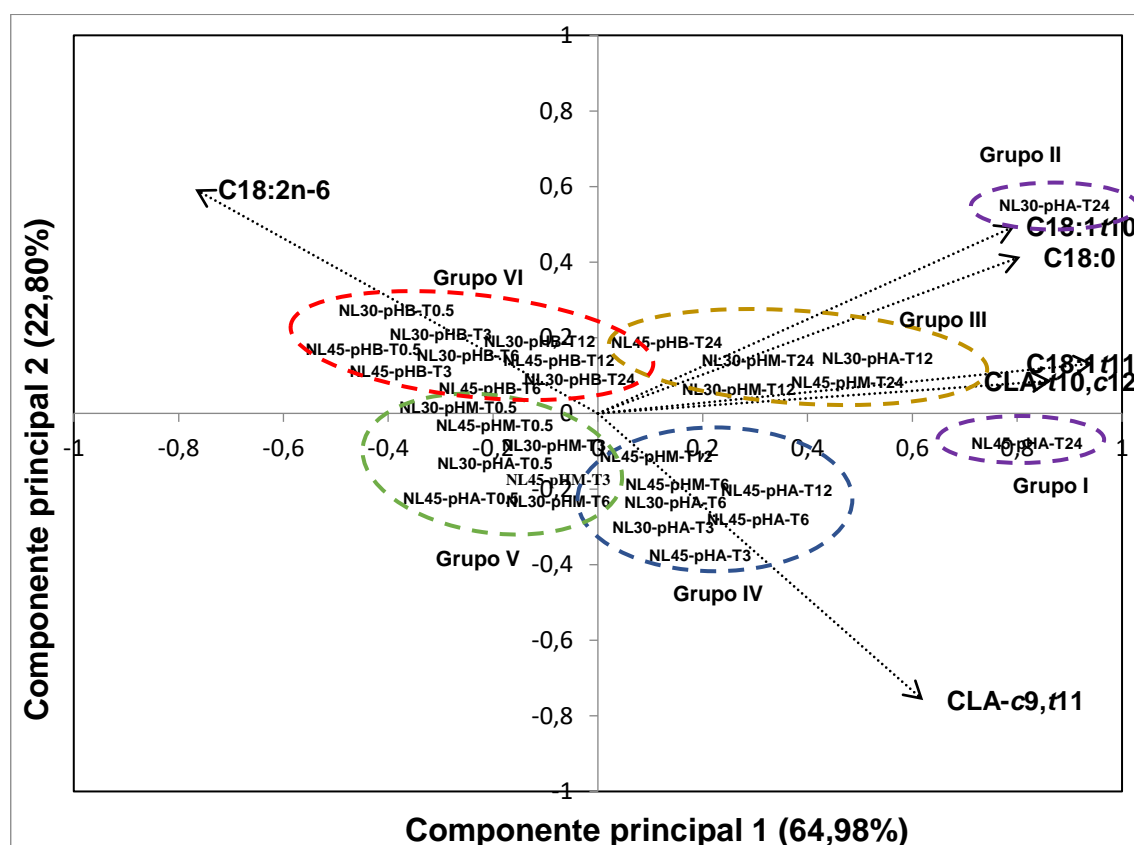
Figura 5. Taxas médias (mg/L/h) e eficiências médias das três reações de bio-hidrogenação do ácido C18:2n-6 em função dos fatores estudados – nível de ácido linoleico (30 e 45 mg), faixa de pH (pHB=baixo, pHM=médio e pHA=alto) e tempos de incubação (0,5=30 min, 3, 6, 12 e 24 horas), onde: v1 e E1=taxa e eficiência média de isomerização do C18:2n-6 v2 e E2=taxa e eficiência da redução de CLA a C18:1 *trans*; v3 e E3=taxa e eficiência da redução de C18:1 *trans* a C18:0. v1: SEM=8,10. Efeito (P-valor) = NL*pH*T (<0,0001); E1: SEM=0,02. Efeito (P-valor) = NL*pH*T (0,0073); v2: SEM=9,08. Efeito (P-valor) = NL*pH*T (<0,0001); E2: SEM=0,03. Efeito (P-valor) = NL*pH*T (0,0021); v3: SEM=10,55. Efeito (P-valor) = NL*pH*T (<0,0001); E3: SEM=0,06. Efeito (P-valor) = NL*T (<0,0001), pH*T (<0,0001).



