

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

SUPLEMENTAÇÃO COM LINHAÇA (*Linum usitatissimum*)
DE VACAS GIROLANDO: PARÂMETROS NUTRICIONAIS
E PERFIL LIPÍDICO DOS OÓCITOS

Acadêmico: Christopher Junior Tavares Cardoso

Aquidauana-MS
Fevereiro/2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

SUPLEMENTAÇÃO COM LINHAÇA (*Linum usitatissimum*)
DE VACAS GIROLANDO: PARÂMETROS NUTRICIONAIS
E PERFIL LIPÍDICO DOS OÓCITOS

Acadêmico: Christopher Junior Tavares Cardoso

Orientadora: Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós – Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado – Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em

Aquidauana-MS
Fevereiro/2016

AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre esteve ao meu lado durante os melhores e piores momentos passados aqui.

À minha mãe, por não medir esforços, me aconselhando, amando e educando para que não desistisse dos meus objetivos.

Ao meu pai, que apesar de todos os imprevistos e dificuldades sempre fazia o que podia para poder me ajudar no que estivesse ao seu alcance quando eu precisava.

À minha família, pessoas que sempre se dedicaram, aconselharam, oraram e amaram, e sempre apoiaram no que eu precisasse para que eu pudesse chegar onde estou.

Ao médico veterinário Evaldir Frank, um dos principais incentivadores a dar motivos para que eu pudesse estar onde estou dentro do ramo da Zootecnia, apoiando desde o momento da opção da escolha do curso, apoiando e às vezes até me cobrando, querendo resultados, agradeço por acreditar em mim até hoje.

À minha querida orientadora Dra. Fabiana de Andrade Melo-Sterza que há anos me acompanha nessa jornada de pesquisa, por sua paciência, confiança, orientação e incentivo, permitindo que sonhos pudessem ser concretizados, sendo responsável por grande parte do meu crescimento profissional e pessoal durante o período acadêmico, agradeço de coração.

À CAPES e FUNDECT pelo fomento da pesquisa, além da bolsa recebida.

Ao programa de Pós-graduação em Zootecnia da UEMS. Agradeço a cada um dos professores do programa, pelo incentivo e apoio no meu

crescimento profissional, sempre orientando, exigindo e cobrando resultados, pois sabiam que só assim iriam desafiar a minha capacidade.

Aos integrantes do grupo GENTRA. André Fialho, Mirela Brochado, Mariane Gabriela, Wilian Leite, Elielton Arruda, Henrique Kischel, Ruan, Caroline Bini, Caroline Ferreira, Giovana Ortiz, Jessica Rodrigues, Nádila, Daniela Moraes e Jonathan Santos, pelo companheirismo de sempre e auxílio nos experimentos, direta ou indiretamente, proporcionando com que cada atividade fosse feita sem perder o humor.

Ao Prof. Dr. Marcus Vinicius de Oliveira Moraes pela orientação, incentivo, fazendo com que eu buscasse agregar valor nos trabalhos e como sempre ajudando no meu crescimento pessoal e profissional.

À equipe do laboratório de Nutrição Animal, Pedro, Mariane, Gregório e ao técnico Gustavo, pelo suporte e ajuda nas análises bromatológicas.

Aos técnicos do setor de bovinocultura leiteira da UEMS, Marcel, Gilmar e Evandro, pela ajuda durante o período experimental.

Ao Dr. Ériklis Nogueira pelo excelente suporte nos experimentos, apesar de todos seus afazeres arrumava tempo para suprir nossas necessidades, e sempre presente mesmo distante.

À equipe de Reprodução Animal da EMBRAPA-Cenargen, Dra. Margot, Dr. Mauricio, Anelise, Luzia, Sara, Felipe, Andrielle, Ligiane e Gabriela pelo acolhimento e suporte durante as análises realizadas em Brasília.

Ao Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva da EMBRAPA – Cenargen pela possibilidade da realização das análises de espectrometria de massa e interpretação dos resultados.

À Prof. Dra. Alda Izabel de Souza da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS pela possibilidade da realização das análises dos metabólitos sanguíneos.

Aos integrantes e agregados da República PiPinelas, Néia, Leandro, Douglas, Gustavo, Anderson, Abner e Saymon, pelo companheirismo e auxílio direto e/ou indireto nos experimentos realizados.

A todos que de uma maneira ou outra participaram da minha formação e ajudaram na realização desse trabalho, o meu: Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais	1
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hipótese	2
1.2 Objetivo geral	2
1.3 Objetivos específicos	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Linhaça	3
2.2 Consumo, degradabilidade e digestibilidade de sementes de linhaça ...	4
2.3 Ácidos graxos	6
2.4 Metabolismo dos ácidos graxos nos ruminantes	8
2.5 O Ovário bovino	12
2.6 Foliculogênese	12
2.7 Folículos ovarianos	13
2.8 População folicular	15
2.9 Oôgenese	16
2.10 Importância da maquinaria do oócito na embriogênese	18
2.11 Membrana plasmática	21
2.12 Efeitos da suplementação lipídica sobre a reprodução e na qualidade oocitária.....	23
2.13 Matrix-assisted laser desorption and ionization - time of flight/ espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS) em análises de lipídios e fosfolipídios	27
3. Referências Bibliográficas	29

CAPÍTULO 2 – Artigo científico (Pesquisa Agropecuária Brasileira)	40
Desempenho e características digestivas em bovinos leiteiros mantidos em regime de pastoreio suplementados com linhaça.....	40
INTRODUÇÃO	41
MATERIAIS E MÉTODOS	42
RESULTADOS	48
CONCLUSÕES.....	58
AGRADECIMENTOS.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
CAPÍTULO 3 – Artigo científico (Theriogenology)	61
Performance nutricional e perfil lipídico de oócitos de fêmeas bovinas suplementadas com linhaça	61
1. INTRODUÇÃO	62
2. MATERIAL E MÉTODOS	64
2.1 Animais e local do experimento	64
2.2 Delineamento experimental	65
2.3 Consumo e digestibilidade	66
2.4 Degradabilidade ruminal de linhaça	67
2.5 Coleta de sangue e análise de metabólitos sanguíneos	67
2.6 Aspiração folicular <i>in vivo</i> guiada por ultrassonografia	68
2.7 Análise lipídica por MALDI-TOF/MS	69
2.7.1 Design experimental	69
2.7.2 Preparação das amostras e aquisição dos dados	69
2.8 Análises estatísticas dos dados de campo	70
3. RESULTADOS	70
3.1 Consumo, degradabilidade ruminal e digestibilidade	70
3.2 Metabólitos plasmáticos	73
3.3 Aspiração folicular, recuperação e qualidade oocitária.....	74
3.4 Perfil lipídico dos oócitos por MALDI-TOF	75
4. DISCUSSÃO	76
5. CONCLUSÃO	80
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
CAPÍTULO 3 - Considerações finais.....	84

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1- Composição química, expressa na matéria seca, do capim potencialmente ingerido e dos grãos de linhaça marrom.....	49
Tabela 2: Composição dos ácidos graxos presentes nas sementes de linhaça.	49
Tabela 3: Consumo diário, expresso na matéria seca, de vacas suplementadas com linhaça.	50
Tabela 4: Percentagem de desaparecimento ruminal médio da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e extrato etéreo (EE) do capim-mombaça e da semente de linhaça, em função dos tempos de incubação	52
Tabela 5: Valores dos coeficientes "a", "b", "c" e "l", referentes a degradabilidade ruminal da matéria seca e suas degradabilidades efetivas (DE) para as velocidades de passagem de 2, 5 e 8 % por hora do capim-mombaça e da semente de linhaça, de acordo com a dieta ingerida.	53
Tabela 6: Coeficientes de digestibilidade, expressos na matéria seca, das dietas controle (capim-mombaça) e Linhaça (capim-mombaça mais linhaça) em vacas Girolando, mantidas em regime de pastoreio.	55
Tabela 7: Concentrações plasmáticas dos metabólitos sanguíneos, em vacas Girolando mantidas em regime de pastoreio em capim-mombaça, com ou sem a suplementação de grãos de linhaça.	57
Tabela 8: Pesos corpóreos inicial e final e ganhos diários em vacas Girolando mantidas em regime de pastoreio em capim-mombaça, com ou sem suplementação com grãos de linhaça.	58
Tabela 8: Composição bromatológica dos alimentos	Erro! Indicador não definido.

