

**UNIVERSIDADE DO OESTE DE SANTA CATARINA
UNOESC CAMPUS DE XANXERÊ
CURSO DE MESTRADO EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL
APLICADAS A PEQUENAS PROPRIEDADES**

NEIVA TÂNIA CARNEIRO

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM MICROALGAS (*Schizochytrium limacinum*) PARA VACAS LACTANTES EM SISTEMA ORGÂNICO DE PRODUÇÃO.

**XANXERÊ (SC)
2019**

NEIVA TÂNIA CARNEIRO

SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM MICROALGAS (*Schizochytrium limacinum*) PARA VACAS LACTANTES EM SISTEMA ORGÂNICO DE PRODUÇÃO.

“Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal Aplicadas a Pequenas Propriedades, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal Aplicadas a Pequenas Propriedades da Universidade do Oeste de Santa Catarina.”

Orientador: Prof. Dr. Claiton André Zotti

XANXERÊ (SC)
2019

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
ABAP	2,2'azobis 2 methylpropionamidinedihydrochloride
AC	Antes de Cristo
ACAP	Capacidade antioxidante total do radical peroxila
AG	Ácido Graxo
AGL	Ácidos Graxos Livres
AGMI	Ácido Graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido Graxos Poli-insaturados
AGS	Ácido Graxo Saturado
AL	Ácido Linoleico
ALG	Grupo de Tratamento com Microalga
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCBRH	Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa
C	Carbono
CA-USA	California- Estados Unidos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLA	Ácido Linoleico Conjugado
CON	Controle
°C	Grau Celsius
D	Dia
DHA	Ácidos Docosaexaenóico
EE	Extrato Etéreo
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
FAME	Esteres Metílicos de Ácidos Graxos
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FID	Flame Ionization Detector
g	Gramas
GC-FID	Detector Por Ionização De Grama
GLA	Ácido Gama- Linolênico
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
GSHPx	Glutationa Peroxidase
H₂SO₄	Ácido Sulfurico
IMS	Ingestão de Matéria Seca
Kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de Potássio
MDA	Malondialdehido
Min	Minuto
mL	Mililitro
MM	Matéria Mineral
mm	Milimetro
MS	Matéria Seca
n	Número

NH₃	Amônia
NM	Nanomol
p	P-valor
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPM	Repetição Por Minuto
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UNOESC	Universidade do Oeste de Santa Catarina
ω3	Ômega 3
ω6	Ômega 6

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Composição química da pastagem (mix de grama missioneira gigante e tifton) e rolão de milho fornecidos às vacas em lactação durante todo o período de experimento. _____	27
Tabela 2- Composição de AG de C16 - C18 da pastagem nativa em consórcio com grama missioneira gigante (<i>Axonopus catarinensis Valls</i>) e tifton (<i>Cynodon spp</i>). _____	28
Tabela 3- Composição química do suplemento de microalga. _____	29
Tabela 4- Produção e composição do leite de vacas em lactação em dieta controle e com suplementação com microalgas <i>Schizochytrium limacinum</i> . _____	33
Tabela 6- Efeito da suplementação com microalga <i>Schizochytrium limacinum</i> na concentração de ácidos graxos principais e alguns ácidos graxos biologicamente relevantes no leite. _____	35
Tabela 5- Valores de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e capacidade antioxidante total contra os radicais peroxila (ACAP) de leite e soro de vacas em lactação em dieta controle e com suplementação com microalgas <i>Schizochytrium limacinum</i> . _____	39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Produção de leite orgânico.....	12
2.2 Alimentos nutracêuticos.....	14
2.3 Microalgas na nutrição de ruminantes.....	16
2.4 Metabolismo de lipídios nos ruminantes.....	18
2.5 Dieta e composição do leite.....	21
2.6 Suplementação de AGPI.....	24
3 HIPÓTESE.....	25
4 OBJETIVO GERAL.....	25
5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
7.1 Produção e composição do leite.....	32
7.2 Perfil de ácidos graxos do leite.....	34
7.3 Resultados de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e capacidade antioxidante total contra os radicais peroxila (ACAP) do leite e soro.....	38
8 CONCLUSÃO.....	39
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

Resumo

Este estudo avaliou o efeito da suplementação dietética com a microalga *Schizochytrium limacinum* sobre a produtividade, a composição química, o perfil de ácidos graxos e capacidade antioxidante do leite de vacas em lactação mantidas em sistema de produção orgânica. Oito vacas foram mantidas em pastagem e receberam suplemento de rolão de milho (CTL n=4) com adição de 100 g de microalga (ALG n=4) diária por vaca. A produção de leite não foi alterada ($P = 0,787$), bem como a composição ($P > 0,05$), exceto o percentual de gordura que tendeu a reduzir com o uso de microalgas ($P = 0,084$). As medidas antioxidantes de ACAP e TBARS do sangue e leite não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$). Uso de microalga causou redução ($P \leq 0,0001$) do teor de ácido esteárico em 2,46 vezes e aumento de ácido vacênico ($P \leq 0,0001$) e CLA ($P = 0,0196$) na gordura do leite na ordem de 3,3 e 1,8 vezes, respectivamente. Também aumentou os teores totais de AGPI ($P = 0,048$), da relação AGPI/AGMI ($P = 0,013$) e tendeu a aumentar a relação AGPI/AGS ($P = 0,073$). O uso de microalgas ricas em $\omega 3$ demonstrou ser um método adequado de enriquecimento do leite orgânico, sem afetar negativamente a produção de leite e de seus componentes e sem no entanto favorecer a oxidação do leite.

Palavras-chave: antioxidante, ácidos graxos poli-insaturados, enriquecimento do leite, suplementação lipídica

Supplementation diet with microalgae (*Schizochytrium limacinum*) to lactating cows under organic production system.

Abstract

This study aimed to evaluate microalgae supplementation of *Schizochytrium limacinum* to dairy lactating cows rearing under organic production system and its effects on milk yield and composition, fatty acid profile and antioxidant capacity of milk and serum. Eight lactating cows were kept in pasture and divided in two groups: fed corn cob as supplement twice a day during milking (CTL n=4) and corn cob mixed with 100 g of microalgae (ALG n=4) per cow daily. Milk yield did not change ($P = 0.787$) when microalgae was used as well as milk composition ($P > 0,05$), except the percentage of milk fat that tended to decreased in ALG treatment ($P = 0.084$). Antioxidant parameters of serum and milk ACAP and TBARS were not affect between treatments ($P > 0.05$). The level of stearic acid in the milk of cows fed ALG was lowered ($P \leq 0.0001$) 2.46-fold, whereas levels of vaccenic acid ($P \leq 0.0001$) and CLA ($P = 0.0196$) were elevated by 3.3 and 1.8-fold, respectively. Also, increased on polyunsaturated FA ($P = 0.048$), PUFA:MUFA ratio ($P = 0.013$) were observed in ALG treatment, while MUFA:SFA ratio showed a tendency to increased ($P = 0.073$). Microalgae rich in ω -3 showed as a reliable tool that successful enrichment of organic milk without negatively affecting productivity, milk composition and antioxidation status.

Key-words: antioxidant, milk enrichment, polynsaturated fatty acids, lipid supplementation

DEDICO,

À meus pais, por serem avós presentes e maravilhosos nos momentos que precisei deixar meu maior tesouro, à minha irmã por me ajudar na prática a desenvolver este trabalho, à meu marido pelo apoio imensurável em todas as etapas desse trabalho, à minha filha Alice pela criança maravilhosa e compreensiva mesmo ainda sendo um bebê. À todos que torceram pela minha vitória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e a oportunidade concedida de poder sempre alcançar de uma forma ou outra meus objetivos, iluminando os meus passos e dando-me forças nos momentos em que me encontrei incapaz de prosseguir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claiton André Zotti, por todo apoio durante a realização de meu trabalho. Meu muito obrigada pela oportunidade, pela amizade, pelos conselhos e ensinamentos dedicados sem os quais não seria possível a realização deste trabalho.

Ao Programa de Mestrado em Sanidade e Produção Animal Aplicadas a Pequenas Propriedades, a todos os professores, pelos ensinamentos e oportunidades, em especial ao Prof. Dr. César Augustus Winck que me convidou e incentivou a entrar nesta batalha do mestrado, mesmo sabendo de minhas dificuldades acreditou que eu seria capaz.

Ao Fundo de Apoio à Manutenção e ao Desenvolvimento da Educação Superior. (Fumdes) pela bolsa de estudos concedida.

À família do Sr. Marcos Fornazier, pela receptividade e por conceder que a pesquisa fosse realizada em sua propriedade orgânica.

Aos professores Aleksandro Silva da Udesc-CEO e Roger Wagner da UFSM e equipe pela cooperação e auxílio na condução das análises laboratoriais.

A Alltech pelo fornecimento da microalga, para a realização deste estudo.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente na realização deste projeto e contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

1 INTRODUÇÃO

O interesse em produtos orgânicos tem aumentado em todo o mundo, em razão da recente preocupação dos consumidores com a segurança alimentar e com a degradação do meio ambiente causada pelo uso de substâncias químicas com capacidade residual (Dragincic *et al.*, 2015).

No mundo são aproximadamente 43,7 milhões de hectares cultivados de forma orgânica, sendo 40% na Oceania, 27% na Europa, 15% na América Latina, 8% na Ásia, 7% na América do Norte e 3% na África. No entanto, quando se avalia em termos da razão entre a área onde se realiza a agricultura orgânica e a área agricultável total, os valores são ainda modestos, pois atualmente esta razão em nível mundial é de apenas 1%, com maior destaque à Oceania (4,1%) e Europa (2,4%) (Willer e Lernoud, 2016).

Em 2017, a área de produção de orgânicos no Brasil chegou a 1,1 milhões de hectares, quase o dobro do que havia há quatro anos (MAPA, 2018). Países como Estados Unidos, Alemanha, França e Inglaterra apresentam-se como grandes varejistas alcançando valores expressivos (Willer e Lernoud, 2016). Segundo a *Organic Trade Association* (OTA, 2018) 83% das famílias norte americanas compram produtos orgânicos, o que representam 5% do total de vendas dos alimentos no varejo.

Os sistemas orgânicos de produção de leite são modelos que buscam a sustentabilidade da produção, que preconizam práticas de manejo e menor dependência de insumos externos à propriedade. Leva em conta a adaptação às condições regionais, usam práticas zootécnicas e agronômicas, métodos mecânicos e biológicos, em detrimento do uso de materiais sintéticos, sem deixar de lado a segurança, a produtividade e a rentabilidade para o produtor, onde todos os princípios de uso responsável dos recursos naturais podem ser aplicados (Soares *et al.*, 2006).

O apelo pelo leite orgânico criou uma crescente participação de mercado nos últimos anos. Nesta situação, muitas regiões agrícolas do mundo experimentaram uma revolução orgânica para responder a essa demanda. Em 2015, até 12% de todos os produtos lácteos pertenciam ao mercado dos produtos lácteos orgânicos da União Europeia (Willer e Lernoud, 2017). A produção de leite orgânico foi de 4,4 milhões de toneladas em 2015, o que é quase o dobro do volume de 2007. No entanto, ainda há

oferta insuficiente devido à produção limitada em sistemas orgânicos, e assim o preço do litro de leite é adquirido por valores atrativos (Mcfadden e Huffman, 2017).

Além da crescente busca dos consumidores por produtos com comprovada rastreabilidade de qualidade desde a origem e com menor uso de insumos químicos e agrotóxicos (Cusatto *et al.*, 2014), a demanda de produtos enriquecidos que tenham benefícios adicionais à saúde também é um nicho de mercado em expansão.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimento enriquecido ou fortificado é todo aquele ao qual for adicionado um nutriente com a finalidade de reforçar seu valor nutricional, seja repondo quantitativamente os nutrientes destruídos durante o processamento do alimento, seja suplementando-os com nutrientes em nível superior ao seu conteúdo normal. O enriquecimento do leite a partir do fornecimento de fontes concentradas de ômega 3 pode ser uma alternativa para diferenciar o produto no mercado. Neste sentido a procura por produtos com maiores níveis de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), especialmente em países desenvolvidos e classes sociais melhor remuneradas (Zymon *et al.*, 2014) tem sido crescente. Os AGPI ω 3 tem sido pesquisados na nutrição humana pelo seu papel crítico na função e estrutura do cerebral e saúde (Mischoulon e Freeman, 2013), bem como protetor contra doenças cardiovasculares e potencializador do sistema imune (Fard *et al.*, 2018).

Excelente fonte de AGPI ω 3 essenciais, especialmente ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácidos docosaexaenóico (DHA) é o óleo de peixe (Kolanowski e Laufenberg, 2006), porém o consumo per capita de peixe no Brasil é de apenas 9,5 kg, perante média mundial de 20 kg (FAO, 2018). Dessa forma, a estratégia de enriquecimento de produtos de origem animal com AGPI ω 3 pode ser uma alternativa para alcançar os níveis de ingestão recomendados (250 a 500 mg por dia) (Kus, 2010).