v3**E3**

LEGENDA DA FIGURA

Figura 6. Projeção bidimensional dos escores das diferentes combinações entre os fatores estudados – nível de ácido linoleico (NL-30 e NL45), faixa de pH (pHB = baixo, pHM = médio e pHA = alto) e tempos de incubação (T0,5=30 min, T3=3 horas, T6=6 horas, T12=12 horas e T24=24 horas), além das cargas (correlações entre as variáveis e os componentes principais) das variáveis: C18:2n-6; CLA-*cis*-9, *trans*-11; CLA-*trans*-10, *cis*-12; C18:1 *trans*-11, C18:1 *trans*-10 e C18:0



CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que todos os fatores estudados apresentaram ações, tanto individuais, quanto conjuntas, sobre a bio-hidrogenação *in vitro*, do ácido linoleico puro. Não se observou mudança na via de bio-hidrogenação comum desse ácido graxo, pela redução do pH do meio associada a inclusão de ácido graxo poli-insaturado, nas diferentes durações da incubação. Portanto, por meio deste estudo, não se pode atribuir a mudança na via *trans*-11 para *trans*-10 pela redução do pH do meio de fermentação. Contudo, a menor faixa de pH que, em média, proporcionou menores desaparecimentos da fonte lipídica adicionada ao substrato, somado a menores acúmulos de intermediários da bio-hidrogenação, independentemente do nível de inclusão e do tempo de duração da incubação. O maior nível de inclusão de ácido linoleico, resultou em maiores acúmulos de isômeros CLA e C18:1 *cis*, mas, os maiores acúmulos de C18:1 *trans* foram encontrados ao menor nível de inclusão da fonte lipídica. A taxa de isomerização do ácido linoleico foi maior no nível de inclusão mais elevado, resultando em maior desaparecimento deste ácido graxo e maior produção de CLA, já a eficiência desse processo melhorou no nível mais baixo. A menor inclusão, também resultou em maiores taxas na primeira redução nos maiores tempos de duração de incubação, refletindo maiores acúmulos de intermediários C18:1 *trans* nestas condições. Entretanto, o acúmulo de ácido esteárico foi maior no nível mais elevado de inclusão, visto que a taxa da segunda redução foi maior nestas condições. De forma geral, NL30-pHA-T24 foi a combinação responsável pelos maiores acúmulos de intermediários da bio-hidrogenação do ácido linoleico.

REFERÊNCIAS

BAUMGARD, L. H. et al. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits fat synthesis. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.278, p.179-184, 2000.

BAUMAN, D. E. et al. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.77, p.1-15, 2000.

BAUMAN, D. E.; GRIINARI, J. M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v.23, p.203-227, 2003.

BAUMAN, D. E. et al. Regulation of fat synthesis by conjugated linoleic acid: lactation and the ruminant model. **Journal of Nutrition**, Rockville, v.138, p.403-409, 2008.

BAUMGARD, L. H. et al. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits fat synthesis. **American Journal of Physiology**, Bethesda, v.278, p.179-184, 2000.

BEAM, T. M. et al. Effects of amount and source of fat on the rates of lipolysis and biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.83, p.2564-2573, 2000.

BUCCIONI, A. et al. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.174, p.1-25, 2012.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; DOREAU, M. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v.70, p.31-48, 2001.

CHILLIARD, Y. et al. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p.1751-1770, 2003.

CHILLIARD, Y. et al. Diet, rumen biohydrogenation, cow and goat milk fat nutritional quality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.109, p.828-855, 2007.

CHIN, S. F. et al. Conjugated linoleic acid (9,11-and 10,12-octadecadienoic acid) is produced in conventional but not germ-free rats fed linoleic acid. **Journal of Nutrition**, Rockville, v.124, p.694-701, 1993.

CHOI, N. J. et al. Effect of pH and oxygen on conjugated linoleic acid (CLA) production by mixed rumen bacteria from cows fed high concentrate and high

forage diets. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.123, 124, p.643–653, 2005.

CHOUINARD, P. I. et al. Milk yield and composition during abomasal infusion of conjugated linoleic acids in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.82, p.2737-2745, 1999.

CHOW, T. T. et al. Effect of fish oil on *in vitro* rumen lipolysis, apparent biohydrogenation of linoleic and linolenic acid and accumulation of biohydrogenation intermediates. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.117, p.1–12, 2004.