Tabela 9: Consumo diário na matéria seca de fêmeas bovinas tratadas com linhaça.	70
Tabela 10: Parâmetros cinéticos da degradação <i>in situ</i> da matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) da linhaça.	72
Tabela 11: Coeficientes de digestibilidade da dieta de fêmeas bovinas manejadas sob pastejo e tratadas com linhaça.	73
Tabela 9: Média±DP do número de oócitos recuperados (viáveis e inviáveis) e taxa de viabilidade de vacas Girolando suplementadas com linhaça (LINH) ou não (CONTR).	75
Figura 6: Esquema da lipólise em triacilglicerídeos (Adaptado de ROSA, 2014).	9
Figura 7: Esquema do metabolismo de lipídios em ruminantes (Adaptado de Kosloski, 2011)	10
Figura 1: Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos.	13
Figura 2: Esquema ilustrando a origem das células da pré-granulosa durante a formação dos folículos primordiais. (Adaptado de Juengel et al., 2002).	17
Figura 3: Esquema representando os processos de oôgenese e foliculogênese relacionados. (Adaptado de Lemes, 2013).	18
Figura 4: Composição da membrana plasmática. Fonte: http://www.clickescolar.com.br/a-membrana-celular.htm	21
Figura 5: Partes de uma molécula de um fosfolipídio (fostatidilcolina)	23
Figura 8: Descrição da técnica de MALDI-TOF. (Adaptado de Croxatto, 2012).	28
Figura 10: Delineamento experimental.	66
Figura 11: Degradabilidade potencial da matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE).	72
Figura 11: Efeitos da suplementação lipídica na dieta sobre os metabólitos sanguíneos (colesterol, albumina e glicose).	74
Figura 13: Perfil lipídico dos oócitos de fêmeas bovinas suplementadas com linhaça	76

RESUMO

Os grãos de oleaginosas são utilizados em dietas para ruminantes pelas altas concentrações de lipídeos. A linhaça destaca-se pela composição de ácidos graxos, ricos em ácidos insaturados (linoleico e linolênico) e por apresentar lenta liberação do óleo a nível ruminal. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com linhaça sobre o consumo, digestibilidade e degradabilidade ruminal, metabólitos sanguíneos (glicose, albumina e colesterol séricos), bem como a qualidade e perfil lipídico de oócitos bovinos. Foram utilizadas 12 fêmeas bovinas da raça Girolando mantidas em sistema de pastejo rotacionado de capim *Panicum Maximum* sp. (cv. Mombaça), e divididas em 2 grupos experimentais. O grupo CONTR (n=6) recebeu apenas a dieta base (pastagem) e o grupo LINH (n=6) recebeu suplementação com 800 g/animal/dia de linhaça marrom. A biomassa forrageira não apresentou diferenças durante o período experimental.

Não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) no número médio de CCOs recuperados e a taxa de viabilidade. Não houve efeito ($P>0,05$) da suplementação lipídica sobre os metabólitos sanguíneos entre os grupos e as OPUs. Os animais do grupo LINH consumiram mais proteína bruta e extrato etéreo e tiveram menor consumo de fibra insolúvel em detergente neutro, porém não foi suficiente para alterar o ganho de peso e os coeficientes de digestibilidade, exceto do extrato etéreo. A linhaça fornecida em grão para os animais, teve baixa degradabilidade efetiva e potencial, no entanto reduziu a degradabilidade do capim quando consumida na quantidade fornecida nesse experimento. A suplementação de 0,800 kg de linhaça na dieta de vacas Girolando não alterou o perfil lipídico dos oócitos.

Palavras chave: criopreservação, ácidos graxos, embriões.

ABSTRACT

The oil seeds are used in ruminant diets by high concentrations of lipids. Flaxseed stands out for the fatty acid composition, rich in unsaturated acids (linoleic and linolenic) and provide slow release of oil rumen level. The objective this study was to evaluate the effect of supplementation with flaxseed on intake, digestibility and rumen degradability, blood metabolites (glucose, albumin and cholesterol serum), as well as the quality and lipidic profile of bovine oocytes. Were used 12 bovine females of Girolando breed kept in a rotational grazing system of grass *Panicum Maximum* sp. (Cv. Mombasa), and divided into two experimental groups. The CONTR group (n=6) received basic diet (pasture) and the LINH group (n=6) received supplementation with 800g/animal/day flaxseed. The forage biomass did not differ during the experimental period. There were no significant differences ($P > 0.05$) in the average number of recovered COCs and viability rate. There was no effect ($P > 0.05$) of lipid supplementation on blood metabolites between groups and OPU. The animals of LINH group consumed more crude protein and ether extract and had lower consumption of insoluble fiber, neutral detergent, but it was not sufficient to change the weight gain and digestibility coefficients except ether extract. The flaxseed provided grain for the animals, had low degradability and potential, but reduced the grasses of degradability when consumed in quantity supplied in this experiment. The supplementation of 0.800 kg of flaxseed in the diet of Girolando cows did not alter the lipid profile of oocytes.

Key words: cryopreservation, fatty acids, embryos.

CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais

1. INTRODUÇÃO

Dentre os fatores que afetam a criação de bovinos, a nutrição é a que tem o maior impacto. De maneira geral, animais mal nutridos apresentam desempenho produtivo e reprodutivo inexpressivos. Assim, torna-se cada vez mais evidente a importância da nutrição sobre a expressão do potencial dos animais.

O aumento da densidade energética da dieta através da suplementação com gordura é uma prática comumente utilizada, principalmente em rebanhos leiteiros. Atualmente, tem-se enfatizado a importância da inclusão de duas famílias de ácidos graxos essenciais na alimentação: Ômega 3 (n-3) e Ômega 6 (n-6), também conhecido por ácido linolênico e linoléico, respectivamente. Os mesmos são denominados essenciais, pois devem ser obtidos a partir da alimentação, já que o organismo é incapaz de produzi-los na velocidade necessária para atender a demanda do animal (WATHES et al., 2007).

No entanto, a suplementação com gorduras livres na dietas de bovinos afeta negativamente a digestão de fibras, em razão da ação dos ácidos graxos de cadeia longa sobre os microrganismos ruminais (HIGHTSHOE et al., 1991). Uma das maneiras de evitar a bio-hidrogenação e, conseqüentemente, o efeito negativo na fermentação ruminal, é fornecer a gordura na forma protegida ou como sementes integrais de oleaginosas (HUSSEIN et al., 1995; ANDRADE et al., 2001).

Para ruminantes criados em regiões de clima tropical, o uso de sementes oleaginosas ainda é interessante por reduzir o incremento calórico e auxiliar no processo de aclimatação (PAULA et al., 2012), além de diminuir distúrbios metabólicos, geralmente causados por dietas contendo elevados níveis de amido.

A linhaça em grão é um alimento rico em ácidos graxos poli-insaturados, em especial o ácido linolênico (KENNELLY, 1996), e por estar na forma de grão, o óleo da linhaça tem liberação mais lenta, diminuindo, assim, a bio-hidrogenação ruminal (CAVALIERI et al., 2005).

Sabe-se que diversos ácidos graxos possuem efeitos diferentes nas respostas reprodutivas, podendo ser positivos ou efeito nenhum. Apesar das dificuldades de fornecimento de ácidos graxos poli-insaturados (do inglês: poli unsaturated fat acids – PUFAs) para ruminantes, a maioria dos estudos indicam que os ácidos graxos n-6 e n-3 exercem mais efeitos benéficos sobre a reprodução, em fêmeas bovinas (SANTOS et al., 2008).

No entanto, alguns resultados são contraditórios quando se utilizam da suplementação lipídica para bovinos, pois na maioria das vezes é impossível distinguir o nível de impacto dos PUFAs sobre os oócitos (LEROY et al., 2010). Todavia, pouco se sabe sobre como os folículos e os oócitos absorvem esses AGs.

Nesse contexto, diversos estudos vem sendo realizados com o objetivo de avaliar o fornecimento de diferentes fontes de lipídios na dieta dos animais buscando melhoras na condição reprodutiva e o aproveitamento da dieta fornecida ao rebanho.

1.1 Hipótese

A hipótese desse trabalho é que a linhaça integral promove alterações nos parâmetros nutricionais bem como no perfil lipídico dos oócitos em função do tempo de suplementação.