Um produto a ser enriquecido é o leite, sabe-se que a atividade leiteira vem ampliando seu volume produtivo ano após ano, especialmente na região Oeste Catarinense (IBGE, 2018), promovendo mudanças nos sistemas de produção, incorporando novas tecnologias as suas unidades produtivas. Dentre as técnicas, a produção de leite à base de pastagem ganha destaque por ser um dos sistemas produtivos que se enquadra às técnicas de produção ecológica, e é uma das bases para a produção de leite orgânico.

A produção de leite a partir do consumo predominante de forragem fresca aumenta o conteúdo de AG não saturados, benéficos à saúde, quando comparado à leite de vacas em confinamento (Vahmani *et al.*, 2013a), porém a gordura do leite é praticamente desprovida de AGPI ω 3, especificamente EPA e DHA (Vahmani *et al.*, 2013b).

Fonte de AGPI ω 3 que tem sido muito pesquisada na última década, as microalgas heterotróficas (produzidas por meio de biorreatores) são fonte, principalmente de DHA, e são utilizadas como estratégia nutricional para o enriquecimento do leite bovino (Glover *et al.*, 2012; Stamey *et al.*, 2012; Sinedino *et al.*, 2017; Till, 2018).

Partindo do princípio que consumidores buscam produtos de qualidade, produtos orgânicos e produtos enriquecidos, objetivou-se em juntar estas qualidades a um único produto, obtendo-se então um leite de qualidade, orgânico e enriquecido.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Produção de leite orgânico

Ressalta-se que a produção de leite orgânico não é prática tão difundida no Brasil, sendo bastante restrita principalmente devido às dificuldades técnico-produtivas e de valorização do produto (Nogueira *et al.*, 2018).

A certificação orgânica assegura um sistema com procedimentos bem definidos e regulados por normas. Duas entidades, o International Federation of Organic Agriculture Movement (IFOAM) e o Codex Alimentarius tentam estabelecer padrões internacionais mínimos para o sistema de produção orgânico, com vistas a reduzir assimetrias e promover o comércio entre os países (Nogueira *et al.*, 2018).

Na produção orgânica pressupõe-se que, além de primar pela saúde animal, é necessário que o pecuarista esteja preocupado com a preservação ambiental e ofereça boas condições de trabalho e de vida a seus funcionários (Soares *et al.*, 2014). Por isso, é preciso observar que este sistema não é obtido somente na troca de insumos químicos por insumos orgânico, biológico ou ecológicos, mas também cuidados com a

alimentação do rebanho, as instalações e o manejo humanitário, a escolha de animais, a sanidade e até os cuidados higiênicos sanitários durante o processamento e empacotamento do produto (Aroeira *et al.*, 2003).

Além disso, leva-se em consideração o bem-estar do animal e da família como um todo, bem como a saúde de quem vai consumir os produtos, respeito ao meio ambiente e a ausência do uso de agrotóxicos (Nogueira *et al.*, 2018).

Contudo, é imprescindível destacar que os sistemas de produção orgânicos envolvem uma visão holística da propriedade, onde animais e vegetais se mantêm num manejo integrado em harmonia, reciclando nutrientes e gerando relações químicas e biológicas complexas. Essas relações necessitam ser esclarecidas de maneira científica, para agregar tecnologias às cadeias produtivas e diminuir o empirismo que envolvia a produção orgânica, proporcionando o avanço do conhecimento e maior oferta nos mercados nacionais e internacionais (Soares, 2014).

Os maiores entraves para o desenvolvimento da produção orgânica de leite referem - se à produção de forragem e cereais para a alimentação animal, e a sanidade animal. Para a alimentação a limitação se dá face ao pequeno tamanho das propriedades, à escassez de concentrado orgânicos para suplementação alimentar durante o período de menor oferta de forragens, à baixa fertilidade do solo nas áreas de pastagens, à baixa adoção da prática da adubação verde e ao clima desfavorável em determinadas épocas do ano (Soares, 2006).

Por outro lado, existe uma série de alimentos alternativos, não convencionais com características orgânicas que podem ser produzidos nas propriedades rurais orgânicas com objetivo de diversificação ou rotação de culturas, fixação de nitrogênio, gestão do nitrogênio e do carbono, melhoria da estrutura do solo, sendo combinados para produção de rações de ruminantes, entre eles a mandioca, os feijões silvestres, a cana-de-açúcar, o farelo de arroz, o farelo de trigo, soja orgânica, milho orgânico e as pastagens consorciadas (gramíneas e leguminosas) (Aroeira *et.al.*, 2003). Da nutrição dos animais em manejo orgânico, de acordo com o Art. 29 da legislação federal, os animais deverão utilizar alimentação da própria unidade de produção ou de outra sob manejo orgânico, sendo permitido até 15% da MS de alimento não orgânico, não podendo ser o alimento de origem transgênica.

Os aditivos e os auxiliares tecnológicos utilizados devem ser provenientes de fontes naturais e não poderão apresentar moléculas de DNA / RNA recombinante ou proteína resultante de modificação genética em seu produto final. Outras substâncias podem ser utilizadas se estiverem de acordo com a legislação e estabelecidas no plano de manejo orgânico (MAPA, 2011).

Cabe enfatizar que o processo de certificação da produção orgânica animal compreende um período de aproximadamente 18 a 24 meses, de acordo com a LEI Nº 10.831, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2003 (Brasil, 2003).

2.2 Alimentos nutracêuticos

O termo nutracêutico vem de “nutri”, nutriente e “cêutico” de farmacêutico, ou seja, alimentos que nutrem e promovem a saúde por meio da prevenção e/ou tratamento de doenças, mas não é reconhecido como categoria de alimentos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. No entanto vem sendo utilizado por alguns cientistas no sentido de mostrar o alimento com ação de medicamento, ou seja, retornando aos escritos de Hipócrates (460-370 AC) que já afirmava: “Deixe o alimento ser o seu remédio e o remédio seu alimento” (Cozzolino, 2012).

O nutracêutico é um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde. Tais produtos podem abranger desde os nutrientes isolados, suplementos dietéticos na forma de cápsulas e dietas até os produtos benéficamente projetados, produtos herbais e alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas Andlauer e Fürst (2002); Kwak e Jukes (2001a).

Zeisel (1999) definiu nutracêuticos como: suplementos alimentares que contêm a forma concentrada de um composto bioativo de alimento, apresentado separadamente da matriz alimentar e utilizado com a finalidade de melhorar a saúde, em doses que excedem aquelas que poderiam ser obtidas nos alimentos

Hoje, os consumidores de alimentos estão mais preocupados com relação à concentração de AGS, associada à presença de colesterol. Esse aspecto é de suma importância no que se refere à composição da gordura dos produtos lácteos. O aumento de AGI, juntamente com a redução dos saturados, favorável à redução do colesterol sanguíneo, causaria um impacto positivo na nutrição humana, mais especificamente na

prevenção de doenças crônicas degenerativas, além de melhorar a imagem dos produtos lácteos junto aos consumidores (Oliveira, 2018).

Entre os benefícios estudados, a microalga por conter EPA e DHA apresenta benefícios à saúde humana como: com capacidade de regulação de neurotransmissores, neurogênese, sobrevivência celular e neuroinflamação (Mischoulon e Freeman, 2013) prevenção de doenças cardiovasculares e ação potencializadora no sistema imune (Fard *et al.*, 2018) com recente atuação na prevenção da ansiedade (Natacci, 2019) objeto de muitas pesquisas relacionadas à melhora da qualidade de vida.

Em humanos há a possibilidade da conversão do ácido linoleico em longas cadeias por dessaturação e alongação dos AG, e o α -linolênico pode ser convertido em EPA e DHA. Entretanto, a taxa de conversão é baixa, e diminui ainda mais à medida que o ácido linoleico aumenta, sendo extremamente importante a ingestão de fontes de AG ω 3 na dieta. (Perini *et al.*, 2010)

No estudo realizado por Stergiadis *et al.* (2019) o leite orgânico apresentou mais AGPI nutricionalmente desejáveis, incluindo o ácido rumênico (CLA) e os ácidos α -linolênico, EPA e DHA, e menor quantidade de ácido palmítico nutricionalmente indesejável.

O CLA com isômeros *cis* do leite são oriundo da biohidrogenação incompleta do ácido linoleico (C18:2) no rúmen pelas bactérias e ação das enzimas dessaturases da glândula mamária. É um AG muito importante para quem consome, pois apresenta propriedades anti-mutagênicas, anti-carcinogênicas, anti-diabéticas, anti-obesidade e anti-hipertensiva, prevenção de aterosclerose, melhora do sistema imunitário (Viladomiu *et al.*, 2016). Portanto, aumentar sua concentração na gordura do leite, destinado à produção de derivados lácteos, através da suplementação lipídica é benéfico (Augustinho, 2017).

A agricultura moderna, ao mudar a alimentação animal como resultado de sua ênfase na produção, diminuiu o conteúdo de AG ω 3 em muitos alimentos: carnes de animais, ovos e até mesmo peixes. A aquicultura moderna produz peixes que contêm menos AG ω 3 do que peixes cultivados naturalmente nos oceanos, rios e lagos. Isto aumenta a dependência de ingestão de outras fontes de AGPI ω 3, ou de alimentos enriquecidos para atender a ingestão mínima diária preconizada para humanos. (Oliveira *et al.*, 2010)

2.3 Microalgas na nutrição de ruminantes.

De acordo com Richmond (2004) as microalgas estão presentes em todos os ecossistemas existentes na terra, representando uma variedade grande de espécies que vivem em condições extremas. Dentre o grande número de espécies existentes, aproximadamente 30.000 foram pesquisadas. Devido à peculiaridade de crescimento, algumas microalgas foram selecionadas para produção em larga escala, como a *Chlorella*, *Spirulina*; *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Schizochytrium*, *Scenedesmus*, *Aphanizomenon*, *Odontella* e *Porfirídio* (Almeida e Menezes, 2017). Com aplicabilidade para o mercado de nutrição humana e também animal. As microalgas utilizadas na nutrição animal são predominantemente dos gêneros: *Chlorella*, *Spirulina* e *Schizochytrium*. O cultivo delas é do tipo heterotrófico, ou seja, não realizam fotossíntese, mas recebem alimento para crescer, em fotobiorreatores, sob condições controladas (Embrapa, 2016).

As microalgas, pesquisadas desde a década de 50, são fontes de biomassa e biomoléculas com propósito alimentar, conhecidas por seu perfil de AGPI, como os $\omega 3$ - DHA e EPA – e $\omega 6$ - ácido araquidônico (AA), e gama-linolênico (GLA). (Connor, 2000).

Segundo Ryckebosch *et al.*, (2014); Spalaore *et al.*, (2006); Chen *et al.*, (2013); de maneira geral as microalgas são compostas por: 39-71% de proteína bruta, 10- 57% de carboidratos, principalmente polissacarídeos, celulose e amido e 6-86% de lipídios, principalmente esteróis e AGPI de cadeia longa.

Os benefícios para a saúde associados ao consumo de ácidos graxos $\omega 3$ (ácido linolênico) e $\omega 6$ (ácido linoleico) são massivamente discutidos em todos os meios de comunicação voltados a saúde humana. Além desta aplicabilidade, nos últimos anos vem se estudando como esses AG podem ser usados na produção animal, buscando favorecer este setor (Tomaluski *et al.*, 2018) que por ser um grande produtor de alimentos está intimamente ligado com a saúde humana.

Pesquisas vem sendo realizadas com a suplementação animal, Altomonte *et al.* (2018) demonstram a expectativa de crescimento da população mundial e demanda por alimentos, a pesquisa por alimentos alternativos ao uso daqueles considerados convencionais na alimentação animal adquire relevância, uma vez que eles, em sua

grande maioria, fazem parte do cardápio alimentar da população humana e que pode num futuro próximo se tornar motivo de competição para alimentar “homens e animais”. Muitos alimentos e aditivos antigamente de uso restrito aos monogástricos, vêm sendo testados, de forma a definir sua aplicabilidade e limitação para ruminantes.

Dentre os alimentos alternativos utilizados atualmente na alimentação de ruminantes e monogástricos, destacam-se subprodutos, como os da indústria de óleo de palma e da indústria de processamento de milho, beterraba, colza e soja. Além destes, o uso de alimentos de origem não-vegetal, como inseto já vem sendo pesquisado para monogástricos como fonte barata de proteína Altomonte *et al.* (2018); Marques *et al.* (2018).

As microalgas também estão recebendo destaque e interesse das pesquisas atualmente, com ampla utilização na indústria alimentícia de animais aquáticos, aves, suínos, ruminantes e humanos (Marques *et al.*, 2018).

O uso de microalgas em dietas de animais tem efeitos benéficos a saúde, melhorando imunidade, fertilidade e saúde geral, além de enriquecer naturalmente da carne, leite ou ovos diversificando produtos Glover *et al.* (2012); Silva (2018); Tomaluski *et al.* (2018).