COLLOMB, M. et al. Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. **International Dairy Journal**, Barking, v.16, p.1347-1361, 2006.

DEHORITY, B. A. **Rumen Microbiology**. Nottingham: Nottingham University Press, 2003. 372p.

DILZER, A.; PARK, Y. Implication of conjugated linoleic acid (CLA) in human health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.52, p.488–513, 2012.

FRITSCH, J.; STEINHART, H. Z. Amounts of conjugated linoleic acid (CLA) in German foods and evaluation of daily intake. **European Food Research and Technology**, Berlin, v.206, p.77-82, 1998.

FUENTES, M. C. et al. Effect of pH and level of concentrate in the diet on the production of biohydrogenation intermediates in a dual-flow continuous culture. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, p.4456-4466, 2009.

FUENTES, M. C. et al. Effect of pH on ruminal fermentation and biohydrogenation of diets rich in omega-3 or omega-6 fatty acids in continuous culture of ruminal fluid. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v.169, p.35-45, 2011.

GARTON, G. A. Fatty acid metabolism in ruminants. In: GOODWIN, T. W. (Ed.) **Biochemistry of Lipids**. Baltimore: University Park Press, 1977. v.14, p.337-370.

GERSON, T. et al. Influence of particle size and surface area on *in vitro* rates of gas production, lipolysis of triacylglycerols and hydrogenation of linoleic acid by sheep rumen digesta or *Ruminococcus flavefaciens*. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 110, p.31–37, 1988.

GRAZIOLA, F.; SOLIS, V. S.; CURI, R. Estrutura química e classificação dos ácidos graxos. In: CURI, R. et al. (Org.). **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. Barueri: Manole, 2002. p.5-24

GRIINARI, J. M.; BAUMAN, D. E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: *ADVANCES in Conjugated Linoleic Acid Research*. Champaign: AOCS Press, 1999. v.1, p.180-200.

GRIINARI, J. M.; CHOUINARD, P. Y.; BAUMAN, D. E. *Trans* fatty acid hypothesis of milk fat depression revisited. In: *CORNELL NUTRITION CONFERENCE FOR FEED MANUFACTURES*, [59.], 1997, Rochester, NY. **Proceedings**. Ithaca: Cornell University, 1997. p.208–216.

GRIINARI, J. M. et al. *Trans* octadecanoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, p.1251–1261, 1998.

GRIINARI, J. M. et al. Conjugated Linoleic acid is synthesized endogenously in lactating cows by Δ^9 desaturase. **Journal of Nutrition**, Rockville, v.130, p.2285-2291, 2000.

GRIINARI, J. M.; BAUMAN, D. E. Milk fat depression: concepts, mechanism and management application. In: SEJRSEN, K.; HVELPLUND, T.; NIELSEN, M.O. (Ed.), **Ruminant Physiology Digestion, Metabolism and Impact Nutrition on Gene Expression, Immunology and Stress**. Amsterdam: Wageningen Academic Publishers, 2006. p.389–417.

HA, Y. L.; GRIMM, N. K.; PARIZA, M. W. Anticarcinogens from fried ground beef: heat altered derivatives of linoleic acid. **Carcinogenesis**, London, v.8, p.1881-1887, 1987.

HALMEMIES-BEAUCHET-FILLEAU, A. et al. Effect of forage conservation method on ruminal lipid metabolism and microbial ecology in lactating cows fed diets containing a 60:40 forage-to-concentrate ratio. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, p.2428–2447, 2013.

HARFOOT, C. G.; NOBLE, R. C.; MOORE, J. H. Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen microorganism *in vitro*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.24, p.961, 1973.

HARFOOT, C. G.; NOBLE, R. C.; MOORE, J. H. The role of plant particles, bacteria and cell-free supernatant fractions of rumen contents in the hydrolysis of trilinolein and subsequent hydrogenation of linoleic acid. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 41, p. 533–542, 1975.

HARFOOT, C. G.; HAZLEWOOD, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In: *THE RUMEN Microbial Ecosystem*. New York: Elsevier Science Publishing, 1988. p.285-322.

HARFOOT, C. G.; HAZLEWOOD, G. P. Lipid metabolism in the rumen. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S (Org.). **The rumen microbial ecosystem**. 2. ed. [S.I.]: Blackie academic & professional, 1997. p. 380-425.