1.2 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da suplementação com linhaça integral na performance de vacas Girolando e na qualidade e perfil lipídico de oócitos em função do tempo de suplementação.

1.3 Objetivos específicos

Avaliar a digestibilidade de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA), matéria mineral (MM), carboidratos totais (CHOT), carboidratos não fibrosos (CNF) e nutrientes digestíveis totais (NDT) dos alimentos ofertados;

Avaliar a degradabilidade da MS, PB, EE, FDN e FDA dos alimentos ofertados;

Avaliar as concentrações séricas de glicose, albumina e colesterol de acordo com o período de suplementação.

Avaliar o efeito da suplementação lipídica sobre a recuperação e qualidade oocitária.

Avaliar o perfil lipídico dos oócitos de fêmeas bovinas de acordo com o período de suplementação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Linhaça

O linho (*Linum usitatissimum* L.), é uma planta pertencente à família das *Linaceas*, caracterizada por apresentar uma altura de 30 a 130 cm, talos eretos, folhas estreitas lineares ou lanceoladas, alternando entre verde escuro e verde claro. O fruto consiste de capsula globosa, da qual saem as sementes brilhantes e planas. É reconhecida devido a importância do consumo do grão do linho. São cultivadas as variedades de colorações marrom e dourada (MORRIS e VAISEY-GENSER, 2003), sendo que a marrom tem sido mais cultivada no Brasil (TRUCOM, 2006).

A semente oleaginosa, é rica em gordura, fibra dietética e proteínas. Sua composição em média é de 35% de lipídio, 26% de proteína, 14% de fibra alimentar total, 9% de umidade, 4% de cinzas (CORREIA, 2001). A quantidade de gordura na linhaça pode variar de 34-47%, dependendo da localização, cultivo e condições ambientais (OOMAH et al., 1997).

A linhaça é um alimento rico em ácidos graxos poli-insaturados das famílias n-3 (α -linolênico) e em menor quantidade nos da família n-6 (linoleico). Também contém ácidos graxos monoinsaturados (palmitoléico, oleico, gadoléico erúico, e nervônico) e saturados (cáprico, láurico, mirístico, pentadecílico, palmítico, margárico, esteárico, araquídico, behênico e lignocérico) (NEPA-UNICAMP, 2011) e quando fornecida na forma de grão, o óleo presente na linhaça tem liberação mais lenta, diminuindo, assim, a bio-hidrogenação ruminal (CAVALIERI et al., 2005).

O ácido graxo essencial α -linolênico, responsável por 40 a 60% dos ácidos graxos do óleo da linhaça, torna esse alimento uma das mais ricas fontes desse nutriente (MADHUSUDHAN, 2009). O ácido graxo essencial linoleico também está presente em quantidade menor (16%). Devido ao

elevado teor de α -linolênico, a linhaça apresenta relação linoleico:linolênico bastante favorável de 0,3:1 (MORRIS e VAISEY-GENSER, 2003). Vale ressaltar, que o ácido α -linolênico possui teores menores no óleo de canola e no óleo de soja (9,1% e 6,8%, respectivamente) e teores menores ainda nos óleos de milho, algodão e girassol (TARPILA et al., 2002).

2.2 Consumo, degradabilidade e digestibilidade de sementes de linhaça

A linhaça é uma excelente fonte de ácidos graxos ômega-3, que são conhecido por ser anti-carcinogênico, por evitar doenças cardiovasculares, e por aumentar a atividade visual (WRIGHT et al., 1998). No entanto, diversos estudos vêm sendo realizados para determinar o consumo de linhaça para ruminantes e seus efeitos sobre o consumo e digestibilidade de outros nutrientes

Alimentando com até 15% da MS total com linhaça, não foi observado nenhum efeito sobre a ingestão de matéria seca de vacas leiteiras em lactação (KENNELLY & KHORASANI, 1992). Além disso, vacas leiteiras suplementadas com sementes de linhaça tratadas com formaldeído a 10% na matéria seca, tiveram ausência de efeitos no consumo de matéria seca em comparação com sais de cálcio de ácido palmítico, porém, foi observado aumento nas concentrações de proteína e ácido linolênico no leite (PETIT et al., 2002), o que sugere uma melhor utilização do nitrogênio na dieta de linhaça.

Enriquecendo a dieta com linhaça inteira, vacas leiteiras apresentaram menor digestibilidade de MS e fibra do que aquelas alimentadas com soja micronizada ou Megalac. Os autores sugeriram que a soja micronizada e Megalac pode ser completamente substituído por linhaça como fonte de gordura na dieta de vacas em início de lactação sem qualquer efeito adverso na produção e que a linhaça aumenta o percentual de proteína de leite e a sua relação de ácidos linolênico:linoleico (PETIT et al., 2003).

Em outro estudo, observaram que o fornecimento de 10% de semente de linhaça na dieta para vacas primíparas em lactação causou aumento na digestibilidade do extrato etéreo, sem haver alteração na digestibilidade da matéria seca e da fibra em detergente neutro (OBA et al. 2009).

De maneira semelhante, Silva et al. (2007), suplementaram vacas leiteiras no início da lactação com dietas contendo 12% de semente de linhaça e

verificaram aumento na digestibilidade da proteína bruta e do extrato etéreo, com diminuição da digestibilidade da fibra em detergente ácido.

No entanto, a digestibilidade dos nutrientes dependem de diversos fatores. A digestibilidade da fibra está associada aos processamentos físicos que a semente de linhaça sofre, como a moagem, que facilita o acesso dos microrganismos ruminais às partículas do suplemento fornecido, diferentemente quando fornecida na forma de grão. Para Doreau et al., (2009) o efeito da semente de linhaça é dependente da quantidade fornecida, devido à alteração na taxa de passagem e baixa ingestão de matéria seca.

Os processos digestivos nos ruminantes sofrem influência do tamanho de partícula do alimento e de seu fluxo pelo rúmen. A redução do tamanho de partícula dos grãos aumenta efetivamente a área de contato superficial tornando as frações mais susceptíveis à digestão. No entanto, o conhecimento da degradabilidade ruminal de sementes de oleaginosas ainda é restrito.

Outra maneira de fornecer a linhaça aos animais é na forma de óleo. Porém, a adição de óleos vegetais na forma in natura na dieta de bovinos pode causar alterações na atividade ruminal, pois a alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados afeta alguns microrganismos, principalmente bactérias Gram (+), metanogênicas e protozoários (PALMQUIST e MATTOS, 2011), causando prejuízos no desempenho dos animais.

Além disso, o óleo presente nas dietas pode reduzir a digestibilidade da fibra, pois, o recobrimento das partículas dos alimentos pelo óleo impede que os microrganismos degradem a fração fibrosa, reduzindo a taxa de passagem dos alimentos e diminuindo o consumo de matéria seca; o que também prejudica o desempenho (PALMQUIST e MATTOS, 2011).

A utilização de óleos protegidos da degradação ruminal, através da adição de sais de cálcio ou na forma de grãos de oleaginosas, pode evitar esses efeitos deletérios sobre a atividade ruminal. Os óleos protegidos passam pelo rúmen quase de forma inerte, sendo pouco dissociados dentro dele, e não prejudicam a atividade dos microrganismos ruminais (PALMQUIST e MATTOS, 2011). Outro benefício dos óleos protegidos é que, por se tornarem sólidos, facilitam a sua utilização em fábricas de ração e aumentam a homogeneização com outros ingredientes do concentrado.

Várias pesquisas são realizadas para se avaliar a inclusão de grãos de oleaginosas na alimentação de ruminantes, como fonte de energia e proteína para a produção animal (GOES et al., 2010; MÜLLER et al., 2008; SANTOS et al., 2009). O conhecimento da degradação ruminal de grãos de oleaginosas, seja na forma inteira, triturada ou moída, ainda é restrito. Goes et al., (2011) determinaram os padrões cinéticos de degradação da matéria seca e da proteína bruta de grãos de oleaginosas (colza, canola, linhaça, caroço de algodão milho e soja) e observaram que o grão de linhaça apresentou a maior degradabilidade potencial (DP) para a MS, de 97,01% e degradabilidade efetiva (DE) de 64,24%, para taxa de passagem de 5% h⁻¹. A fração potencialmente degradável da linhaça foi de 87,89%, superior a da canola e da colza, de 76,30 e 55,34%, respectivamente. A taxa de degradação da fração “b” foi de 8,32, 3,64 e 3,95, para linhaça, canola e colza, respectivamente. Dentre os grãos avaliados a linhaça foi a que apresentou a maior fração potencialmente degradável (38,80%), porém com baixa fração solúvel.