Glover *et al.* (2012) estudaram a adição de uma microalga rica em DHA (100 g/dia) nas dietas de vacas leiteiras, contendo pastagens ou silagem de milho como volumoso. A adição de microalgas à dieta não afetou o consumo de matéria seca, a produção de leite e os teores de proteína e lactose, mas reduziu o teor de gordura do leite e aumentou as concentrações de DHA na gordura do leite mais de 4 vezes (0,06 a 0,26 g / 100 g de AG).

Dentre as microalgas, a *Schizochytrium limacinum* apresenta bom perfil de ácidos graxos, com 27,20 % do ácido graxo DHA (do tipo ω 3), 54,69 % de ácido palmítico e teor de proteína bruta de 19,22 % (Alltech, 2014).

Segundo Silva (2018) que utilizou a *Schizochytrium limacinum* na dieta de cordeiros, a inclusão de 4% de microalgas com ou sem adição de vitamina E não alterou os resultados de consumo, balanço de nitrogênio e desempenho. No entanto, foram observados maiores digestibilidade do extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA), demonstrando que a microalga pode ser alternativa para uso na dieta de cordeiros em sistemas de produção intensiva.

Entretanto, essa suplementação modifica a biohidrogenação ruminal de C 18: 2 ω 6 e C18:3 ω 3, bem como a população microbiana ruminal em ruminantes adultos. O DHA inibe a etapa final da biohidrogenação à C18:0, o que resulta no acúmulo de isômeros de C18:1, principalmente C18:1 trans 11. Alguns estudos também observaram um aumento de C18:1 trans10 após a suplementação dietética de DHA o que pode indicar uma mudança a partir da via de biohidrogenação principal para a formação de intermediários como trans 10, às custas de trans 11. Em ruminantes em lactação, esses intermediários (por exemplo, CLA trans 10, cis 12 - ácido linoleico conjugado) podem inibir a síntese da gordura do leite na glândula mamária. (Dewanckele *et al.*, 2018).

Boeckert et al. (2006), ao avaliarem a taxa de biohidrogenação de ácidos graxos insaturados com inclusão de algas marinhas *Schizochytrium* em concentrações de 20,8, 41,6 e 83,3 mg/60kg MS/dia em combinação com 20 mg de óleo de girassol ou óleo de linhaça em ensaios com incubações *in vitro* de 25 mL, constataram diminuição gradativa da biohidrogenação do ácido graxo C18:2 ω 6, com acúmulo de C18:1 no líquido ruminal, corroborando estes resultados em um segundo experimento, em que aumentos no acúmulo de C18:2 trans 11 cis 15 e, em menor proporção, de C18:1 trans 10 cis 11 foram reportados.

Os mesmos autores supracitados realizaram estudo em vacas leiteiras canuladas no rúmen, e reportaram concentrações mais baixas de ácidos graxos saturados, enquanto as concentrações de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e AGPI aumentaram significativamente no líquido ruminal de animais alimentados a base de dietas com adição de 4,3% de microalgas *Schizochytrium* em comparação com o tratamento controle. A biohidrogenação incompleta dos ácidos linoléico (C18:2 ω 6) e linolênico (C18:3 ω 3) foi observada, resultando em forte acúmulo de C18:1 trans 11, C18:1 trans 10, C18:2 trans 11 C15 e C22:6 ω 3 oriundo da dieta.

2.4 Metabolismo de lipídios nos ruminantes

A dieta dos ruminantes contém geralmente 20 a 40 g de lipídios /kg matéria seca (MS). Os lipídios da dieta destes animais derivam dos alimentos vegetais, que constituem o principal componente da sua alimentação. A fração lipídica encontra-se predominantemente esterificada – galactolipídios e fosfolipídios nas forragens e triglicerídeos nos alimentos concentrados, como os grãos de cereais e bagaços de

oleaginosas e é constituída principalmente por AGPI, como o ácido linolênico nas forragens ou o ácido linoleico em alimentos concentrados (Ferreira, 2016).

Lipídios utilizados na alimentação de ruminantes aumentam a capacidade de absorção de vitaminas lipossolúveis, fornecem ácidos graxos essenciais importante para a membrana de tecidos e atuam como precursores da regulação do metabolismo, além de aumentar a eficiência dos animais que depositam grande quantidade de gordura em seus produtos (Gomes, 2018).

A microbiota do rúmen é limitada para utilização de substâncias altamente redutoras como fonte de energia, e o uso de ácidos graxos são restritos para a incorporação celular e propósitos sintéticos. Ruminantes e monogástricos diferem na proporção e composição de AGPI no tecido adiposo e no músculo porque, enquanto estes são praticamente inalterados durante a digestão nos monogástricos e incorporados diretamente nos tecidos, nos ruminantes são extensamente biohidrogenados pelos microrganismos do rúmen. Esta ação microbiana resulta, geralmente, em níveis baixos de AGPI da dieta disponíveis para serem absorvidos nos tecidos corporais, depois de passarem pelo rúmen onde grande parte é transformada em outros AG (Wood *et al.*, 2008).

Os ruminantes são caracterizados pela sua elevada capacidade de transformação dos alimentos ingeridos no rúmen antes de chegarem ao intestino delgado e serem absorvidos e utilizados para produzir tecidos ou produtos como carne e leite. Os lipídios provenientes da dieta são extensamente alterados no rúmen, pela ação dos microrganismos, através de dois processos conhecidos como lipólise e biohidrogenação, sendo este fenômeno responsável pelo baixo teor de AGPI e alto teor de ácidos graxos saturados (AGS) nos produtos provenientes dos ruminantes (Demeyer e Doreau, 1999).

Após a ingestão ocorre a lipólise, ou igualmente designada por hidrólise, dos lipídios da dieta por ação física de enzimas, denominadas lipases, associadas à membrana celular das bactérias (Demeyer e Doreau, 1999), liberando glicerol, galactose e AG. Estas enzimas hidrolisam preferencialmente as ligações éster dos triglicerídeos, fosfolipídios e glicolipídios, levando à produção de diglicerídeos e ácidos graxos livres (AGL) (Shingfield *et al.*, 2010). A galactose e o glicerol são fermentados e prontamente metabolizados passando a ácidos graxos de cadeia curta (Oliveira, 2007). Os AGPI provenientes da dieta são liberados durante a lipólise, e ficam disponíveis para o

processo de biohidrogenação. A extensão da lipólise depende da natureza da gordura fornecida, sendo que os óleos vegetais são hidrolisados quase a totalidade (Bessa, 2015).

A biohidrogenação refere-se ao conjunto de metabolizações que os ácidos graxos insaturados podem sofrer no rúmen, e incluiu não só as hidrogenações, mais também as isomerizações que as acompanham. Os lipídeos quando entram no rúmen fazendo parte dos constituintes vegetais terão sua liberação conforme vai ocorrendo o processo fermentativo dos demais componentes como carboidratos, proteínas e fibra. Como não sofrem processo de fermentação, poderá em algumas situações passarem sem grandes alterações pelo rúmen, mas grande parte destes sofrerá ação por parte das bactérias ruminais num processo chamado de hidrólise e outro denominando biohidrogenação. Só posteriormente à hidrólise é que ocorre a biohidrogenação ruminal dos AGPI, uma vez que para que esta ocorra é necessário que os ácidos graxos se encontrem na sua forma livre (não esterificada) (Ferreira, 2016).

A partir dessa exposição ao meio os lipídeos são rapidamente hidrolisados por ação das enzimas lipases bacterianas e com contribuição por parte dos protozoários do rúmen, fungos ou saliva e lipases das plantas. A hidrólise dos lipídeos é extracelular, e o glicerol e os açúcares que são liberados são rapidamente fermentados a ácidos graxos voláteis (Berchielli *et al.*, 2006).

Os ácidos graxos devem estar na forma não esterificada ou livres para que ocorra a biohidrogenação. Esta transformação consiste em saturar os ácidos graxos com ligações duplas (insaturados) colocando hidrogênio na cadeia carbônica ficando apenas com ligações simples. Certos ácidos graxos, especialmente os poliinsaturados, são tóxicos para as bactérias ruminais. As mais susceptíveis são as bactérias Gram positivas, metanogênicas e protozoários. A toxicidade está relacionada à natureza anfipática dos ácidos graxos, ou seja, aqueles que são solúveis, tanto em solventes orgânicos como em água, são mais tóxicos. Portanto, como um mecanismo de defesa, a biohidrogenação torna-se um evento muito importante no rúmen, portanto, o extensivo metabolismo dos ácidos graxos insaturados no rúmen resulta como principal produto o ácido esteárico, que passará ao abomaso e ao intestino onde será absorvido (Jenkins, 2008). O normal processo da biohidrogenação dos ácidos oléico, linoleico e linolênico formará ácido esteárico, mas em algumas ocasiões ocorrem alterações nessa rota e o produto final

poderá ser alguns ácidos graxos *trans* como consequência da incompleta biohidrogenação daqueles ácidos graxos (Gonzales *et al.*, 2006).

2.5 Dieta e composição do leite

A adição de lipídios na dieta de animais lactantes tem recebido atenção nos últimos anos, principalmente devido ao aumento da produção de leite e consequente necessidade de se aumentar o nível de energia na alimentação (Santos, 2016).

Para aumentar a concentração energética da dieta, é necessário aumentar a proporção de alimentos concentrados. Contudo, o fornecimento máximo de concentrado deve ser limitado, respeitando a necessidade de um nível mínimo de fibra para o funcionamento ideal do rúmen-retículo e manutenção dos teores de gordura do leite (Santos, 2016).

A relação volumoso:concentrado é importante, pois a sua queda causa incremento na quantidade de carboidratos não fibrosos de alta fermentabilidade ruminal (especialmente amido), que provocam redução no pH ruminal mediante o aumento dos ácidos orgânicos produzidos. Conseqüentemente, pode ocorrer redução na formação de precursores (glicose, acetato, *B*-hidroxibutirato a partir de butirato) para a síntese “de novo” na glândula mamária, resultando em redução dos AGs de cadeia curta e média (C6:0 a C16:0) e aumento na proporção de AGs de cadeia longa (C18:1 e C18:2).

Estima-se que 25% dos ácidos graxos do leite de vacas são provenientes da dieta e 50% do plasma sanguíneo. A glândula mamária de ruminantes sintetiza quantidades muito pequenas de AG a partir da glicose, pois apresenta atividade muito baixa da enzima citrato liase. Isto faz com que o citrato proveniente do metabolismo da glicose na glândula mamaria seja transformado muito lentamente em acetil CoA, o qual é utilizado na síntese de ácido graxo. O acetil CoA utilizado pela glândula mamária dos ruminantes para a síntese de gordura se forma fundamentalmente a partir do acetato, no citoplasma. Estima-se que 30% dos carbonos da gordura do leite sejam provenientes do acetato. (González, 2001)

Além disso, a queda do pH ruminal reduz imediatamente a lipólise e a biohidrogenação ruminal dos ácidos graxos. Dessa forma, há aumento no fluxo de

ácidos graxos insaturados C18:1 trans para o intestino delgado e para a glândula mamária (Palmquist e Beaulieu, 1993).

O uso de óleo em rações para ruminantes apresenta efeitos desejáveis, como inibição da produção de metano, redução da concentração de NH₃ ruminal, aumento na eficiência da síntese microbiana e aumento de CLA no leite, que tem sido considerado um importante agente anticarcinogênico (Lin *et al.*, 1995). Por outro lado, o óleo apresenta efeitos indesejáveis, como a redução na digestibilidade da matéria seca (MS) e redução da gordura do leite (Vargas *et al.*, 2002)

No entanto, alguns tipos de gorduras suplementares podem alterar a composição e as características físico-químicas do leite, como no caso daquelas com elevado teor de ácidos graxos insaturados (AGI). Santos *et al.*, (2001), quando estudaram o efeito de fontes de lipídeos (óleo de soja e soja integral moída) sobre o perfil de ácidos graxos da gordura do leite, principalmente sobre a concentração de CLA, observaram que a suplementação com óleo de soja aumentou o percentual de CLA, comparada a suplementação com grão de soja. Isto ocorreu, provavelmente, devido ao fato de os ácidos linoléico e linolênico estarem mais disponíveis para serem biohidrogenados e, assim, formarem o CLA durante a fase de isomerização. Isso demonstra que a adição de óleo não protegido à dieta aumenta o teor de CLA, conforme observado por McGuire *et al.* (1996) e Griinari *et al.* (1996).

Segundo Griinari *et al.* (1998), situações dietéticas em que o ambiente ruminal é alterado, por exemplo, baixa fibra fisicamente efetiva e alta quantidade de grãos podem reduzir o pH ruminal e alterar a população microbiana causando desvio das rotas usuais de biohidrogenação ruminal, alterando a formação de cis-9 trans-11 C18:2 e trans-11 C18:1 para a formação de trans-10 cis-12 C18:2 e trans-10 C18:1 como principais intermediários da biohidrogenação do ácido linoleico.