HONKANEN, A. M. et al. Characterization of the disappearance and formation of biohydrogenation intermediates during incubations of linoleic acid with rumen fluid *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.95, p.1376-1394, 2012.

IP, C. et al. Conjugated linoleic acid–enriched butter fat alters mammary gland morphogenesis and reduces cancer risk in rats. **Journal of Nutrition**, Rockville, v.120, p.2135-2142, 1999.

JAHREIS, G. et al. Conjugated linoleic acids: Physiological effects in animal and man with special regard to body composition. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Berlin, v. 102, p.695-703, 2000.

JENKINS, T. C. et al. BOARDINVITED REVIEW: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.86, p.397-412, 2007.

JENKINS, T. C. et al. Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.86, p.397-412, 2008.

JOUANY, J. P. et al. Dynamic features of the rumen metabolism of linoleic acid, linolenic acid and linseed oil measured *in vitro*. **Lipids**, Champaign, v.42, p.351-360, 2007.

JUTZELER van WIJLEN, R. P.; COLOMBANI, P. C. Grass-based ruminant production methods and human bioconversion of vaccenic acid with estimations of maximal dietary intake of conjugated linoleic acids. **International Dairy Journal**, Barking, v.20, p.433–448, 2010.

KADEGOWDA, A. K. G.; PIPEROVA, L. S.; ERDMAN, R. A. Principal component and multivariate analysis of milk long-chain fatty acid composition during diet-induced milk fat depression. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.91, p.749–759, 2008.

KEMP, P.; LANDER, D. J.; GUNSTONE, N. D. F. D. The hydrogenation of some *cis*- and *trans*-octadecenoic acids to stearic acid by a rumen *Fusocillus* sp. **Brazilian Journal of Nutrition**, Campinas, v.52, p.165-170, 1984.

KEPLER, C. R.; TOVE, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids: Purification and properties of a linoleate Δ^{12} *cis* - Δ^{11} *trans* isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.242, p.5686–5692, 1967.

KEPLER, C. R.; TUCKER, W. P.; TOVE, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. IV. Substrate specificity and inhibition of linoleate Δ^{12} -*cis*, Δ^{11} -*trans* isomerase from *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.245, p.3612-3620, 1970.

LATHAM, M. J.; STORRY, J. E.; SHARPE, M. E. Effect of low roughage diets on the microflora and lipid metabolism in the rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.24, p.871-877, 1972.

KRAMER, J. K. G.; ZHOU, J. Conjugated linoleic acid and octadecenoic acids: Extraction and isolation of lipids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.103, p. 594-600, 2001.

KRAMER, J. K. G. et al. Analysis of conjugated linoleic acid and *trans* 18:1 isomers in synthetic and animal products. **American Journal Of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.79, p.11375-11445, 2004.

LAWSON, R. E.; MOSS, A. R.; GIVENS, D. I. The role of dairy products in supplying conjugated linoleic acid to man's diet: a review. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v.14, p. 72-153, 2001.

LEE, M. R. F.; MARTINEZ, E. M.; SCOLLAN, N. D. Plant enzyme mediated lipolysis of *Lolium perenne* and *Trifolium pratense* in an *in vitro* simulated rumen environment. **Aspects of Applied Biology**, Aberystwyth, v.70, p.115–120, 2003.

LIAVONCHANKA, A. et al. Structure and mechanism of the *Propionibacterium acnes* polyunsaturated fatty acid isomerase. **Processings of the National Academy of Science of the United States of America**, Washington, v.103, p.2576–2581, 2006.

LOCK, A. L.; BAUMAN, D. E. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. **Lipids**, Champaign, v.39, p.1197-1206, 2004.

LOCK, A. L. et al. *Trans*-10 octadecanoic acid does not reduce milk fat synthesis in dairy cows. **Journal of Nutrition**, Rockville, v.137, p.71–76, 2007.

LOOR, J. J. et al. Biohydrogenation, duodenum flow and intestinal digestibility of *trans* fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage: concentrate ratio and linseed oil in dietary cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, p.2472–2485, 2004.

LOURENÇO, M.; RAMOS-MORALES. E.; WALLACE, R. J. The role of microbes in rumen lipolysis and biohydrogenation and their manipulation. **Animal**, Cambridge, v.4, p.1008-1023, 2010.