A baixa DE apresentada pelos grãos de oleaginosas pode ser decorrente do alto teor de óleo presente, o que pode ter alterado a porosidade do saquinhos, decorrente do processo de trituração dos grãos em que parte do envoltório da amêndoa mistura-se com o óleo, causando obstrução dos poros, na malha do saco de náilon (BERAN et al., 2005; MOREIRA et al., 2003).

2.3 Ácidos graxos

Os ácidos graxos são definidos como compostos que possuem cadeia longa de hidrocarbonetos e estrutura terminal com grupo carboxila, que podem ser encontrados em sistemas biológicos, comumente ligado à molécula de glicerol (LEHNINGER et al, 1995).

A maioria dos ácidos graxos encontrado na natureza possui número de átomos de carbono que variam de 14 a 24. Estes podem ser classificados quanto à presença da dupla ligação em saturados (sem dupla ligação) ou insaturados (com uma ou mais duplas ligações) (LEHNINGER et al, 1995). Os ácidos graxos insaturados podem ser subdivididos em monoinsaturados (MUFA - uma dupla ligação) ou em poli-insaturados (PUFA - duas ou mais duplas ligações). O comprimento da cadeia, o número de duplas ligações e o

tipo de isômero formado em cada dupla ligação determina sua função biológica (MATTOS et al., 2000).

Os PUFA's são classificados em três grupos com base na estrutura química: ômega-3 (n-3), ômega-6 (n-6) e ômega-9 (n-9), sendo que a primeira dupla ligação está localizada no carbono 3, 6 ou 9, respectivamente. Os animais não sintetizam o n-3 e n-6, por não terem as enzimas dessaturases apropriadas para inserir as duplas ligações na posição correta (WATHES et al., 2007), por tal motivo, os ácidos graxos são denominados de ácidos graxos essenciais (STAPLES et al., 1998).

Por meio desses ácidos graxos essenciais, os animais têm condições de produzir outros ácidos graxos importantes no metabolismo. Ácidos graxos de uma família gera apenas ácido graxo da mesma família, ou seja, ácidos graxos da família n-3 não podem ser convertidos em ácido graxo da família n-6 e vice-versa (MATTOS et al., 2000).

As principais famílias de ácidos graxos que exercem efeito sobre as funções reprodutivas são n-3 e n-6 (STAPLES et al., 1998). O principal representante da família n-6 na dieta de ruminantes é o ácido linoleico (C18:2), abundante nos óleos vegetais (WATHES et al., 2007). De acordo com estes autores, no organismo é convertido em ácido aracdônico (C20:4 n-6), precursor das prostaglandinas dienóicas, conhecidas como prostaglandinas da série 2 (PGF2 α), estas possuem atividade luteolítica. O ácido linolênico (C18:3) é o principal representante da família n-3 que, no organismo, são convertidos a ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3), precursor das prostaglandinas trienoicas, série 3 (PGF3 α), estas possuem ação luteotróficas que estimula a atividade luteal (WATHES et al., 2007).

A inclusão de ácidos graxos na dieta de vacas, geralmente, melhora a fertilidade, cujas respostas são observadas independentemente do incremento energético da dieta. Sugerem-se ainda que as respostas sobre a fertilidade são alteradas conforme o tipo de ácidos graxos presente na dieta, sendo que os poli-insaturados tendem a apresentar maior benefício (COPPOCK E WILKS, 1991).

Vários estudos vêm sendo realizadas em busca de um melhor entendimento dos efeitos dos ácidos graxos sobre a reprodução animal, visto

que existem ainda vários questionamentos sobre a utilização das gorduras na alimentação de ruminantes.

A dieta dos ruminantes pode ser enriquecida com ácidos graxos mediante o fornecimento de sementes de oleaginosas, como linhaça, soja, girassol e canola. Essas sementes são bastante utilizadas pelas altas concentrações de lipídios e por apresentarem características desejáveis quanto à taxa de liberação do óleo, que ocorre à medida que o animal consome o alimento por meio da mastigação, chegando em pequenas frações ao rúmen (COPPOCK e WILKS, 1991).

2.4 Metabolismo dos ácidos graxos nos ruminantes

Na dieta dos ruminantes, os lipídios encontram-se principalmente na forma esterificada como mono e diglicerídeos em forragens, e como triglicerídeos nos alimentos concentrados (VAN SOEST, 1994). Plantas forrageiras geralmente contêm pequena quantidade de lipídios, com valores de 3,0 a 6,0% para a maioria das espécies. Já as sementes oleaginosas e os óleos vegetais possuem maiores teores de lipídios, com valores de 18 a 50% e 80 a 95%, respectivamente (MILINSK, 2007).

O ambiente ruminal é responsável por algumas transformações nos lipídios da dieta, alterando a composição e o perfil de ácidos graxos que chega ao duodeno devido aos processos bioquímicos (FRANCO, 2007). No rúmen, a degradação lipídica envolve dois processos: lipólise e biohidrogenação, ambos realizados por microrganismos tornando a digestão dos lipídios mais complexa, e fazendo com que boa parte dela ocorra antes que a digesta atinja o intestino delgado (VAN SOEST, 1994).

O processo de lipólise (Figura 6) consiste na quebra das ligações éster encontradas nos lipídios dos alimentos da dieta seguida pela biohidrogenação de ácidos graxos insaturados (AGI), a qual reduz o número de duplas ligações de AGI advindos das fontes de gordura (JEKINS, 1993). A hidrólise é predominantemente realizada pelas bactérias ruminais, sendo geralmente alta (>85%) e podendo ser influenciada por alguns fatores, como o nível de gordura na ração, pH ruminal e a utilização de ionóforos, que podem inibir a atividade e crescimento de bactérias (DOREAU & CHILLIARD, 1997) e os produtos

gerados gerados são ácidos graxos e glicerol, sendo o último fermentado a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC).

Os AGCC são produzidos em grandes quantidades pelos ruminantes e são formados por cadeias de um a sete átomos de carbono, sendo os principais o acético, o propiônico e o butírico (BERGMAN, 1990).

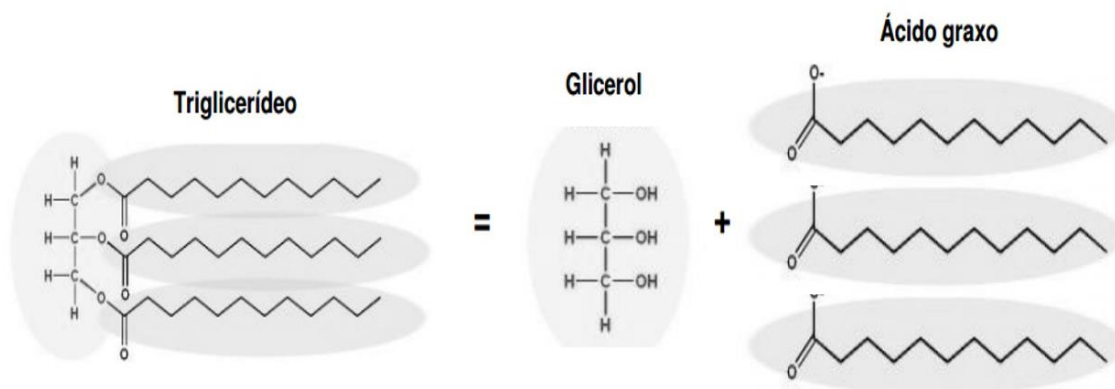


Figura 1: Esquema da lipólise em triacilglicerídeos (Adaptado de ROSA, 2014).

A velocidade da lipólise é rápida e este pode ser um fator limitante que, possivelmente, evite a formação de excessivas quantidades de ácidos graxos poli-insaturados livres, que normalmente interferem na digestão das fibras e inibem a biohidrogenação (ROSA, 2014).