Os isômeros C18:2 trans-10 cis-12 e C18:1 trans-10 estão envolvidos na inibição da atividade das enzimas acetil CoA carboxilase e ácido graxo sintetase na glândula mamária, responsável pela síntese de novo dos AG com até 16 carbonos Piperova *et al.*, (2000); Baumgard *et al.*, (2002). AG com insaturação conjugada não são normalmente constituintes da dieta do rebanho leiteiro. O CLA é formado no rúmen como um primeiro intermediário da biohidrogenação do ácido linoleico pela enzima ácido linoleico isomerase, proveniente de bactérias anaeróbicas ruminal *Butyrivibrio*

fibrisolvens, *Butyrivibrio hungatei* e *Clostridium proteoclasticum* que isomeriza o ácido linoleico, preferencialmente para as formas cis 9 e trans 11 Kepler *et al.* (1966); Parodi (1997). Os protozoários ciliados tem sido apresentados como participantes da biohidrogenação ruminal, tendo sua população reduzida quando houve suplementação com microalgas (Boeckert *et al.*, 2007).

A composição de ácidos graxos do leite integral em sistema orgânico em relação ao sistema convencional a pasto e confinado foi comparado por Jahreis *et al.* (1997) e Bergamo *et al.* (2003). O leite orgânico apresentou maior conteúdo de CLA - 0,80% do total de ácidos graxos em comparação com 0,34% do convencional confinado e 0,61% do sistema convencional a pasto. De acordo com estes autores, a razão para o maior conteúdo de CLA no leite orgânico se deve ao maior teor de AGPI presentes na dieta de animais manejados nesse sistema. Este permitiria a possibilidade de maior formação de CLA pela biohidrogenação das bactérias ruminais. Outra razão seria o maior teor de fibras da dieta orgânica que também influencia a biohidrogenação, produzindo maiores concentrações de CLA.

A gordura do leite é sintetizada a partir dos AG obtidos de diferentes fontes como a dieta, mobilização de gordura do tecido adiposo do próprio animal ou até mesmo da síntese própria através de recessos bioquímicos realizados na glândula mamária (Martinez, 2009).

De acordo com Peres (2001), a gordura do leite é um componente abundante e muito variável, sua concentração e composição sofrem maior influência da nutrição e condições ambientais do que as demais frações e é composta, primariamente, por triglicerídeos que constituem aproximadamente 98% do total da gordura do leite.

Segundo Abreu (1993), os AG de cadeia curta não são muito importantes para o leite de consumo, pois sua importância se reflete mais sobre os produtos lácteos que necessitam de aromas característicos para conferir distinção de qualidade. Os lipídios adicionados à ração não protegidos da ação ruminal aumentaram o teor de ácido esteárico e tenderam a aumentar os teores de AG de cadeia longa.

Como as fontes suplementares de lipídios adicionados na dieta dos animais, são principalmente de AG de cadeia longa, estes provavelmente tem grande influência na elevação da concentração dos mesmos na gordura do leite, após sofrer ou não biohidrogenação por ação microbiana no rúmen. O processo de saturação de AG pelos

microrganismos ruminais tem como objetivo reduzir sua reatividade e, desse modo, proteger a integridade das membranas lipoprotéicas microbianas (Jenkins, 1995).

2.6 Suplementação de AGPI

Os lipídios são essenciais para o organismo, pois servem como fonte de energia, são componentes das membranas celulares e participam da síntese de hormônios. Os lipídios totais do sangue são constituídos pelo colesterol, fosfolipídios e triglicérides. Os níveis plasmáticos de lipídios totais são diretamente dependentes da dieta, estes níveis podem estar baixos em animais jovens e durante a gestação (Eifert *et al.*, 2006).

Uma das maiores fontes de AG da gordura do leite são os lipídios circulantes na corrente sanguínea, provenientes da absorção intestinal dos lipídios da dieta e da mobilização dos ácidos graxos do tecido adiposo. Estima-se que 50% da gordura do leite têm origem nos AG circulantes, sendo que 88% destes são de origem dietética e os outros 12% de origem endógena, a dieta influencia em mais de 90% a produção e a composição da gordura do leite (Bauman e Griinari, 2003).

Estudos demonstram que a suplementação com microalgas na dieta de vacas lactantes aumentam o teor AG no leite. (Moran *et al.*, 2017) utilizaram a microalga *Aurantiochytrium limacinum* na dieta de animais em lactação e relatam que o nível de DHA no sangue aumentou no tratamento com a microalga. Em contraste, o conteúdo do DHA não aumentou nos animais alimentados no grupo controle durante o período de estudo.

Stamey *et al.*, (2012) estudaram a inclusão de microalga protegida no rúmen e do óleo extraído desta alga, nas doses de 14,5 e 29,0 g/dia. Os tratamentos não afetaram o consumo, a produção do leite. As concentrações de AG de cadeia curta e média do leite também não foram afetadas pelos tratamentos. Em relação ao tratamento controle, os tratamentos com DHA aumentaram a concentração de DHA e C18:1 trans no leite, além de aumentar as concentrações séricas de DHA.

Recente revisão sobre o uso de microalgas conduzida por Altomonte *et al.* (2018) revela reduções de AGS e aumento de AGPI no leite e derivados de ruminantes, com incrementos variando de 54% até superiores a 100%. Também observaram aumentos nos AGMI no leite de cabras e vacas (+12% e +4%, respectivamente) e aumentos nos

AG totais até C16:0. Nos casos de infusões ruminais o aumento de ω 3 chegou até 161%, com adição de microalgas na ração o aumento foi de 19% à superior a 100%, assim como aumentos no leite de cabra foram de 19% de ω 3, aumentos em C22: 6 (DHA) com variações de 100 a 1000% ou mais em vacas, +660% em ovelhas e +100% em cabras.

Da Silva (2016) relata que o uso de microalgas não parece ter nenhum efeito tóxico porque a concentração de enzimas hepáticas no sangue, especificamente aspartato-amino transferase e gama-glutamil transferase que estão associadas a danos no fígado causados por substâncias tóxicas, estavam dentro do padrão intervalos descritos para vacas em lactação.

Sabe-se que o organismo possui sistemas naturais de eliminação de radicais livres, enzimáticos ou não, produzindo a sua eliminação ou então impedindo sua transformação em produtos mais tóxicos para as células. O efeito prejudicial dos radicais livres ocorre quando eles estão em quantidade excessiva no organismo, ultrapassando a capacidade do organismo de neutralizá-los com os seus sistemas naturais (Domingues, 2018).

Os lipídios do leite são protegidos contra a oxidação, por antioxidantes naturais. Entre as enzimas antioxidantes, a glutathione peroxidase (GSHPx), que é selênio-dependente, age sobre os hidroperóxidos (Cardozo *et al.*, 2013). Durante a decomposição destes, ocorre formação dos chamados produtos secundários da oxidação, e vários desses compostos são voláteis e responsáveis pela formação de odores e/ou gostos indesejáveis (Lindmark-Mansson e Akesson, 2000).

3 HIPÓTESE

O fornecimento de microalgas não influenciará no desempenho produtivo, mas aumentará os teores de AGPI no leite de vacas leiteiras mantidas em sistema de produção orgânico.

4 OBJETIVO GERAL

Investigar se a suplementação com microalgas afeta a produtividade o perfil de ácidos graxos e capacidade antioxidante de leite de vacas em lactação mantidas em sistema de produção orgânica.

5 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a inclusão de microalgas sobre a produção e composição química do leite;
- Avaliar a inclusão de microalgas sobre o perfil de ácidos graxos do leite;
- Avaliar a inclusão de microalgas sobre a capacidade antioxidante do leite e sangue de vacas em lactação;

6 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em propriedade com produção orgânica, município de Quilombo em Santa Catarina, no período de janeiro e abril de 2018. A propriedade trabalha com produção de leite, frutas, verduras, legumes e cereais orgânicos, sendo certificada pela Rede Ecovida com sistema participativo de garantia. Todos os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade do Oeste de Santa Catarina – UNOESC de acordo com o protocolo 74/2017.

Foram utilizadas oito vacas Jersey multíparas lactantes, com peso médio de 374 ± 48 kg, produção média de $8,9 \pm 1,5$ litros, sendo alocadas em blocos de acordo com a produção de leite e dias em lactação (DEL) $151,4 \pm 32,9$ e posteriormente identificados como tratamento controle (CTL n= 4 vacas) e tratamento com microalgas (ALG n = 4 vacas). As coletas foram realizadas em dois períodos de 14 dias cada, sendo realizada a oferta diária de microalga a partir do primeiro dia de cada período, e a partir do 12º até o 14º dia realizaram-se as coletas de dados.

Durante o estudo as vacas permaneceram em pastagem nativa em consórcio com grama missioneira gigante (*Axonopus catarinensis Valls*) e tifton (*Cynodon spp*), em sistema de pastejo rotativo durante 21 horas por dia, com livre acesso à água.

As vacas foram ordenhadas duas vezes ao dia (07h00min e 18h00min) e receberam quatro quilos de rolão de milho por vaca por dia, fracionados em dois quilos durante cada ordenha.

O tratamento controle consistiu no fornecimento na suplementação de rolão de milho, enquanto o segundo tratamento foi a adição de 100 g da farinha da microalga (*Schizochytrium Limacinum*) (All-G RichTM Schizochytrium limacinum CCAP 4087/2; Alltech, Inc.) por vaca/dia (Tratamento ALG) ao rolão de milho. Levando em consideração que a quantidade de rolão de milho suplementado era pequena, optou-se por fracionar a oferta da microalga, sendo 50 g/vaca em cada ordenha, evitando assim uma possível rejeição dos animais devido ao odor característico da microalga, conforme discutido por Tomaluski *et al.* (2018).

Amostras da forragem disponível nos piquetes e de rolão de milho foram coletadas nos dias zero, 12, 13 e 14 de cada período experimental. A forragem foi coletada no piquete que os animais permaneciam no respectivo dia, à uma altura de aproximadamente 15 centímetros do solo.

A composição química da pastagem e da espiga de milho com palha (rolão de milho) utilizados durante o experimento foram analisadas no laboratório de análise bromatológica da Universidade do Oeste de Santa Catarina Campus Xanxerê (Tab.1).

Tabela 1- Composição química da pastagem (mix de grama missioneira gigante e tifton) e rolão de milho fornecidos às vacas em lactação durante todo o período de experimento.

Item	Alimento	
	Pastagem	Rolão de milho
Materia Seca (MS)	22,45	87,16
Materia Mineral (% MS)	10,53	7,00
Proteína Bruta (% MS)	10,08	7,49
Fibra Detergente Neutro (% MS)	73,07	30,82
Fibra Detergente Ácido (% MS)	44,73	14,13

% MS = porcentagem contida na matéria seca

Para realizar as análises bromatológicas, as amostras foram pré-secas em estufa de ventilação forçada em temperatura de 55°C por aproximadamente 72 horas, sendo que após retiradas da estufa foram novamente pesadas para determinação do teor de matéria parcialmente seca e então moída em moinho tipo “Wiley”, com peneira de malha 1 mm. Nas amostras foram determinados os teores de MS por secagem em estufa a 105 °C durante 24h. O conteúdo de matéria mineral (MM) foi determinado por combustão a 600°C durante 4 h (Silva e Queiroz, 2002). O teor de nitrogênio total (N) foi determinado pelo método Kjeldahl (Método 984.13) (AOAC, 1997), utilizando-se o fator de 6,25 para conversão do N em proteína bruta (PB). Para determinação da concentração de FDN as amostras foram acondicionadas em saquinhos de poliéster (Komarek, 1993) tratados com solução detergente neutro em autoclave a 110°C por 40 minutos (Senger *et al.*, 2008), para as amostras de concentrado foi incluída α -amilase (Mertens, 2002). As concentrações de FDA foram determinadas de acordo com a (AOAC,1997) (método 973.18).

A composição da microalga, bem como dos AG do rolão de milho e das pastagens são apresentadas nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2- Composição de AG (Palmítico, oléico, linoleico e linolênico) da pastagem nativa em consórcio com grama missioneira gigante (*Axonopus catarinensis* Valls) e tifton (*Cynodon* spp) e rolão de milho.

Ácido graxo da Pastagem ¹	%	Ácido graxo do rolão de milho ²	%
C16:0	60,17	C16:0	24,39
C18:0	5,59	C18:0	3,06
C18:2n6c	14,72	C18:1n9c	37,88
C18:3n3	19,52	C18:2n6c	34,67

¹ % de AG da pastagem nativa que contem 3,14% de AG total; ² % de AG do rolão de milho que contem 3,40% de AG total.

Tabela 3- Composição química do suplemento de microalga.