MAIA, M. R. G. et al. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.91, p.303-314, 2007.

MAIA, M. R. G. et al. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. **BMC Microbiology**, London, v.50, p.1-10, 2010.

MARTIN, S. A.; JENKINS, T. C. Factors affecting conjugated linoleic acid and trans-C18:1 fatty acid production by mixed ruminal bacteria. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.80, p.3347-3352, 2002.

McKAIN, N.; SHINGFIELD, K. J.; WALLACE, R. J. Metabolism of conjugated linoleic acids and 18:1 fatty acids by ruminal bacteria: products and mechanisms. **Microbiology**, Reading, v.156, p.579–588, 2010.

MIGLIETTA, A. et al. Conjugated linoleic acid induces apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells through ERK/MAPK signalling and mitochondrial pathway. **Cancer Letters**, Virginia, v.234, p.149-157, 2006.

MOORE, J. H. et al. Difference in the metabolism of esterified and unesterified linoleic acid by rumen microorganism. **British Journal of Nutrition**, London, v.23, p.869–878, 1969.

NAM, I. S.; GARNSWORTHY, P. C.; Biohydrogenation of linoleic acid by rumen fungi compared with rumen bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v.103, p.551–556, 2007.

Or-RASHID, M. M.; AIZAHAL, O.; McBRIDE, B. W. Comparative studies on the metabolism of linoleic acid by rumen bacteria, protozoa, and their mixture *in vitro*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.89, p.387–395, 2011.

PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C. Fat in lactation rations: review. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.63, p.1-14, 1980.

PALMQUIST, D. L. et al. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans. **Advances in Food and Nutrition Research**, New York, v. 50, p. 179-217, 2005.

PARIZA, M. W. et al. Effects of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. **Cancer Letters**, Virginia, v. 7, p.63, 1979.

PARK, Y. et al. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. **Lipids**, Champaign, v.32, p.853-858, 1997.

PERFIELD, J. W. et al. *Trans*-9, *cis*-11 conjugated linoleic acid (CLA) reduces milk fat synthesis in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.90, p.2211–2218, 2007.

PIPEROVA, L. S. et al. Duodenal and milk trans octadecanoic acid and conjugated linoleic acid (CLA) isomers indicate that post absorptive synthesis is

the predominant source of *cis*-9-containing CLA in lactating dairy cows. **Journal of Nutrition**, Rockville, v.132, p.1235–1241, 2002.

POLAN, C. E.; McNEILL, J. J.; TOVE, S. B. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.88, p.1056-1064, 1964.

QIU, X. et al. Effects of substrate, passage rate, and pH in continuous culture on flows of conjugated linoleic acid and *trans*-C18:1. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.87, p.3473-3479, 2004.

RIBEIRO, C. V. D. M. R. et al. Fatty acid profile of meat and milk from small ruminants: a review. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.40, p.121-137, 2011.

SALTER, A. M.; TARLING, E. J. Regulation of gene transcription by fatty acids. **Animal**, Cambridge, v.4, p.1314-1320, 2007.

SANTOS-ZAGO, L. F. et al. Os efeitos do ácido linoleico conjugado no metabolismo animal: avanço das pesquisas e perspectivas para o futuro. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.21, n.2, p.195-221, 2008.

SHINGFIELD, K. J. et al. Effect of dietary fish oil on biohydrogenation of fatty acids and milk fatty acid content in cows. **Animal Science**, Penicuik, v.77, p.165–179, 2003.

SHINGFIELD, K. J. et al. Effect of forage type and proportion of concentrate in the diet on milk fatty acid composition in cows given sunflower oil and fish oil. **Animal Science**, Penicuik, v.80, p.225–238, 2005.

SHINGFIELD, K. J.; GRIINARI, J. M. Role of biohydrogenation intermediates in milk fat depression. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.109, p.799–816, 2007.

SHINGFIELD, K. J. et al. Effect of abomasal infusions of a mixture of octadecanoic acids on milk fat synthesis in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.92, p.4317–4329, 2009.

SHINGFIELD, K. J. et al. Effect of incremental amounts of fish oil in the diet on ruminal lipid metabolism in growing steers. **British Journal of Nutrition**, London, v.104, p.56–66, 2010.

SHINGFIELD, K.J.; BONNET, M.; SCOLLAN, N. D. Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods. **Animal**, Cambridge, v.7, p.132-162, 2013.