A biohidrogenação é a inserção de átomos de hidrogênio nas ligações insaturadas (duplas), tornando-as saturadas (CHURCH, 1993), e tem como teoria o papel de proteger os microrganismos ruminais do efeito deletério dos ácidos graxos insaturados. Esses ácidos têm a capacidade de se incorporar nas membranas celulares dos microrganismos interferindo na sua permeabilidade e fluidez, e/ou de recobrir as partículas dos alimentos formando uma barreira física a ação dos microrganismos (Figura 7). Portanto, a inclusão de altas quantidades de lipídios na dieta (acima de 7,0% da MS) pode comprometer o desempenho animal e a digestibilidade da fibra pelos efeitos deletérios citados acima (JENKINS, 1993; KOZLOSKI, 2011).

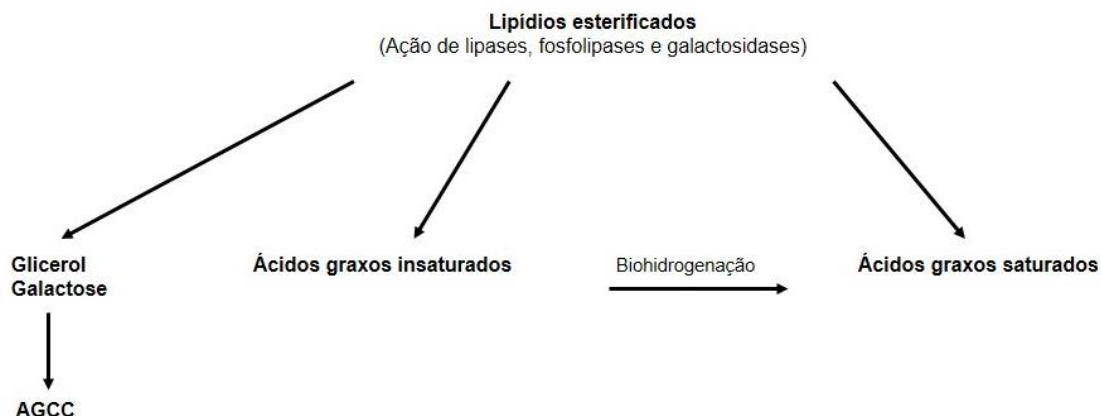


Figura 2: Esquema do metabolismo de lipídios em ruminantes (Adaptado de Kosloski, 2011)

Após a hidrólise os ácidos graxos poli-insaturados tornam-se então, disponíveis à ação microbiana para o processo de biohidrogenação, que se inicia pela isomerização da ligação *cis*-12 dos ácidos linoleico e linolênico à ligação *trans*-11, que quando resultando do ácido linolênico, formam AG *cis*-9, *trans*-11, ou ácido linoleico conjugado (CLA). Em seguida, a dupla ligação *cis*-9 é hidrogenada, produzindo C18:1 *trans*-11 e C18:2 *trans*-11, *cis*-15 para os ácidos linoleico e linolênico, respectivamente. O C18:2 *trans*-11, *cis*-15 sofre uma hidrogenação na dupla ligação *cis*-15, produzindo também C18:1 *trans*-11, o qual é também é hidrogenado na C18:1 *trans*-11, resultando em ácido esteárico C18:0. No entanto, a bio-hidrogenação não é completa, resultando em alta concentração de CLA (PENNINGTON & DAVIS, 1975).

As bactérias envolvidas na biohidrogenação têm sido classificadas em dois grupos A e B, de acordo com o padrão metabólico (KEMP & LANDER, 1984). O grupo A hidrogena os ácidos linoleico e linolênico somente a C18:1 *trans*-11, e o grupo B é capaz de hidrogenar ácidos graxos monoinsaturados a ácido esteárico. Quando ocorre biohidrogenação de ácidos graxos insaturados no rúmen, os ácidos graxos da dieta sofrem mudanças em sua estrutura química, e o perfil de ácidos graxos que passam pro abomaso é alterado, sendo que para comprovar a biohidrogenação completa de AG, maiores concentrações de ácido esteárico (C18:0) teriam que ser encontradas na digesta abomasal comprovando tal condição (HAVERTINE & ALLEN, 2006).

Nesse caso, a biohidrogenação pode ser menos dependente da concentração de hidrogênio (H) no rúmen, onde somente 1 a 2% do H

metabólico é usado para este processo (CZERKAWSK, 1984). Por outro lado, esse processo contribui para a retirada de ions H^+ do ambiente ruminal, evitando seu acúmulo, e para a redução da produção de metano (CH_4) pelas bactérias metanogênicas, uma vez que estas consomem H , aumentando dessa forma a eficiência energética da dieta de todas as duplas ligações são completamente convertidas em ligações simples, e os ácidos graxos são saturados. Enquanto a maioria dos ácidos graxos são modificados através do metabolismo ruminal, a hidrogenação não é normalmente completa, e ampla variedade de ácidos graxos são resultantes de uma biohidrogenação incompleta (BYERS & SCHEHING, 1993).

Aproximadamente 10% dos ácidos graxos poli-insaturados escapam da biohidrogenação ruminal, chegando ao duodeno, basicamente, pequenas quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, ácidos graxos saturados, e lipídios microbianos. Essa pequena quantidade de ácidos graxos poli-insaturados que passa pelo rúmen parece ser suficiente para atender às exigências dos ruminantes, pois os mesmos parecem não apresentar deficiências desses ácidos graxos (CAVALIERI et al., 2005). Todavia, sabe-se que as membranas das células animais necessitam de ácidos graxos insaturados para manter sua estrutura, fluidez e função

Para reduzir a biohidrogenação e assim, aumentar a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados que chegam ao intestino delgado é necessário fornecer dietas ricas nestes ácidos, mas também, dietas que elevem o pH ruminal (OLIVEIRA et al., 2004).

Os microrganismos responsáveis pela biohidrogenação são as bactérias celulolíticas, por serem as mais afetadas pela suplementação com gordura e diminuição do pH (PALMQUIST E JENKINS, 1980). Da mesma forma, estudos realizados por Harfoot e Hazlewood (1997), substituindo fibra por carboidrato de rápida degradação ruminal na dieta, verificaram redução nas taxas de lipólise de biohidrogenação, reafirmando a hipótese de ação dos microrganismos celulolíticos sobre o processo de biohidrogenação.

Os ácidos graxos poli-insaturados podem ser oferecidos na dieta com o uso de sementes de oleaginosas como soja, canola, girassol e linhaça. Essas sementes são bastante interessantes pelas altas concentrações de lipídios e

por apresentarem taxa de liberação desejáveis de óleo, que ocorre quando o animal tritura o alimento pela mastigação (COPPOCK & WILKS, 1991).

2.5 O Ovário bovino

O ovário é um órgão complexo que garante um ambiente ideal para a produção de hormônios esteróides e de peptídeos e liberação dos gametas femininos (JOHNSON, 2003). É composto por uma região cortical e uma medular, circundado por epitélio superficial ou germinativo que repousa sobre uma membrana basal. Abaixo dele, observa-se a túnica albugínea e o estroma ovariano (MURDOCH, 1996).

O ovário mamífero é composto por vários tipos celulares: oócitos, células da granulosa, da teca, do estroma e do epitélio da superfície ovariana. Estes tipos celulares, presentes na região cortical do ovário, posteriormente diferenciam em vários subtipos (ERICKSON & SHIMASAKI, 2003).

Sua forma varia de acordo com a espécie e o estágio do ciclo estral (PINEDA, 1989, NUNEZ, 1993; HAFEZ & HAFEZ, 2004). Em bovinos, o ovário tem forma de amêndoa e o peso em vacas adultas varia de 10 a 20 g. o comprimento varia de 3,0 a 4,5 cm, e a largura de 1,5 a 2,0 cm (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Em outros estudos observou-se peso médio dos ovários de $10,88 \pm 0,27$ (MURASAWA et al., 2005) e diâmetro ovariano entre 1,90 e 2,50 cm (RODRIGUES et al., 2013) e nos dois casos a população folicular antral ovariana foi correlacionada positivamente com o peso e o diâmetro ovariano.

2.6 Foliculogênese

O potencial reprodutivo da fêmea bovina é formado durante a vida fetal por meio do desenvolvimento de um estoque finito de oócitos num processo denominado oogênese (SENEDA et al., 2010).

A foliculogênese é um processo fisiológico que se inicia com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo maduro, também conhecido como folículo *de Graaf* ou pré-ovulatório (SAUMANDE, 1991). O termino da foliculogênese ocorre no momento da ovulação do folículo maduro, enquanto a oôgenese se encerra somente após a fecundação (FIGUEIREDO et al., 2002).