Item	Suplemento de algas ¹
Matéria seca (%)	97,4±0,1
Matéria orgânica (% MS)	96,2±0,1
Proteína bruta (% MS)	15,6±0,2
Carboidratos não fibrosos (% MS)	15,3±2,1
Fibra em detergente neutro (% MS)	2,0±1,8
Extrato etéreo de hidrólise ácida (% MS)	63,2±2,7
Ácidos graxos- AG (% MS)	33,2±3,0
Ácidos graxos, g / 100 g do total de AG	
<C16	5,74±0,01
C16:0	52,58 ± 0,36
C18:0	1,41 ± 0,01
C18:1	0,13 ± 0,01
C18:2 cis-9, cis-12	Não encontrado
C18:3 cis-9, cis-12, cis-15	0,03±0,01
C20:4 cis-5, cis-8, cis-11, cis-14	0,08±0,01
C20:5 cis-5, cis-8, cis-11, cis-14, cis-17	0,41±0,01
C22:5 cis-4, cis-7, cis-10, cis-13, cis-16	6,31±0,06
C22:6 cis-4, cis-7, cis-10, cis-13, cis-16, cis-19	29,98±0,28
ω6	6,56±0,07
ω3	30,50±0,29

¹All-G-Rich, Alltech.

A produção de leite foi registrada no dia zero do experimento antes do início da suplementação com microalgas. O peso corporal foi determinado através de fita torácica apropriada ao início e final de cada período e escore corporal. Coletas de leite e de sangue foram realizadas nos dias zero, 12, 13 e 14 de cada período experimental.

Amostras individuais de leite foram coletadas durante seis ordenhas consecutivas, nos últimos três dias (d 12, 13 e 14) em proporção igual na ordenha da manhã e da tarde, e então divididas em dois frascos. Um frasco foi refrigerado a 4°C e posteriormente enviado ao laboratório da Associação Paranaense de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH) para determinação da composição química (gordura, proteína, extrato seco desengordurado e lactose). O segundo frasco, foi mantido em freezer a -20°C e encaminhado para o laboratório da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) para análise da composição dos ácidos graxos, por meio do emprego de cromatografia gasosa. Em função de problemas na coleta das amostras de leite optou-se por descartar os dados do primeiro período experimental.

A metodologia utilizada para a análise da composição do leite foi o Infravermelho, segundo International Dairy Federation – IDF, Standard 141 Second Edition 2013-09-15.

Os lipídios foram determinados de acordo com o método de Bligh e Dyer (1959), em que 4 mL das amostras de leite foram adicionados em tubos de 50 mL e acrescidos de 8 mL de clorofórmio e 16 mL de metanol. Os tubos foram agitados em mesa agitadora a 150 rpm por 30 min. Após a agitação foram adicionados 8 mL de clorofórmio e 8 mL da solução de sulfato de sódio 1,5%. Os tubos passaram por mais uma agitação de 2 minutos e, posteriormente, foram centrifugados para que ocorra a separação de fases. A fração lipídica (clorofórmio) foi retirada dos tubos e filtrada em tubos de ensaio. Após a filtragem, 5 mL dos extratos foram secos em estufa de circulação a ar a 105 °C até peso constante para quantificação do teor de lipídios e o restante utilizado para análise de AG. Para determinação do perfil de AG os ésteres metílicos de AG (FAME) foram determinados de acordo com Hartman e Lago (1973). Então 4 mL dos extratos foram secos em uma corrente de nitrogênio e em seguida 1 mL da solução metanólica de KOH 0,4 M foi adicionado. Para saponificação, os tubos foram mantidos por 10 minutos banho-maria a 100 °C. Posteriormente, foram adicionados 3 mL da solução metanólica de H₂SO₄ 1,0 M para a esterificação e, novamente permaneceu ao banho-maria por 10 min. Após atingir temperatura ambiente, os FAME foram particionados em 2 mL de hexano, o qual foi reservado para análise cromatográfica. Os FAMES foram analisados em cromatógrafo a gás com detector de ionização em chamas (GC-FID), Variam 3600 (CA, USA). Posteriormente, 1 µL das amostras foram injetados em um injetor tipo *split/splitless*, operando no modo *split* com uma razão de 20:1 a 250 °C. O gás de arraste foi o hidrogênio que permaneceu sob pressão constante de 25 psi. Os FAMES foram separados em uma coluna SP-2560TM (Supelco, USA), com temperatura inicial de 60 °C, onde permaneceram por 3 min. Após, uma rampa de temperatura de 10 °C/min elevou a 180 °C, e novamente aumentando de 3 °C/min até 240 °C, permanecendo por 2 min. O FID foi mantido a 250 °C. Os resultados foram expressos em percentual da área total dos cromatogramas considerando os fatores de correção do tamanho equivalente de cadeia carbonada e o fator de conversão de éster para ácido, conforme Visentainer (2012).

Amostras de sangue foram coletadas individualmente no dia zero e dia 14, através de punção da veia coccígea, utilizando tubos vacutainer heparinizados (Vacuplast[®]) e colocados imediatamente em gelo. Após centrifugação a 3500 × g durante 10 min, uma alíquota do soro foi armazenada em microtubos plásticos

preenchendo cerca de 1 mL, mantidos à -20°C até a análise. As amostras de soro foram encaminhadas ao laboratório da UFSM.

Para análises de espécies reativa ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a metodologia utilizada foi a mesma descrita por Buege e Aust (1978). A estimativa da peroxidação lipídica foi estabelecida pela produção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), realizada por reação de malondialdeído (MDA) com ácido 2-tiobarbitúrico, com algumas modificações. A reação foi medida opticamente de acordo com Buege e Aust (1978) a 532 nm. Os níveis de TBARS foram expressos como nanomole de MDA/mL.

A capacidade antioxidante total contra os radicais peroxil (ACAP) foi determinada de acordo com o método descrito por Amado *et al.*, (2009) com modificações para os mamíferos. Este método consiste em encontrar a capacidade antioxidante dos tecidos utilizando um substrato fluorescente (2',7'dicloro-fluoresceindiacetate- H2DCF-DA) e a produção de radicais peroxil por decomposição térmica de ABAP (2,2'azobis 2 methylpropionamidinedi-hydrochloride). A fluorescência foi determinada através de um leitor de microplacas (Spectramax I3), a 37 °C (excitação: 485 nm; emissão: 530 nm), com leituras em cada 5 minutos, durante 30 min. Os resultados foram expressos como uma área relativa (a diferença entre a área com e sem ABAP dividida pela área sem ABAP), dessa forma, uma baixa área relativa significa alta ACAP.

As vacas foram consideradas unidades experimentais sendo aleatoriamente distribuídas em delineamento em blocos casualizado. Os dados foram analisados de acordo com o Proc Mixed (SAS Inst. Inc., Cary, NC, 2003), tendo os dias de coleta após o início da suplementação (12, 13 e 14 dias) como medidas repetidas para a variável produção e composição e perfil de AG do leite. Animal alinhado dentro de tratamento foi utilizado como erro termo. O modelo incluiu efeito fixo de tratamento, tempo em dias (exceto para variáveis sanguíneas) e a interação entre tratamento e dia, tendo período e animal dentro de período como efeito aleatório. Não houve nenhuma variável resposta com interação significativa entre tratamento e dias. As comparações de médias entre os tratamentos foram realizadas por meio do teste ajustado de Tukey ($\alpha = 0,05$).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Produção e composição do leite

No presente estudo os animais permaneceram em pastagem e receberam microalga adicionada ao rolão de milho durante a ordenha. Toda a suplementação energética com rolão de milho foi ingerida pelas vacas de ambos os tratamentos. A redução da aceitabilidade da dieta quando microalgas são fornecidas tem sido relatada na literatura como a possível causa na redução da ingestão de matéria seca de novilhas em confinamento (Demeda *et al.*, 2017) e de vacas em lactação (Franklin *et al.* 1999; Lamminen *et al.* 2017). Na presente pesquisa, no entanto, uma possível redução na aceitabilidade e na ingestão de matéria seca total não ocorreu, concordando com os trabalhos de Glover *et al.* (2012); Moran *et al.* (2017) e Sinedino (2017).

O escore corporal (ECC) dos animais se manteve em 2 durante os dois períodos da pesquisa.

A adição de microalgas não alterou a produção de leite ($P = 0,787$), os teores de proteína ($P = 0,203$), lactose ($P = 0,701$) e sólidos totais do leite ($P = 0,112$), porém tendeu a reduzir os teores de gordura ($P = 0,084$), sem afetar a produção dos constituintes do leite (Tab. 4).

Da mesma forma Da Silva *et al.* (2016) não encontraram diferenças significativas da inclusão de microalgas (91,8 g/vaca/dia) sobre a produção diária, teor e produção de sólidos do leite. Glover *et al.*(2012) também não observaram, efeito do tratamento (100 g microalga/vaca/dia) sobre a produção de leite e os teores de proteína e lactose, no entanto houve redução do teor de gordura do leite. Resultados semelhantes também são observados com a suplementação de microalgas protegidas, obtendo a IMS e produção de leite inalterada, enquanto a percentagem de gordura do leite foi reduzida (Vahmani *et al.*, 2013b). A inclusão de microalgas e ácidos graxos poli-insaturados de origem marinha reduziu o teor de gordura do leite nos estudos de Boeckert *et al.* (2008) e Sinedino (2017).

A redução no teor de gordura, mesmo em vacas mantidas em sistema de pastejo pode estar relacionado ao efeito dos AGPI sobre a digestão de fibra (Schroeder *et al.*, 2004). AGPI podem interferir no processo de biohidrogenação ruminal, elevando a concentração de ácidos graxos intermediários de 18 carbonos de configuração trans, principalmente os derivados do metabolismo do ácido linoléico (Barletta *et al.*, 2016) e

CLA. Como consequência, a síntese de novo de ácidos graxos de cadeia curta é inibida, levando à redução no teor de gordura do leite e aumento na proporção de ácidos graxos de cadeia longa Bauman e Griinari, (2003); Angulo *et al.* (2012). Porém Lamminen *et al.* (2019) observaram que a concentração de gordura no leite tendeu a ser maior nos tratamentos com microalgas (*Espirulina* e *Chorella*) em comparação à farinha de soja. Franklin *et al.* (1999) observaram que a porcentagem de gordura no leite de vacas alimentadas com algas foi menor do que no leite de vacas alimentadas com dieta controle. Dietas contendo grandes quantidades de carboidratos fermentáveis ou quantidade reduzida de forragem podem ocasionar depressão da gordura do leite, (Mota, 2018) fato que é geralmente observado quando os animais são confinados.

Tabela 4- Produção e composição do leite de vacas em lactação em dieta controle e com suplementação com microalgas *Schizochytrium limacinum*.

	Tratamentos ¹			P-valor		
	CTL	ALG	EPM	TRAT	DIA	TRAT*DIA
Produção leite						
Litros/dia	8,88	9,16	0,289	0,787	0,657	0,833
Gordura %	4,31	3,38	0,168	0,084	0,351	0,498
Gordura, kg/d	0,345	0,321	0,011	0,553	0,354	0,791
Proteína %	3,36	3,14	0,048	0,203	0,026	0,07
Proteína, kg/d	0,271	0,303	0,011	0,437	0,536	0,131
Lactose %	4,29	4,22	0,049	0,701	0,528	0,401
Lactose, kg/d	0,349	0,406	0,014	0,281	0,617	0,812
Sólidos totais %	12,89	11,63	0,241	0,112	0,193	0,241

¹ CTL: sem microalga; ALG: microalga (oferecida 50g duas vezes ao dia no momento da ordenha).

Neste estudo, não observamos redução dos níveis de proteína sendo de acordo com autores que relatam ausência de efeitos da suplementação com microalgas na proteína do leite em vacas (Moate *et al.* 2013); Da Silva *et al.* (2016); ovelhas (Bichi *et al.* 2013); e cabras (Tsiplakou *et al.* 2017; Tsiplakou *et al.* 2018). A redução dos teores de proteína no leite com a inclusão de microalga, é relatada por outros autores Boeckert *et al.* (2008); Sinedino (2017); Altomonte *et al.*, (2018); Marques *et al.* (2018), sendo os resultados variáveis de acordo com diferentes níveis de inclusão e efeitos obtidos na produção de leite. Alguns autores sugeriram que uma possível razão para a redução no

teor de proteína é a deficiência em histidina relatada em certas microalgas, o que pode limitar a síntese de proteína na glândula mamária (Lamminen *et al.*, 2019). Sendo a deficiência de histidina mais presente em dietas a base de silagem, possivelmente este aminoácido não tenha sido limitante em nosso estudo (Gialongo *et al.*, 2016).

7.2 Perfil de ácidos graxos do leite

A adição de microalgas na dieta de vacas em lactação não alterou ($P \geq 0,05$) a composição da gordura do leite para os ácidos graxos C4, C6, C8, C10, C12, C14 C14:1, C15 e C17. No entanto a concentração de ácido palmítico C16:0 ($P = 0,015$), ácido palmitoléico C16:1 ($P = 0,026$), ácido vacênico C18:1n9 trans ($P = 0,0001$) e ácido rumênico (CLA) C18:2 cis 9, trans 11 ($P = 0,0196$) na gordura do leite foram maiores na dieta com microalga do que na dieta controle (Tab.6). De forma contrária, houve redução nas proporções de ácido esteárico C18:0 ($P = 0,0001$) e ácido oléico C18:1n9 cis ($P = 0,0022$).