SHINGFIELD, K. J.; WALLACE, R. J. Synthesis of conjugated linoleic acid in ruminants and humans, in *Conjugated Linoleic Acids and Conjugated Vegetable Oils*. In: **CONJUGATED Linoleic Acids and Conjugated Vegetable Oils**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2014. Cap. 1, p.1-65

SCHMID, A. et al. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: A review. **Meat Science**, Champaign, v.73, p.29-41, 2006.

SINGH, S.; HAWKE, J. C. The *in vitro* lipolysis and biohydrogenation of monogalactosyldiglyceride by whole rumen content and its fractions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.30, p.603–612, 1979.

STEWART, C. S.; FLINT, H. J.; BRYANT, M. P. The rumen bacteria. In: HOBSON, P. N.; STEWART, C. S. (Ed). **The Rumen Microbial Ecosystem**. London: Springer, 1997. p. 10-72.

TROEGELER-MEYNADIER, A. et al. Effects of pH and concentrations of linoleic and linolenic acids on extent and intermediates of ruminal biohydrogenation *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.86, p.4054–4063, 2003.

TROEGELER-MEYNADIER, A.; BRET-BENNIS, L.; ENJALBERT, F. Rates and efficiencies of reactions of ruminal biohydrogenation of linoleic acid according to pH and polyunsaturated fatty acids concentrations. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v.46, p.713–724, 2006.

TROEGELER-MEYNADIER, A.; PALAGIANO, C.; ENJALBERT, F. Effects of pH and fermentative substrate on ruminal metabolism of fatty acids during short-term *in vitro* incubation. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Malden, v.98, p.704-713, 2014.

WALLACE, R. J. et al. Isomers of conjugated linoleic acids are synthesized via different mechanisms in ruminal digesta and bacteria. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v.48, p.2247-2254, 2007.

WASOWSKA, I. et al. Influence of fish oil on ruminal biohydrogenation of C18 unsaturated fatty acids. **Brazilian Journal of Nutrition**, Porto Alegre, v.95, p.1199-1211, 2006.

WU, Z.; PALMQUIST, D. L. Synthesis and biohydrogenation of fatty acids by ruminal microorganisms *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.74, p. 3035-3046, 1991.

VAN NEVEL, C. J.; DEMEYER, D. I. Influence of pH on lipolysis and biohydrogenation of soybean oil by rumen contents *in vitro*. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v.36, p.53-63, 1996.

YURAWECZ, M. P. et al. A new conjugated linoleic acid isomer, 7 *trans*, 9 *cis*-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. **Lipids**, Champaign, v.33, p.803-809, 1998.

YURAWECZ, M. P.; KRAMER, J. K. G.; KU, Y. Methylation Procedures for Conjugated Linoleic Acid. In: YURAWECZ, M. P. et al. (Ed.). **Advances in Conjugated Linoleic Acid Research**. Champaign: AOCS Press, 1999. v.1, p.64 –82.

ZENED, A. et al. Starch plus sunflower oil addition to the diet of dry dairy cows results in a *trans*-11 to *trans*-10 shift of biohydrogenation. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.96, p.451–459, 2013.

APÊNDICES

Apêndice 1: Normas para preparação de trabalhos científicos para publicação no periódico *Animal Feed Science and Technology*.

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of article

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Short Communications
4. Book Reviews

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest.

A *Short Communication* is a concise but complete description of a limited investigation, which will not be included in a later paper. Short Communications should be as completely documented, both by reference to the literature and description of the experimental procedures employed, as a regular paper. They should not occupy more than six printed pages (about 12 manuscript pages, including figures, tables and references).

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than two years old. Book reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor:

Professor G. Flachowsky
Federal Research Centre of Agriculture
Institute of Animal Nutrition Bundesallee 50
D-38116 Braunschweig
Germany

Manuscripts describing the use of commercial feed products are welcome, but should include the following information: major components, contents of active ingredients (for example enzyme activities). Independent verification, as opposed to a manufacturers guarantee, is always desirable and often avoids difficulties in the review process, especially where there are no, or few, treatment impacts. The Editors reserve the right to reject any manuscript employing such products, wherein this information is not disclosed.