2.7 Folículos ovarianos

Os folículos são as unidades morfofuncionais do ovário, sendo que cada um é constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais). O folículo apresenta funções endócrinas (produção e liberação de hormônios esteróides e outros peptídeos) e exócrina ou gametogênica, apresentando-se como elemento essencial para a manutenção da viabilidade oocitária. Nesse contexto, observa-se que o folículo proporciona um ambiente ideal para o crescimento e a maturação do oócito imaturo e permite que o oócito maduro alcance a ovulação (FIGUEIREDO et al., 2002).

A população folicular no ovário é bastante heterogênea (SAUMANDE, 1991). De acordo com os aspectos morfológicos, os folículos podem ser divididos em: 1) folículos pré-antrais ou não cavitários, que abrangem os folículos primordiais, primários e secundários e 2) folículos antrais ou cavitários, compreendendo os folículos terciários, de De Graaf ou pré-ovulatório (Figura 3; HULSHOF et al., 1994).

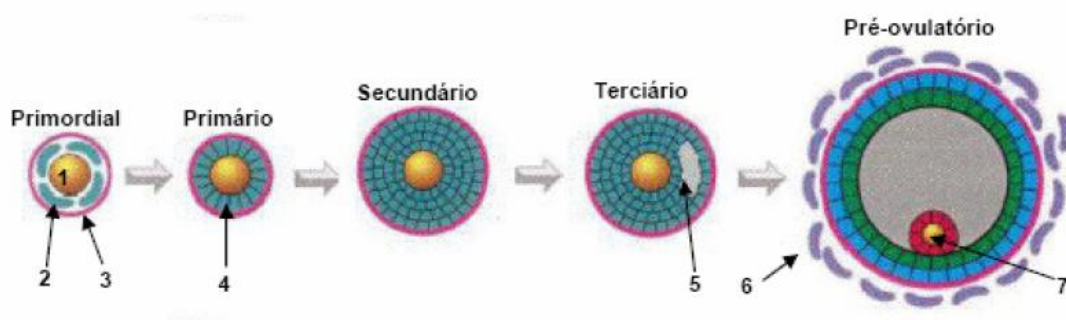


Figura 3: Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos.

1. Oócito primário; 2. Célula da pré-granulosa; 3. Membrana basal; 4. Células da Granulosa; 5. Cavidade antral; 6. Célula da teca e 7. Oócito terciário. (Adaptado de Rodgers et al., 1999).

A fêmea bovina tem em seus ovários antes do nascimento (180-240 dias gestação) uma grande quantidade de folículos primordiais, sendo em torno de 89.051 ± 40.050 em *Bos indicus* e 234.570 ± 310.058 em *Bos taurus*. Ao chegar a puberdade, é observado uma redução e diferença entre as espécies ficando entre 47.436 ± 61.888 e 83.726 ± 85.148 (*Bos indicus* e *Bos taurus* respectivamente). Ao chegar na vida adulta (72-96 meses) esse número reduz mais ainda ficando entre 24.617 ± 22.057 e 64.395 ± 69.371 respectivamente, e

destes, somente poucos chegam a ovulação (0,01%), durante o período de vida, enquanto o restante sofre atresia (SILVA-SANTOS et al., 2011).

A população de folículos ovarianos é constituída principalmente por folículos primordiais que representam a maioria (95%) da população folicular e por isso são chamados de reservatório de folículos quiescentes. O início do crescimento dos folículos primordiais, processo denominado ativação (McLAUGHLIN e McIVER, 2009), caracteriza-se pelo crescimento oocitário, pela multiplicação das células da granulosa e pela transformação da morfologia dessas células da forma pavimentosa para a forma cúbica (SKINNER, 2005). A transição do estágio primordial para primário pode ser prolongada. Os folículos de transição são aqueles com células da granulosa de morfologia pavimentosa e cúbica e são frequentemente observados (SILVA et al., 2004).

Os folículos primários contêm uma única camada de células da granulosa com morfologia cúbica circundando o oócito. Uma característica notável dos folículos primários é a presença de uma zona pelúcida, formada por glicoproteínas (ZP1, ZP2 e ZP3), que circunda o oócito (RANKIN et al., 2001). Os folículos são denominados secundários quando apresentam duas a três camadas de células da granulosa e células da teca em torno da membrana basal (BARNETT et al., 2006). Neste estágio, as células da granulosa apresentam uma extensiva rede de junções do tipo *gap*, que são canais membranários que permitem a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, segundo mensageiros e pequenos metabólitos entre as células (KIDDER & MHAWI, 2002).

A fase antral da foliculogênese é caracterizada pela presença de folículos terciários ou antrais, morfologicamente formados por um oócito circundado por uma zona pelúcida, um antro, várias camadas de células da granulosa, duas camadas de células da teca, a interna e a externa, e uma membrana basal (SILVA et al., 2002). O fluido folicular presente no interior do antro é constituído por água, eletrólitos, proteínas séricas e altas concentrações de estradiol e inibina, ambos produzidos pelas células da granulosa (MARTINS et al., 2008).

Os folículos pré-ovulatórios, ou também denominados de folículos *De Graaf*, representam o estágio terminal do desenvolvimento folicular. Neles predominam mitocôndrias arredondadas que caracterizam o completo

crescimento do oócito em bovinos. Também são observados retículo endoplasmático liso e rugoso. Podem ser identificados ainda grânulos da cortical e microtúbulos no ooplasma do oócito. O espaço perivitelino é formado neste estágio de desenvolvimento e há um aumento no número de vesículas e de complexo de Golgi. É também no final deste estágio que a função do nucléolo é inativada, como indica a marginalização dos centro fibrilares, sinalizando uma presumível retração dos genes de rRNA do nucléolo. Concomitantemente, a atividade transcricional do oócito é diminuída. Foi demonstrado entretanto, que a transcrição do mRNA não é completamente inativada com o crescimento total do oócito (HYTTEL et al., 1997).

2.8 População folicular

O número de folículos em fase antral, num determinado momento do ciclo estral, depende da taxa de mobilização da reserva de folículos primordiais e, posteriormente, do suporte proporcionado por fatores de crescimento e gonadotrofinas hipofisárias (CROWE, 1999).

O desenvolvimento folicular segue um padrão de ondas de crescimento descoberto com o advento da ultrassonografia (GINTHER et al., 1989a). Em várias espécies domésticas, os folículos antrais são recrutados e crescem simultaneamente em uma onda folicular sobre o controle de gonadotrofinas (FORTUNE, 1994). As ondas de desenvolvimento folicular não são eventos exclusivos de fêmeas que alcançaram a maturidade sexual, estando presentes também antes da puberdade (EVANS et al., 1994) e durante a gestação (GINTHER et al., 1989a). A maioria dos ciclos estrais são constituídos por duas a três ondas foliculares, podendo variar de acordo com a raça e estado fisiológico (GINTHER et al., 1989b).

Existe grande variabilidade individual quanto ao número de folículos e oócitos pré-antrais nos ovários de fêmeas bovinas, e isto está fortemente relacionado à raça e/ou subespécie, principalmente quando se compara *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* (SILVA-SANTOS et al., 2013).

Durante muitos anos, acreditou-se que a emergência era marcada pelo crescimento de um número constante entre 23 a 25 folículos antrais (GINTHER et al., 1996). No entanto, verificou-se que os zebuínos e particularmente a raça

Nelore apresenta uma superioridade numérica em relação aos taurinos, recrutando cerca de 30 a 50 folículos por onda (LOUREIRO et al., 2012).

Estudos têm demonstrado que o número de folículos antrais presente no momento da emergência é uma característica que apresenta alta variabilidade individual (IRELAND et al., 2007). Diversos grupos de pesquisa têm enumerado e catalogado a quantidade de folículos antrais em diferentes dias do ciclo estral em novilhas, vacas paridas e solteiras de leite e de corte, estabelecendo que o número de folículos em cada onda folicular é altamente variável entre animais e apresenta uma grande repetibilidade individual (EVANS et al., 2010).

Ireland et al. (2008) e Santos et al. (2012) confirmaram a existência de uma grande associação entre a população folicular antral ovariana - PFAO e o número de folículos e oócitos saudáveis, sendo demonstrado que fêmeas portadoras de alta população folicular oferecem grande possibilidade de sucesso ao se empregar algumas biotecnologias da reprodução assistida como a produção in vitro de embriões e a superovulação.