De acordo com Jensen *et al.* (2002) o AG palmítico, esteárico e oléico compõem a maior parte da gordura do leite, variando de 20 a 40, 9 a 14 e 20 a 30 %, respectivamente. A pastagem que os animais tiveram acesso apresentava altos teores de ácido palmítico, sendo este também o AG predominante na microalga suplementada ($52,58 \pm 0,36$ g/100g de AG), justificando seu aumento na gordura do leite.

Tabela 5- Efeito da suplementação com microalga *Schizochytrium limacinum* na concentração de ácidos graxos principais e alguns ácidos graxos biologicamente relevantes no leite.

Ácidos graxos, g / 100 g do total de AG	Tratamentos ¹			P-valor		
	CTL	ALG	EPM	TRAT	DIA	TRAT*DIA
Butírico - C4	5,70	8,25	0,93	0,12	0,79	0,85
Capróico - C6	0,80	0,95	0,06	0,46	0,15	0,73
Caprílico - C8	0,65	0,71	0,04	0,59	0,21	0,78
Cáprico - C10	1,92	2,16	0,15	0,62	0,25	0,83
Láurico - C12	2,70	2,98	0,15	0,45	0,23	0,85
Merístico - C14	14,60	14,44	0,42	0,90	0,58	0,62
Lisiotérico - C14:1	0,42	0,41	0,03	0,62	0,52	0,55
Pentadecanóico - C15	1,07	1,10	0,03	0,26	0,52	0,65
Palmítico - C16	37,50	41,75	0,73	0,01	0,28	0,66
Palmitoléico - C16:1	0,69	0,94	0,04	0,02	0,59	0,81
Margárico - C17	0,51	0,55	0,02	0,65	0,66	0,31
Esteárico - C18	13,97	6,146	0,90	<0,0001	0,53	0,80
Elaidico - C18:1 n9 trans	2,587	8,631	0,73	<0,0001	0,16	0,17
Oléico - C18:1 n9 cis	15,70	9,48	0,91	0,01	0,87	0,96
Linoleico - C18:2 n6 cis	0,52	0,51	0,02	0,92	0,22	0,73
α - Linoleico - C18:3 n3	0,19	0,15	0,01	0,12	0,12	0,46
Linoleico Conjugado – CLA	0,48	0,87	0,06	0,01	0,35	0,74
AGS	76,79	76,56	0,83	0,91	0,66	0,78
AGMI	19,32	19,44	0,91	0,95	0,39	0,52
AGPI	1,18	1,59	0,08	0,04	0,58	0,60
AGPI/AGMI ²	5,97	8,45	0,45	0,01	0,90	0,12
AGPI/AGS ³	1,56	2,12	0,13	0,07	0,70	0,63
AGMI/AGS ⁴	25,51	26,06	1,55	0,87	0,54	0,70

¹ CTL: sem farelo de microalga; ALG: microalga (com de farelo de microalga oferecida 50g duas vezes ao dia no momento da ordenha); ²Ácidos graxos poli-insaturado /ácidos graxos monoinsaturados. ³Ácidos graxos poli-insaturado /ácidos graxos saturados. ⁴Ácidos graxos monoinsaturado /ácidos graxos saturados.

Grande acúmulo de ácido vacênico e uma redução de no ácido esteárico no fluido ruminal Boeckert *et al* (2007) e no leite Moate *et al* (2013) de vacas são relatados na literatura. Em nosso estudo, a suplementação com microalga causou redução significativa do teor de ácido esteárico (2,46 vezes) e o acúmulo de ácido vacênico e ácido rumênico na gordura do leite na ordem de 3,3 e 1,8 vezes, respectivamente. Isto pode ter ocorrido devido à inibição completa da biohidrogenação ruminal, caracterizada pela conversão de ácido vacênico em esteárico pela bactérias do grupo B, principalmente *Fusocillus* (Harfoot e Hazlewood, 1997). Lipídeos marinhos tem sido descritos com efeito inibitório sobre a saturação do ácido vacênico e outros produtos do metabolismo dos AGPI, apresentando grande potencial em modular a última etapa da biohidrogenação (Jeyanathan *et al.*, 2016). De fato, a suplementação de EPA e DHA pode reduzir a extensão da biohidrogenação (Gulati *et al.* 1999), e aumentar a produção de AGPI trans e CLA que chegam ao intestino, especialmente em bovinos onde a cinética da biohidrogenação é menor e incompleta quando comparado à ovinos (Toral *et al.*, 2018).

Como esperado, o total de AGPI na gordura do leite aumentou significativamente ($P = 0,048$), bem como sua participação em relação aos AGMI ($P = 0,013$) e houve tendência de aumento ($P = 0,073$) em relação aos AGS (AGPI/AGS), porém sem alterar o teor de AGS ($P = 0,911$), AGMI ($P = 0,952$) e a relação AGMI/AGS ($P = 0,877$).

Os AGS estão associados a problemas cardiovasculares e o consumo de AGPI com a redução destes problemas, uma vez que diminuem o teor de colesterol e a pressão sanguínea e também estão correlacionados com o desenvolvimento cerebral e visual (Souza e Almeida, 2018).

O aumento dos teores de AGPI no leite em vacas suplementadas com microalgas também foi observado nos trabalhos de Moran *et al.* (2017); Sinedino (2017); Marques *et al.* (2018). Franklin *et al.*, (1999) já haviam observado que vacas alimentadas com algas continham maiores concentrações de CLA e menores de AGS em comparação com vacas alimentadas com a dieta controle.

Lamminen *et al.*, (2019) observaram que a concentração de AG $\omega 3$ na gordura do leite foi maior nas dietas com microalgas do que nas farinhas de soja, enquanto o

oposto ocorreu com AGS. Além disso, a concentração de ácido α -linolênico e AGPI tenderam a ser maiores nas dietas com microalgas.

Neste estudo as vacas recebiam dieta predominantemente de forragem em sistema de pastejo. Corroborando com nossos resultados, a partir de vacas mantidas em sistema de pastejo, Vahmani *et al.*, (2013b) observaram que a ingestão de forragem fresca reduziu os teores de AGS e aumentou os teores de CLA do leite.

O CLA é produzido no rúmen a partir de reações de isomerização e redução através da atuação das enzimas microbianas sobre os substratos oriundos da dieta como o $\omega 6$ e o $\omega 3$. Entretanto, a capacidade ruminal pode ser excedida quando se tem grande quantidade de AGPI na dieta e, portanto, alguns produtos intermediários são absorvidos pelo intestino e movendo-se pela corrente sanguínea podem ser incorporados nas reservas de gordura do tecido adiposo e da glândula mamária. (Grinari e Bauman, 1999). Logo, pode-se dizer que o CLA encontrado no leite de ruminantes é formado como um dos produtos intermediários no processo de biohidrogenação no rúmen e também a partir da atuação da enzima $\Delta 9$ -dessaturase sobre a conversão de ácido vacênico (C18:1 trans11) absorvido a CLA no tecido adiposo, principalmente na glândula mamária em vacas leiteiras Aydin (2005); Schmid *et al.* (2006).

Apesar da capacidade de enriquecimento do leite com uso de AGPI via dieta, o aumento dos níveis de EPA e DHA no leite tem sido observado em baixas concentrações (Moran *et al.*, 2017). Este fator se explica pela extensiva biohidrogenação ruminal sofrida pelos AGPI, especialmente EPA, DHA e o precursor destes, ácido linolênico. Também a baixa afinidade por fosfolipídeos (como EPA e DHA) associados ao HDL (lipoproteínas de alta densidade) pela enzima lipoproteína lipase na glândula mamária contribui para que a taxa de transferência da dieta para o leite seja baixa Boeckert *et al.* (2007); Chilliard *et al.* (2007). Infelizmente as análises de cromatografia gasosa utilizadas para analisar os AG não foi apta para determinar a concentração de DHA e EPA, limitando o entendimento do potencial da alga em enriquecer o leite com estes ácidos graxos essenciais.

A produção orgânica mesmo com potencial de crescimento ainda enfrenta severas restrições, como falta de técnicos capacitados para orientação dos produtores, quase toda produção é diluída em tanques com leite integral convencional, restrição de ingredientes aptos ao uso no sistema de produção orgânica, falta de política

governamental para incentivo da produção e desenvolvimento de mercado consumidor. Mesmo assim, com acesso limitado a poucas propriedades que trabalham com sistema de produção de leite orgânico, o uso de microalgas ricas em ω 3 demonstrou-se um método adequado de enriquecimento de produto de origem animal, respeitando as exigências da produção orgânica e disponibilizando aos consumidores um alimento com melhores características nutracêuticas.

Fica clara a necessidade de pesquisas avaliando o processamento do leite orgânico enriquecido e a elaboração de seus derivados para que os benefícios à saúde humana sejam avaliados.

7.3 Resultados de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e capacidade antioxidante total contra os radicais peroxila (ACAP) do leite e soro

A oxidação de produtos lácteos reduz a qualidade nutricional e propriedades organoléptica (Havemose *et al.*, 2006). Os valores de TBARS e ACAP não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) com a adição de microalgas (Tab. 5).

King (1962) correlacionou os valores de TBARS (Ab_{S532}) com características organolépticas do leite e concluiu que valores de TBARS, entre 0,010 e 0,023, não apresentaram “flavor” oxidado; entre 0,024 e 0,029 apresentaram “flavor” oxidado questionável; entre 0,030 e 0,040 apresentaram “flavor” oxidado leve; entre 0,041 e 0,055, “flavor” oxidado forte, e, $TBARS > 0,056$, apresentaram “flavor” oxidado muito forte.

Os valores de TBARS do leite encontrados nesta pesquisa são considerados altos, indicando a ocorrência de oxidação lipídica em ambos tratamentos. Sendo assim, a adição de microalgas não resultou em maior integridade da fração lipídica quando comparado ao tratamento controle.

Maiores níveis de TBARS na manteiga do leite de vacas que ingeriram óleo de girassol foram associados a menor vida de prateleira (Chaves, 2014). Apesar do sabor ser um excelente meio de detectar sabores oxidados, (Kitessa, 2004) não observaram defeitos de sabor no leite enriquecido com AG de atum protegido no rúmen.

A medida de ACAP tem sido adotada como método para avaliar a capacidade antioxidante total (considera meios enzimáticos e não enzimáticos) (Huang *et al.* 2002).

Em nosso estudo, não foram observadas alterações nos valores de ACAP entre o grupo controle e o que recebeu a microalga, portanto não causando estresse oxidativo. Sinedino *et al.*, (2017) também não observaram efeito negativo ao suplementar vacas em lactação com 10,2g/vaca/dia de DHA. Por outro lado em baixas quantidades, o AG ω 3 age como antioxidante ao invés de pró-oxidante em células vasculares endoteliais e tecidos placentários, reduzindo a inflamação e a formação de espécies reativas de oxigênio (Jones *et al.*, 2013; Giordano e Visioli, 2014).

Tabela 6- Valores de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e capacidade antioxidante total contra os radicais peroxila (ACAP) de leite e soro de vacas em lactação em dieta controle e com suplementação com microalgas *Schizochytrium limacinum*.

	Tratamentos ¹			P-valor		
	CTL	ALG	EPM	TRAT	DIA	TRAT*DIA
TBARS MDA equivalente, nmol / ml leite	114,6	123,25	6,04	0,61	0,17	0,24
TBARS MDA equivalente, nmol / ml soro ²	5,819	6,56	0,31	0,25	NA ³	NA
ACAP leite/ área reativa	1,583	1,84	0,15	0,53	0,32	0,18
ACAP soro ² /área reativa	2,01	1,34	0,23	0,15	NA	NA

¹ CTL: sem farelo de microalga; ALG: microalga (oferecida 50g duas vezes ao dia no momento da ordenha) ² Coleta apenas no dia 14; NA³: Não se aplica.

8 CONCLUSÃO

Vacas mantidas em sistema de manejo orgânico e tendo o enriquecimento da dieta com microalga *Schizochytrium limacinum* mantém a produção e composição do leite, com maior secreção de AGPI e CLA, sem alterar a capacidade antioxidante dos animais e do leite.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, L.R. *Factors affecting the biosynthesis of branched chain fatty acid in milk fat*. Madison, WI: University of Wisconsin, p 163. Tese (Doctor of Philosophy) - University of Wisconsin, 1993.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA, Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-debusca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&101_assetEntryId=2866865&101_type=content&101_groupId=219201&101_urlTitle=alimentosenriquecidos&inheritRedirect=true Acessado em 24 de abril. 2019.

ALLTECH. Alltech Agroindustrial Ltda. Sobre a Alltech, 2014. Disponível em: <http://pt.alltech.com/about/our-story> >. Acessado em: 28/11/2017.

ALMEIDA, F.M.; MENEZES, A.S. Sedentary behavior, psychosocial stress indicators, and health-risk behaviors among adolescents in northeastern Brazil. *J Phys Act Health*. v.15, p.169-175, 2017.