Submissions concerning feedstuff composition are welcome when published and/or accepted analytical procedures have been employed. However, unusual feedstuffs and/or a wide range of data are pre-requisites. Submissions concerning NIRS may be suitable when more accurate, precise or robust equations are presented. Mathematical, technical and statistical advancement, may constitute the foundation for acceptance. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

Contact details for submission

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can determine the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded: Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)
- Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third

party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information. Elsevier supports responsible sharing Find out how you can share your research published in Elsevier journals

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online. After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is USD 2500, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes

suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more. This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail. Poorly written and/or presented manuscripts (relative to the journal's guidelines) may be returned to authors for upgrading by the editorial office, prior to a review for scientific merit. Before preparing their manuscript, it is suggested that authors examine the editorial by the Editors-in-Chief in Vol. 134/3-4, which outlines several practices and strategies of manuscript preparation that the Editors-in-Chief have found to be successful. This editorial also outlines practices that can lead to difficulties with reviewers and/or rejection of the manuscript for publication. There is also an example of an Animal Feed Science and Technology manuscript available on the journal website at <http://www.elsevier.com/locate/anifeedsci>.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.evis.com/evis/jrnl/ANIFEE>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use past tense for current findings, and the present tense for "truths" and hypotheses

Article Structure

Manuscripts should have numbered lines, with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the

manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered continuously. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. If reference is made to AOAC, ISO or similar analytical procedure(s), the specific procedure identification number(s) must be cited. A number of references for neutral and acid detergent fibre (NDF, ADF) assays exist, and an alternative reference to the now out-of-print USDA Agriculture Handbook 379 must be used. There are many options for NDF and ADF assays (e.g. sodium sulfite, alpha amylase, residual ash), which must be specified in the text. For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

The following definitions should be used, as appropriate:

- a. aNDFom-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- b. NDFom-NDF not assayed with a heat stable amylase and expressed exclusive of residual ash.
- c. aNDF-NDF assayed with a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- d. NDF-NDF assayed without a heat stable amylase and expressed inclusive of residual ash.
- e. ADFom-ADF expressed exclusive of residual ash.
- f. ADF-ADF expressed inclusive of residual ash.
- g. Lignin (sa)-Lignin determined by solubilization of cellulose with sulphuric acid.
- h. Lignin (pm)-Lignin determined by oxidation of lignin with permanganate.

While expressions of NDF and ADF inclusive of residual ash will continue to be acceptable (i.e., the terms aNDF, NDF and ADF above), the Editors-in-Chief highly recommend reporting all fibre values, including digestibilities, on an OM basis. Silica is partially soluble in ND, is quantitatively recovered in AD, and so may contribute to the 'fibre' values and to subsequent digestibility coefficients.

Reporting 'hemicellulose' values as the difference between NDF and ADF is generally only acceptable if the analyses have been sequential on the same sample. Crude fibre (CF), nitrogen-free extract (NFE) and total digestible nutrients (TDN) are not acceptable terms for describing feeds and should only be referred to in a historical context.

Results

Results should be clear and concise

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Combined 'Results and Discussion' sections are only acceptable for 'Short Communications', except under compelling circumstances.

Conclusions The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

The abstract should be clear, descriptive and not longer than 400 words. It should contain the following specific information: purpose of study; experimental treatments used; results obtained, preferably with quantitative data; significance of findings; conclusions; implications of results if appropriate.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article. Acknowledgements Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents for further information. Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. All botica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

SI or SI-derived units should be used throughout (e.g. MJ and not Kcal for energy concentrations). Concentrations should be expressed on a 'per kg' basis (w/w); however, w/v, v/v, mol/mol or M may be accepted depending on the circumstances. In addition, 'units' and 'equivalents' are acceptable. Normality should be avoided, as it may be ambiguous for certain acids. If analytical standards have been used, they should be specified by name (e.g. yeast RNA)

and form (e.g. lactose monohydrate). Percents should only be used when describing a relative increase or decrease in a response. Proportions should be maximum 1.0 or ≤ 1.0 . For more details see the editorial in Vol. 118/3-4.

Percent is only used to indicate relative changes. For composition, both w/w (often solids composition g/kg) and w/v (e.g. g/L), v/v (e.g. mL), mol/mol or M can be accepted depending on the circumstances. Specify units (e.g. g/L) and never as percent.