A PFAO tem sido correlacionada positivamente com as concentrações de insulina circulante, fator de crescimento semelhante à insulina – IGF-I e do hormônio anti-mulleriano – AMH (BATISTA et al., 2014; ALVAREZ et al., 2000).

2.9 Oôgenese

A oogênese em ruminantes consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até o estágio de oócito haplóide fecundado (RÜSSE, 1983).

Os mecanismos que acontecem durante a oogênese são coordenados por uma série de fatores autócrinos, parácrinos e endócrinos, que desempenham importantes papéis também na foliculogênese, entretanto, estes fatores e suas respectivas ações ainda são pouco esclarecidos (BINELLI et al., 2009). A oogênese e a foliculogênese são processos distintos, porém interdependentes (SILVA et al., 2002).

A oogênese inicia-se antes do nascimento na maioria dos mamíferos, mas somente alguns oócitos conseguem completar este mecanismo, ou seja, depois que nascem e iniciam sua atividade, após a fecundação (MARTINS et al., 2008). Em bovinos, este evento é iniciado entre os 30 a 40 dias de vida uterina por meio da migração das CGP do saco vitelino para região das

gônadas primitivas, ao chegarem nesta região, essas células sofrem mudanças morfológicas e proliferam-se por divisões mitóticas formando as oogônias (SILVA et al., 2002). Nesta fase, células somáticas do mesonefron circundam as oogônias, formando os cordões corticais, precursores dos folículos primordiais (Figura 1). As oogônias sofrem sucessivas mitoses e diferenciam-se em oócitos, que iniciam o processo de divisão meiótica, o qual é interrompido em prófase da meiose I no estágio de diplóteno (SOTO-SUAZO & ZORN, 2005; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

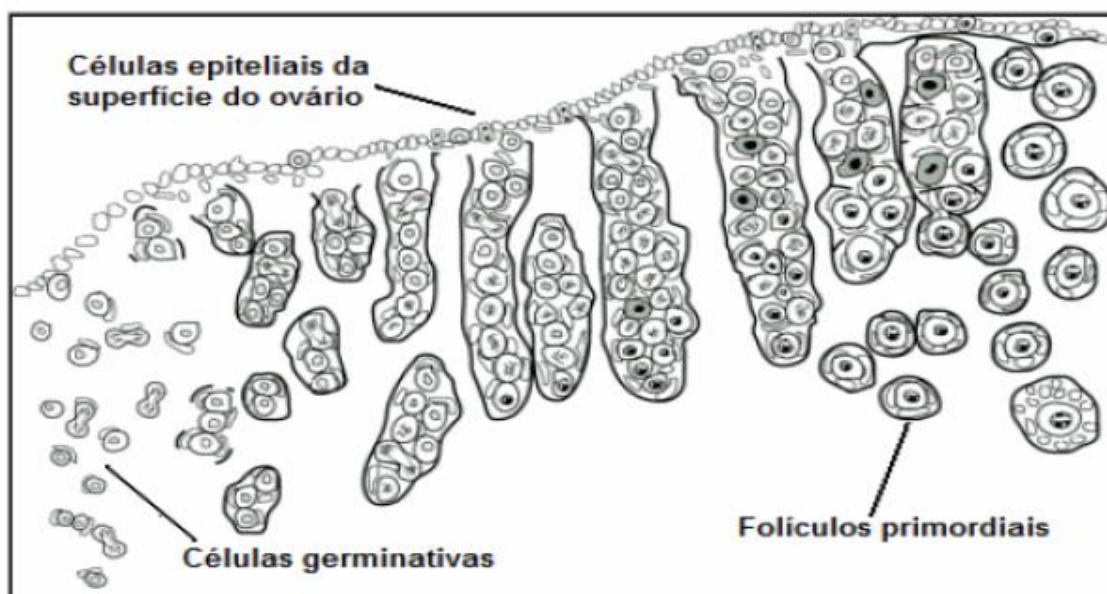


Figura 4: Esquema ilustrando a origem das células da pré-granulosa durante a formação dos folículos primordiais. (Adaptado de Juengel et al., 2002).

Na espécie bovina a maioria das mitoses cessam entre 150 e 180 dias de vida, quando todos os gametas atingem a meiose tornando-se oócitos primários. Nas fêmeas bovinas, o oócito primário ou imaturo permanece no estágio de prófase I até imediatamente antes da ovulação (DINIZ et al., 2005). O processo de maturação meiótica (retomada da meiose e alcance do estágio de metáfase da segunda divisão meiótica), *in vivo*, pode ocorrer apenas no oócito do folículo pre-ovulatório dominante e resulta, dentre outros fatores, da estimulação específica pelo pico pré-ovulatório de LH e FSH (ERICKSON, 1986).

No estágio de metáfase II, ocorre uma segunda interrupção da meiose (BETTERIDGE et al., 1989). O oócito permanece em metáfase II até que ocorra a ovulação e em seguida é transportado para o oviduto, onde poderá ser

fecundado. Somente quando ocorre a penetração do espermatozoide na membrana do oócito, a meiose é retomada e a segunda divisão meiótica é finalizada após a liberação do segundo corpúsculo polar (estimulada por oscilações de cálcio no interior do gameta feminino). Em seguida inicia-se o desenvolvimento embrionário (Figura 2; ARROYO, 2008).

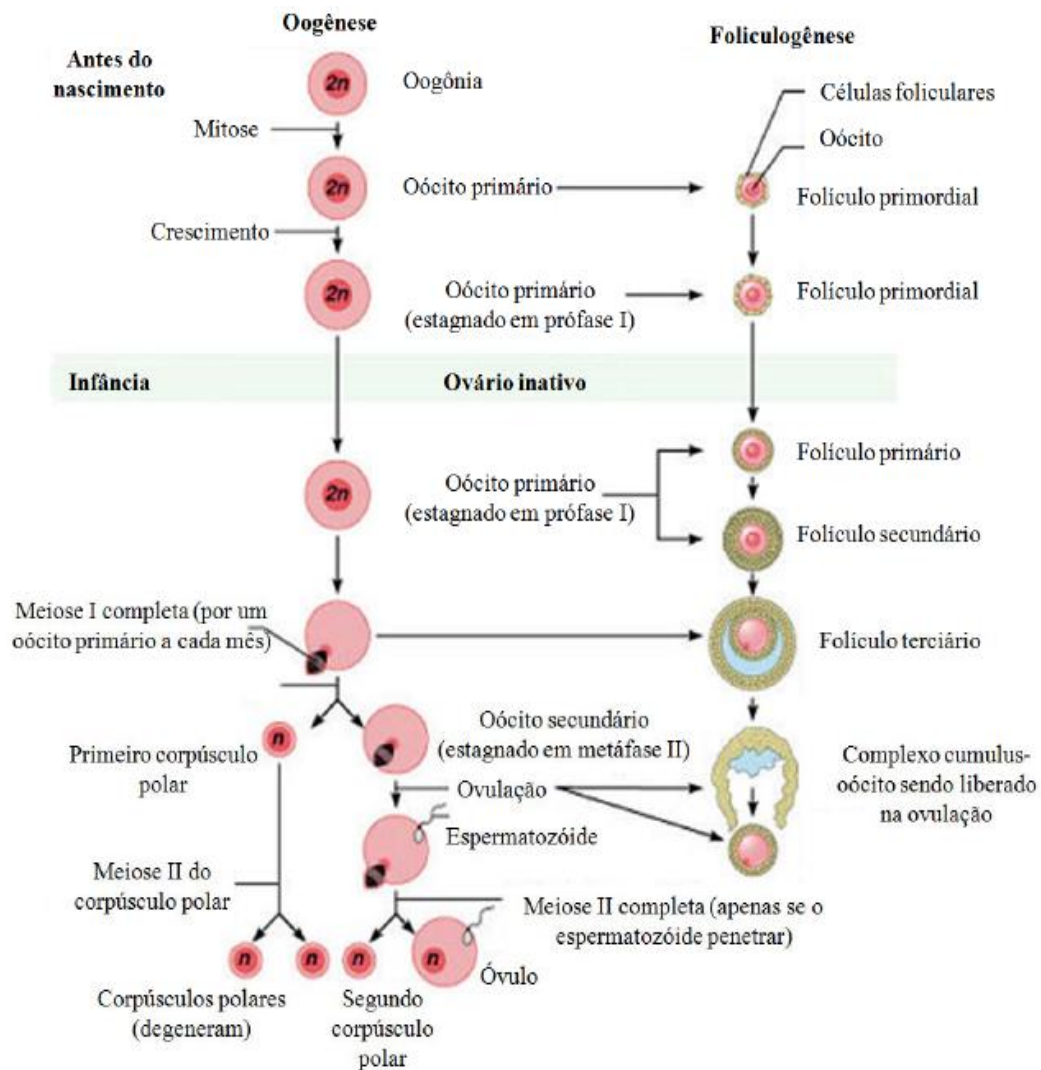


Figura 5: Esquema representando os processos de oogenese e foliculogênese relacionados. (Adaptado de Lemes, 2013).