ALTOMONTE, I.; SALARI, F.; LICITRA, R. *et al.* Use of microalgae in ruminant nutrition and implications on milk quality. A review. *Livestock Science*. v. 214. p. 25-35. 2018.

AMADO, L.L.; GARCIA M.L, RAMOS P.B, *et al.* A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ*. v. 407, p. 2115 – 2123, 2009.

ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Res Int*. v. 35, p. 171-176, 2002.

ANGULO, J.; MAHECHA, L.; NUERNBERG, K. *et al.* Effects of polyunsaturated fatty acids from plant oils and algae on milk fat yield and composition are associated with mammary lipogenic and SREBF1 gene expression. *Animal*. v.6, p.1961-1972, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY *Association of Official Analytical Chemists International Official Methods of Analysis*. 16th Edition, AOAC, Arlington. 1997.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTRY. *Official methods of analysis of the Association of Analytical Chemists International* 17th. Ed. Gaithersburg, USA. 2000

AROEIRA, L. J. M.; PACIULLO, D. S. C.; FERNANDES, E. N. Produção Orgânica: enfoque leite, suas implicações e consequências. p.155-195. In: STRINGHETA, P. C., MUNIZ, J. N. *Alimentos orgânicos: produção, tecnologia e certificação*. p. 452. Viçosa: UFV, 2003.

AUGUSTINHO, B.C. *Composição lipídica e atividade antioxidante do leite e do sangue de búfalas suplementadas com óleo de linhaça e vitamina e na dieta*. Dissertação. Programa de Pós Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá. 2017.

AYDIN, R. Conjugated linoleic acid: chemical structure, sources and biological properties. *J Anim Sci*. v. 29. p. 189-195. 2005

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

BAUMAN, D.E.; GRINARI, J.M. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev. Nutr.* v. 23 p. 203-227, 2003.

BAUMGARD, L.H.; MATITASHVILI, E.; CORL, B.A. *et al.* Trans-10, cis-12 Conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *J Dairy Sci*. v.85, p.2155-2163, 2002.

BERGAMO, P.; FEDELE, E.; IANNIBELLI, L. *et al.* Fat soluble vitamin contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian dairy products. *Food Chemistry*. v. 82, n. 4, p. 625-631, 2003.

BESSA, R. J. B. “A metabolização dos ácidos gordos polinsaturados no rúmen.” *Lipid Animal*. 2015. Disponível em <<http://lipidanimal.fmv.utl.pt/index.php/pt/dossiers/150-bioidrogenacao>> Acessado em 12 de out. 2018

BERCHIELLI, T.T., PIRES, A.V., OLIVEIRA, S.G. *Nutrição de ruminantes*. Jaboticabal: Funep, p. 583. 2006.

BICHI, E., HERVÁS, G., TORAL, P. G. *et al.* Milk fat depression induced by dietary marine algae in dairy ewes: Persistency of milk fatty acid composition and animal performance responses. *J Dairy Sci*. 96(1), p.524-532. 2013.

BLIGH, E.G, DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* v. 37. n. 8 p.911–917. 1959.

BOECKAERT, C.; MESTDAGH, J.; VLAEMINCK, B.*et al.* Micro-algae as potent rumen methane inhibitors and modifiers of rumen lipolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acid. *International Congress Series*. v.1293, p.184-188, 2006.

BOECKAERT, C.; VLAEMINCK, B.; DIJKSTRA, J.; ISSA-ZACHARIA, A. *et al.* Effect of dietary starch or micro algae supplementation on rumen fermentation and milk fatty acid composition of dairy cows. *J Dairy Sci*. v.91, p.4714– 4727, 2008.

BOECKAERT, C.; VLAEMINCK, B.; MESTDAGH, J. *et al.* In vitro examination of DHAedible micro-algae: 1. Effect on rumen lipolysis and biohydrogenation of linoleic and linolenic acids. *Anim Feed Sci Tech* v.136, Issue 1, p.63–79, 2007.

BOECKAERT, C.; FIEVEZ, V.; HECKE, J. *et al.* Changes in rumen biohydrogenation intermediates and ciliate protozoa diversity after algae supplementation to dairy cattle. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* v.109, p.767–777, 2007.

BRASIL. Diário Oficial da União. Lei Nº 10831. Seção 1, Página 8. 2003.

BUEGE J.A.; AUST, S.D. Peroxidação lipídica microssomal. *Método Enzymol* 52. p. 302-309. 1978.

CARDOZO, L. CECIM, M.; SOARES, E. *et al.* Estabilidade oxidativa e perfil de ácidos graxos do leite de vacas suplementadas com óleo de linhaça na dieta associado ou não

ao selenito de sódio injetável. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* ISSN 0102-0935. vol.65 no.3. 2013.

CHAVES, B.W. *Qualidade de manteiga produzida com leite de vacas Jersey sob diferentes níveis de óleo de girassol na dieta*. Dissertação. (Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2014.

CHEN, C.Y.; ZHAO, X.Q.; YEN, H.W. *et al.* Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem Eng J.* v.78, p.1– 10, 2013.

CHILLIARD, Y.; GLASSER, F.; FERLAY, A. *et al.* Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. *Euro Fed Lipid*, v.109, p.828–855, 2007.

CONNOR, W.E. Importance of ω 3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr.* v.71, pp. 171S-175S, 2000.

COZZOLINO, S. Nutracêuticos: o que significa? *Abeso*, v. 55, p. 5-7, 2012

CUSATO, S., GAMEIRO, A. H., SANT'ANA, A. S. *et al.* Assessing the costs involved in the implementation of GMP and HACCP in a small dairy factory. *Qual Assur Saf Crop*, v.6, p. 135-139, 2014.

DA SILVA, G.G.; FERREIRA DE JESUS, E.; TAKIYA, C.S. *et al.* Short communication: Partial replacement of ground corn with algae meal in a dairy cow diet: Milk yield and composition, nutrient digestibility, and metabolic profile. *J Dairy Sci.* v.99, p.8880–8884, 2016.

DEMEDA, M. ZOTTI, C.A.; GRIEBLER, L. *et al.* Feeding microalgae to beef steers. In: *Anais da 54ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. p. 1063. 2017.

DEMEYER, D.; DOREAU, M. Targets and procedures for altering ruminant meat and milk lipids. *Proc Nutr Soc.* Vol. 58. 1999.

DEWANCKELE, L. VLAEMINCK B. HERNANDEZ-SANABRIA E. *et al.* Rumen Biohydrogenation and Microbial Community Changes Upon Early Life Supplementation of 22:6 ω 3 Enriched Microalgae to Goats. *Front. Microbiol. Article* 10.3389. 2018.

DIRKSEN, G.; BREITNER, W. New quick-test for semi quantitative determinations of beta-hydroxybutyric acid in bovine milk. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* v.40, p.779-784, 1993.

DOMINGUES, I.M. *Contraste leiteiro: Ferramenta de monitorização para uma maior eficiência das explorações de bovinos leiteiros.* Universidade de Évora. Escola de ciências e tecnologia. Departamento de Zootecnia. Portugal. 2018

DRAGINCIC, J., KORACB, N. and BLAGOJEVICA, B. Group multi-criteria decision making (GMCDM) approach for selecting the most suitable table grape variety intended for organic viticulture. *Comput Electron Agric.* vol. 111, p. 194-202. 2015.

EIFERT, E.D.; LANA, R.D.P.; LANNA, D.P.D. *et al.* Milk fatty acid profile and milk conjugated linoleic acid content of dairy cows fed diets with different carbohydrate sources with or without soybean oil supplementation. *R. Bras. Zootec* 35, p.1829–1837, 2006.

EMBRAPA AGROENERGIA. Microalgas. Ano IV, nº 10, Brasília-DF, 2016.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture - Meeting the sustainable development goals. Rome. 2018.

FARD, S. G.; WANG, F., SINCLAIR, A. J., ELLIOTT, G.*et al.* How does high DHA fish oil affect health? A systematic review of evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018.

FERREIRA, A. M. C. M. *Efeito da suplementação de dietas com lipídios de origem marinha na composição em ácidos graxos da carne de borrego.* Instituto Superior de Agronomia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, 2016.

FRANKLIN, S.T.; MARTIN, K. R.; BAER, R. J. *et al.* Algas marinhas (*Schizochytrium* sp.) Aumentam as concentrações de ácidos linoleico, docosahexaenóico e transvacênico conjugados no leite de vacas leiteiras. *J Nutr.* Volume 129, p. 2048-2052, 1999.

GIALLONGO, F.; HARPER, M.T.; OH, J. *et al.* Effects of rumen-protected methionine, lysine, and histidine on lactation performance of dairy cows. *J Dairy Sci.* v.99, p.4437-4452, 2016.

- GIORDANO, E.; VISIOLI, F. Long-chain omega 3 fatty acids: molecular bases of potential antioxidant actions. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. p.901–904. 2014.
- GLOVER, K.E.; BUDGE, S.; ROSE, M. *et al.* Effect of feeding fresh forage and marine algae on the fatty acid composition and oxidation of milk and butter. *J Dairy Sci*. 95. p 2797-2809, 2012.
- GOMES, R.M.S. *Óleo de buriti e babaçu na composição da dieta de ovinos*. Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Ciência Animal. Universidade Federal do Maranhão. UFMA. 2018.
- GONZÁLEZ, F.D., SILVA, S.C. *Introdução à bioquímica clínica veterinária*. 2.ed. 364p Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2006.
- GRIINARI, J.M, BAUMAN, D.E. Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk of ruminants. In: *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*. p. 180-200. 1999.
- GRIINARI, J.M.; DWYER, D.A.; MCGUIRE, M.A. *et al.* Transoctadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*. v.81, p.1251-1261, 1998.
- GRIINARI, J.M., DWYER, D.A., MCGUIRE, M.A. *et al.* Partially hydrogenated fatty acid and milk fat depression. *J Animal Sci*. v. 79. p.177. 1996.
- GULATI, S.K.; J.R. ASHESA, J.R.; SCOTTB, T.W. Hydrogenation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids and their incorporation into milk fat. *Anim Feed Sci Technol*. 79. p. 57-64. 1999.
- HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: P.N Hobson, C.S Stewart (Editors). *The Rumen Microbial Ecosystem*. Stewart Published by Blackie Academic and Professional. London, p.382-419, 1997
- HAVEMOSE, M.S. Oxidative stability of milk influenced by fatty acids, antioxidants, and copper derived from feed. *J Dairy Sci*. v. 89. n 6. p. 1970- 1980. 2006.
- HARTMANN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*. v. 22, n. 6, p. 475-476, 1973.

HUANG, D.; OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M. *et al.* Highthroughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem.* 50, p. 4437–4444, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. 2018 Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/producao>> Acessado em 23 de fev. 2019.

JAHREIS, G.; FRITSCH, J.; STEINHART, H. Conjugated linoleic acid in milk fat: high variation depending on production system. *Nutr Res.* v. 17, n. 9, p. 1479-1484, 1997.

JENKINS, T.C. Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76:3851-3863. 1995.

JENKINS, T.C. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *J. Animal Sci.* v.86 p.397-412, 2008.

JERSEN, R.G. The Composition of Bovine Milk Lipids: January 1995 to December 2000. *J. Dairy Sci.* v 85. p. 295-350. 2002.

JEYANATHAN, J.; ESCOBAR M.; WALLACE, R.J. *et al.* Biohydrogenation of 22:6n-3 by *Butyrivibrio proteoclasticus* P18. *BMC Microbiol.* v.16:104, 2016

JONES, M.L.; MARK, P.J.; MORI, T.A. *et al.* Maternal dietary omega-3 fatty acid supplementation reduces placental oxidative stress and increases fetal and placental growth in the rat. *Biol Reprod.* 2013.

KEPLER, C.R., HIRONS, K.P., MCNEILL, J.J. *et al.* Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 241:1350-1354. 1966.

KITESSA, S. M. Supplementing grazing dairy cows with protected tuna oil enriched milk fat with n-3 fatty acids without affecting milk production or sensory characteristics. *Br J Nutr.* 91(2). 2004.

KING, R.L. Oxidation of milk fat globule membrane material. I - Thiobarbituric acid reaction as a measure of oxidized flavor in milk and model systems. *J. Dairy Sci.* v.45, p.1165-1171, 1962.

KOLANOWSKI, W.; LAUFENBERG, G. Enrichment of food products with polyunsaturated fatty acids by fish oil addition. *Eur. Food Res. Technol.* v. 222, p. 472–477, 2006.

KUS, M.M.M. Ácidos graxos: eicosapentaenóico (EPA) e docosaheptaenóico (DHA). In: *Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes*. ILSI - International Life Sciences Institute do Brasil. 2010.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control.* v. 12, p. 99-107, 2001a.

LAMMINEM, M.; HALMEMIES-BEAUCHET-FILLEAU, A.; KOKKONEN T. *et al.* Different microalgae species as a substitutive protein feed for soya bean meal in grass silage based dairy cow diets. *Anim Feed Sci Technol*, v.247, p.112-126, 2019.