Digestibility/metabolisability and degradability should always be expressed as a coefficient (not %), and the content of, for example, the digestible component should be expressed as g/kg: thus, the coefficient of digestibility of dry matter is 0.8, while the content of digestible dry matter is 800g/ kg. A distinction between true and apparent digestibility should be made, as well as between faecal and ileal (e.g. coefficient of total tract apparent digestibility - CTTAD). The terms 'availability' and 'bioavailability' should be avoided without definition in context.

In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca^{2+} , not as Ca^{++} . Isotope numbers should precede the symbols e.g. ^{18}O . The repeated use of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text). If differences between treatments are statistically significant, this should be indicated by adding the actual 'P' value obtained. If $0.10 > P > 0.05$, then differences can be considered to suggest a trend, or tendency, to a difference, but the actual 'P' value should be stated. Further information on this issue can be found in Animal Feed Science and Technology Vol. 129/1-2.

Spaces should be used between all values and units, except for the following: Between the value and degrees or percent. In equations around * and /. In probability expressions ($P < 0.05$). When probability values are given, the 'P' should be a capital letter.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.

- Submit each illustration as a separate file. A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format. Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content. All data in figures should have a measure of variation either on the plot (e.g., error bars), in the figure legend itself, or by reference to a table with measures of variation in the figure legend.

Explanations should be given in the figure legend (s). Drawn text in the figures should be kept to a minimum.

If a scale is given, use bar scales (instead of numerical scales) that must be changed with reduction.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of authors' names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. The accuracy of the references is the responsibility of the author (s).

References published in other than the English language should be avoided, but are acceptable if they include an English language 'Abstract' and the number of non-English language references cited are reasonable (in the view of the handling Editor) relative to the total number of references cited.

In the text refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed - if necessary - by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that...". "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp. 12-16)".

If reference is made in the text to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list names of first author and co-authors should be mentioned.

References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically on authors' names, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates - publications of the same author with one coauthor - publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author (s) in the same year should be listed as 2001a, 2001b, etc.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references

can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name (s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/animal-feed-science-and-technology> When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author (s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author*: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ...' List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than

one reference from the same author (s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication: Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.
 Reference to a book: Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.
 Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.
 Reference to a website: Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).
 Reference to a dataset: [dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text. Journal abbreviations source Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Virtual Microscope

The journal encourages authors to supplement in-article microscopic images with corresponding high resolution versions for use with the Virtual Microscope viewer. The Virtual Microscope is a web based viewer that enables users to view microscopic images at the highest level of detail and provides features such as zoom and pan. This feature for the first time gives authors the opportunity to share true high resolution microscopic images with their readers. More information and examples. Authors of this journal will receive an invitation e-mail to create microscope images for use with the Virtual Microscope when their manuscript is first reviewed. If you opt to use the feature, please contact virtualmicroscope@elsevier.com for instructions on how to prepare and upload the required high resolution images.

Additional Information

Authors should use the 'Track Changes' option when revising their manuscripts, so that any changes made to the original submission are easily visible to the Editors. Those revised manuscripts upon which the changes are not clear may be returned to the author.

Specific comments made in the Author Comments in response to referees' comments must be organised clearly. For example, use the same numbering system as the referee, or use 2 columns of which one states the comment and the other the response.

AFTER ACCEPTANCE**Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch. You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.

VITA

Luciano Antônio Ritt, filho de Elmiro Benedito Ritt e Carmen Ritt, nascido em 23 de março de 1988, em Arroio do Tigre, localizado na região Central do estado do Rio Grande do Sul. Coursou as séries iniciais do ensino fundamental no Colégio Sagrado Coração de Jesus e, finalizou na Escola Estadual de Ensino Médio Arroio do Tigre. Coursou o ensino médio no Colégio Cenecista Bom Pastor, em Nova Petrópolis. No ano de 2010, ingressou no curso de graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Santa Maria. Durante os anos de graduação, foi membro do Programa de Ensino Tutorial – PET Zootecnia, sendo também estagiário no Núcleo de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais – NIDAL, sob a orientação do Prof. Dr. José Laerte Nörnberg.

Em fevereiro de 2015, colou grau e, em abril deste ano, ingressou no curso de Mestrado em Produção Animal, do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob a orientação do Prof. PhD. Ênio Rosa Prates e, como tema de dissertação, estudou a “Alteração dos intermediários da bio-hidrogenação do ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12) em função das modificações do meio ruminal *in vitro*”, sendo submetida à banca de defesa, em março de 2017.