LAMMINEN, M.; HALMEMIES-BEAUCHET-FILLEAU, A.; KOKKONEN, T.; SIMPURA, I. *et al.* Comparison of microalgae and rapeseed meal as supplementary protein in the grass silage based nutrition of dairy cows. *Anim Feed Sci Technol.* 234. p. 295-311. 2017.

LIN, H.; BOYSLON, T.D.; CHANG, M.J. *et al.* Survey of the conjugated linoleic acid contents of dairy products. *J. Dairy Sci.* v.78, n.11, p.2358-2365, 1995.

LINDMARK-MANSSON, H.; AKESSON, B. Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr.* v.84, p.103-110, 2000.

MACFADDEN, J.R.; HUFFMAN, W.E. Willingness-to-pay for natural, organic, and conventional foods: The effects of information and meaningful labels. *Food Policy.* v 68, p. 214-232. 2017.

MARQUES, J.A.; GHIZZI, L.G.; DIAS, M.S.S. *et al.* Efeito de doses crescentes de microalgas ricas em DHA na dieta de vacas leiteiras. In: BALIEIRO *et al.* *Novos desafios da pesquisa em nutrição e produção animal.* p.141-158. 2018.

MARTINEZ, J.C. O perfil de ácidos graxos na gordura do leite é importante? 2009 Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br/radar-tecnico/nutricao/o-perfil-de-ácidos-graxos-na-gordura-do-leite-e-importante-53030n.aspx> Acessado em 10 de jul. 2018.

MCGUIRE, M.A., MCGUIRE, M.K., GUY, M.A. *et al.* Effect of dietary lipid concentration on content of conjugated linoleic acid (CLA) in milk from dairy cattle. *J. Animal Sci.* 74. 266. 1996.

MERTENS, D.R. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beaker or crucibles: collaborative study. *J. AOAC Int.* v.85, p.1217-1240, 2002.

MISCHOULON, D.; FREEMAN, N.P. Omega-3 fatty acids in psychaiatry. *Psychiatr Clin North Am.* 36(1) P. 15-23. 2013

MINISTERIO DA AGRICULTURA PECUARIA E ABASTECIMENTO – MAPA 2018 Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos> acessado em 10 de jul. 2018.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Instrução Normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011.

MOATE, P.J.; WILLIAMS, S.R.O.; HANNAH, M.C. *et al.* Effects of feeding algal meal high in docosahexaenoic acid on feed intake, milk production, and methane emissions in dairy cows. *J. Dairy Sci.* v. 96 p 3177–3188. 2013

MORAN, C.A.; MORLACCHINI, M.; KEEGAN, J.D. *et al.* The effect of dietary supplementation with Aurantiochytriumlimacinum on lactating dairy cows in terms of animal health, productivity and milk composition. *J Anim Physiol Anim Nutr.* p. 1-15. 2017.

MOTA, C.S.C. *Avaliação do potencial de utilização de microalgas como alimento alternativo na alimentação de animais de produção.* Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrônômica. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 2018.

NATACCI, L.C. *Associação entre consumo de ácido graxo ômega 3 e transtornos de ansiedade: análise transversal do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-*

Brasil). Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2018.

NOGUEIRA, C.R.; BÁNKUTI, S.M.S.; LOURENZANI, A.E.B.S. *et al.* Coordenação de sistemas agroalimentares diferenciados: um estudo sobre o leite orgânico no Paraná. *Gestão e Regionalidade*. Vol.43. n. 100. 2018.

ODEBERG, J.M.; PETTERSSON, A.; LIGNELL, A. *et al.* Oral bioavailability of the antioxidant astaxanthin in humans is enhanced by incorporation of lipid based formulations. *Eur. J. Pharm. Sci.* 19(4) p.299-304. 2003.

OLIVEIRA, A. N.; PIRES. E.S.; PINTO, M.R. *Ácidos graxos ômega 3 e 6*. Universidade Federal De Viçosa Departamento De Tecnologia De Alimentos Especiais Em Ciências E Tecnologia Dos Alimentos-Funcionais E Compostos Bioativos. 2010.

OLIVEIRA, J.F.G. *Diferentes relações $\omega 6/\omega 3$ na dieta de galinhas poedeiras*. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas. Mestrado em Ciência e Tecnologia Animal. 2018.

OLIVEIRA. J, S. Processo fermentativo, digestivo e fatores antinutricionais de nutrientes para ruminantes. *Rev. electrón. vet.* p. 1695-7504. Volume VIII Número 2. 2007.

ORGANIC TRADE ASSOCIATION – OTA. 2018 Disponível em: <https://ota.com/resources/organic-industry-survey>. Acessado em 20 de fev. 2019.

PALMQUIST, D.L.; BEAULIEU, A.D. Feed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* v.76, p.1753-1771, 1993.

PARODI, P.W. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agent. *J. Nutr.* 127. p. 1055-1060. 1997.

PERES, J.R. O leite como ferramenta do monitoramento nutricional. In: *Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras*. Porto Alegre: Gráfica da UFRGS. p. 30-45. 2001.

PERINI, J. A. D. L.; STEVANATO, F. B.; SARGI, S. C. *et al.* Ácidos graxos poli-insaturados $\omega 3$ e $\omega 6$: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Rev Nutr.* vol.23 no.6 Campinas. 2010.

PIPEROVA, L.S.; TETER, B.B.; BRUCKENTAL, I. *et al.* Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat depressing diet. *J Nutr.* v.130, p.2568-2574, 2000.

RICHMOND, A. Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycolgy. *Oxford: Blackwell Science.* p. 566. 2004.

RYCKEBOSCH, E.; BRUNEEL, C.; TERMOTE-VERHALLE, R. *et al.* Nutritional evaluation of microalgae oils rich in omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids as an alternative for fish oil. *Food Chemistry.* v.160, p.393-400, 2014.

SANTOS, C.B. *Parâmetros hematológicos, bioquímicos e ruminais de cabras lactantes alimentadas com dietas contendo resíduo lipídico oriundo da produção de biodiesel.* Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Mestrado em Produção Animal. Universidade Federal do Piauí. 2016.

SANTOS, F.L.; SILVA, M.T.C.; LANA, R.P. *et al.* Efeito da suplementação de lipídios na ração sobre a produção de ácido linoleico conjugado (CLA) e a composição da gordura do leite de vacas. *Rev. Bra. de Zootecnia.* v. 30. p. 1931-1938, 2001.

SAS - Institute Inc., Cary, NC, USA. SAS/STAT User's guide. Cary: Statistical Analysis System Institute. 2003.

SCHMID, A.; COLLOMB, M.; SIEBER, R. *et al.* Conjugated linoleic acid in meat and meat products: a review. *Meat Sci* 73. p. 29-40. 2006.

SENGER, C.C.D.; SANCHEZ, L.M.B.; KOZLOSKI, G.V. *et al.* Evaluation of autoclave procedures for fibre analysis in forage and concentrate feedstuffs. *Anim Feed Sci Technol.* Amsterdam, v.146, p. 169– 174, Sep. 2008.

SHINGFIELD, K.J.; LEE, M.R.F.; HUMPHRIES, D.J. *et al.* Effect of incremental amounts of fish oil in the diet on ruminal lipid metabolism in growing steers. *Br J Nutr.* p. 56-66, 2010.

SCHROEDER, G.F.; GAGLIOSTRO, G.A.; BARGO, F. *et al.* Effects of fat supplementation on milk production and composition by dairy cows on pasture: a review. *Livest Sci* v. 86, n 1–3, p 1-18, 2004.

SILVA, L.G. *Farinha de algas marinhas (schizochytrium sp.) e vitamina E na alimentação de cordeiros confinados*. Programa de Pós Graduação em Zootecnia. Mestrado em Zootecnia. Universidade estadual Paulista- UNESP. 2018.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. 3ª ed. Viçosa: UFV, 235p. 2002.

SINEDINO, L.D.P., Effects of supplementation with docosahexaenoic acid on reproduction of dairy cows. *Reproduction*. 2017.

SNIFFEN, C.J., O'CONNOR, D.J., VAN SOEST, P.J. *et al.* A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: Carbohydrate and protein availability. *J. Anim. Sci.* p. 70, 1992.

SOARES, J. P. G.; DIAS, J.; ALMEIDA, D. L. *et al.* Produção orgânica de capim elefante em consórcio com siratro sob manejo de cortes In: *IV Congresso Brasileiro de Agroecologia*. 2006.

SOARES, J.P.G.; CARVALHO, J.M.; NEVES, D.L. Produção de carne bovina em sistema orgânico. Desafios e tecnologias para um mercado em expansão. In: *Bovinocultura de corte desafios e tecnologias*. pp.701-725. 2014

SOUZA, A.B.B.; ALMEIDA, N.M. Ácidos graxos em peixes marinhos e de água doce: Um comparativo. *Revista Cientec*. Vol. 10. p. 105-120. 2018.

SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E. *et al.* Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* v.101, p.87-96. 2006.

STAMEY, J.A.; SHEPERD, D.M.; DE VETH, M. J. *et al.* Use of algae or algal oil rich in ω 3 fatty acids as a feed supplement for dairy cattle. *J. Dairy Sci.* v.95, p.5269–5275. 2012.

STERGIADIS, S.; BERLITZ, C.B.; CAÇA, B. *et al.* An update to the fatty acid profiles of bovine retail milk in the United Kingdom: Implications for nutrition in different age and gender groups. *Food Chemistry*. Volume 276, 2019.

TILL, B. E. *The effect of feeding microalgae on rumen fermentation, milk and cheese fatty acid profile and fertility in dairy cows*. Harper Adams University. 2018.

TOMALUSKI, C.; CARNEIRO, N.T.; FASOLO, E. *et al.* Uso de microalgas na produção animal. IN: *Investigação científica e técnica em ciência animal*. Editora Atena. Ponta Grossa (PR). p.186. 2018.

TORAL, P.G.; HERVÁS, G.; LESKINEN, H. *et al.* In vitro ruminal biohydrogenation of eicosapentaenoic (EPA), docosapentaenoic (DPA), and docosahexaenoic acid (DHA) in cows and ewes: Intermediate metabolites and pathways. *J Dairy Sci.* v. 101 p.1–13. 2018.

TSIPLAKOU, E.; ABDULLAH, M. A.; ALEXANDROS, M. *et al.* The effect of dietary *Chlorella pyrenoidosa* inclusion on goats milk chemical composition, fatty acids profile and enzymes activities related to oxidation. *Livestock Science.* 197, 106-111. 2017

TSIPLAKOU, E.; ABDULLAH, M.; MAVROMMATIS, A. *et al.* The effect of dietary *Chlorella vulgaris* inclusion on goat's milk chemical composition, fatty acids profile and enzymes activities related to oxidation. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 102(1), 142-151. 2018.

VAHMANI, P., FREDEEN, A., GLOVER, K. Dairy system impacts on milk fat composition related to human health. p. 47–60 in *Milk Fat: Composition, Nutritional Value and Health Implications*. Nova Science Publishers Inc. Hauppauge, NY. 2013a.

VAHMANI, P., FREDEEN, A., GLOVER, K. Effect of supplementation with fish oil or microalgae on fatty acid composition of milk from cows managed in confinement or pasture systems. *J Dairy Sci.* v.96, p.6660-6670, 2013b.

VARGAS, L. H.; LANA, R P.; JHAM, G.N. *et al.* Adição de Lipídios na ração de vacas leiteiras: Parâmetros fermentativos ruminais, produção e composição do Leite. *R Bras Zootec.* v.31, n.1, p.522-529, 2002.

VILADOMIU, M. HONTECILLAS, R. BASSAGANYA-RIERA, J. Modulation of inflammation and immunity by dietary conjugated linoleic acid. *Eur. J. Pharmacol.* 785. p. 87-95. 2016.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova* vol.35 no.2. 2012.

WILLER, H; LERNOUD, J. E. The World of Organic Agriculture Statistics and Emerging Trends. Research Institute of Organic Agriculture (FiBL), Frick, and IFOAM – Organics International, Bonn, 2016.

WILLER, H; LERNOUD, J. The world of organic agriculture statistics and emerging trends, research institute of organics agriculture FiBL on IFOAM organics international, Born, Germany .2017.

WITTWER, F.; CONTRERAS, P.A. Consideraciones sobre el empleo de los perfiles metabólicos en ganado lechero. *Archivos de Medicina Veterinaria*, v.12, n.1, p.180-188, 1980.

WOOD, J.D.; ENSER, M.; RICHARDSON, R.I *et al.* “Chapter 5: Fatty acids in meat and meat products. In: *Fatty acids in foods and their health implications*. New York. 2008.

WU, Z., HUBER, J.T. *Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: a review*. 1994.

ZEISEL, S.H.- Regulation of nutraceuticals. *Science* v. 285:1853-55. 1999.

ZYMON, M, STRZETELSKI, J.; SKRZYŃSKI, G. Aspects of appropriate feeding of cows for production of milk enriched in fatty acids, EPA and DHA. A review. *Journal of Animal and Feed Sciences*. v.23, p.109–116, 2014.