2.10 Importância da maquinaria do oócito na embriogênese

O oócito é a maior célula de um organismo, sendo aproximadamente dez vezes maior que uma célula somática nos mamíferos. Durante o desenvolvimento folicular, crescimento e maturação, os oócitos acumulam citoplasma volumoso contendo as biomoléculas que permitem o seu

desenvolvimento, a maturação e também as primeiras clivagens embrionárias (MEIRELLES et al., 2003).

A capacidade para fecundação e desenvolvimento do oócito, é alcançada após longo período de crescimento. Este processo envolve tanto a síntese de componentes citoplasmáticos como o rearranjo e a redução no número de cromossomos. Estes dois eventos são interligados, e sua cronologia é determinante para assegurar que o oócito atinja a maturação nuclear e a citoplasmática simultaneamente. O desenvolvimento embrionário é diretamente comprometido se a maturação do oócito não for completa (HUNTER, 2000).

A nutrição dos oócitos é feita por células somáticas intimamente associadas nos folículos ovarianos, que regulam o crescimento do oócito, provendo os nutrientes que a célula germinativa não consegue por falta de sistemas de transporte e que controlam a maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos quando esses são selecionados para a ovulação (EPPIG, 1996).

A comunicação entre as células do cumulus e o oócito é estabelecida pela sinalização parácrina e pelas extremidades dos processos celulares das células do cumulus, que penetram no córtex e fazem junções intracelulares do tipo *gap* com o oolema. Através dessas conexões, ocorre a transferência de moléculas de pequeno peso molecular, tais como: metabolitos, íons aminoácidos e nucleotídeos, assim como pequenas moléculas reguladoras, como o cAMP (adenosina monofosfato cíclico) e as purinas (SUTTON et al., 2003).

Quanto aos padrões morfológicos dos oócitos, é observado grandes variações entre as espécies. Oócitos de camundongos e ruminantes apresentam ooplasma claro e quase ausente de granulações, enquanto em equinos, suínos e caninos, observa-se ooplasma escuro e com granulações. Essas podem se apresentar de forma heterogênea, devido à quantidade e à distribuição dos lipídios citoplasmáticos (CARNEIRO, 2002).

Através da aparência do complexo cumulus-oócito (CCOs), pode-se estimar potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário do oócito. A classificação dos oócitos pode ser realizada em uma escala de 1 a 4, sendo: qualidade 1 - cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom;

qualidade 2 -cumulus compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares. Ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida; qualidade 3 - cumulus presente, mas expandido. Ooplasma contraído com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino; qualidade 4 - oócito sem cumulus, também conhecido como oócito desnudo (GONÇALVES et al., 2008).

Em bovinos, a expansão e o enegrecimento do cumulus são características utilizadas para se verificar a maturação oocitária e estão diretamente relacionados com boa qualidade embrionária (WURTH & KRIUP, 1992). Já foi relatado que oócitos bovinos que exibiram citoplasma mais heterogêneo apresentam maior capacidade de fecundação normal e com redução da polispermia, pois exibem melhor distribuição dos grânulos corticais após a MIV (NAGANO et al., 1999).

A competência oocitária consiste na capacidade do oócito de ser fecundado e de manter o desenvolvimento embrionário até a ativação do genoma embrionário. O potencial de desenvolvimento embrionário está associado a características de competência oocitária como o diâmetro e a idade do folículo de origem, a morfologia do COC, a cinética nas primeiras clivagens e o estado de poliadenilação (BREVINI et al., 2002; HYTTEL et al., 2001; MOUROT et al., 2006)

Para o processo de maturação é de fundamental importância ter um estoque de transcritos e proteínas no citoplasma do oócito, especialmente, para assegurar o desenvolvimento embrionário inicial até o estágio de oito células (bovinos), quando o genoma embrionário é ativado necessitando da síntese de novas proteínas. Essa fase é denominada transição materno-zigótica (MZT, do inglês, maternal zygotic transition) e a expressão de certos genes durante esse período determinará o sucesso da embriogênese no estágio de pré-implantação (MEIRELLES et al., 2004).

2.11 Membrana plasmática

As membranas são constituídas principalmente de lipídios e proteínas. Enquanto que a principal função dos lipídios nas biomembranas é de natureza estrutural, permitindo a formação de uma bicamada estável, as proteínas são os componentes mais ativos bioquimicamente, conferindo as propriedades funcionais características de cada tipo de membrana, contribuindo assim para a vasta diversidade (GENNIS, 1989).

Segundo o Modelo de Mosaico Fluido sugerido por Singer & Nicholson (1972), os lipídios formam uma bicamada, tendo cada monocamada a espessura de uma única molécula de lipídio, e onde os lipídios se encontram empacotados de modo a manter as cabeças polares voltadas para a fase aquosa (meio extracelular) e as caudas apolares voltadas para o interior da bicamada, orientadas perpendicularmente em relação ao plano da biomembrana (Figura 4).

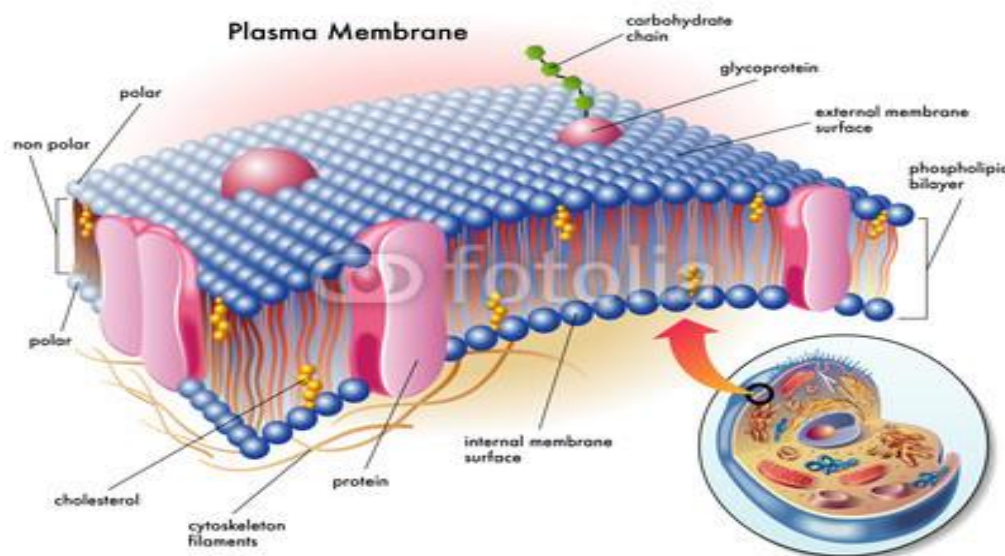


Figura 6: Composição da membrana plasmática. Fonte: <http://www.clickescolar.com.br/a-membrana-celular.htm>

A composição das membranas biológicas é bastante variável, possuindo diversas atividades e propriedades comuns a todas elas, no entanto, todas elas desempenham funções essenciais na célula como delimitar toda a célula, e agir como uma barreira de permeabilidade, fazendo a função de homeostasia celular. Além disso, as membranas realizam atividades específicas dentro e ao redor das células através da sua associação com proteínas específicas. Elas também recebem sinais externos, principalmente de

outras células. Na maioria dos casos, são sinais extracelulares na forma de pequenas moléculas ou proteínas que são detectadas por receptores presentes na membrana (GENNIS, 1989).

As proteínas possuem estruturas e funções diversas de acordo com o tipo de célula e local em que se encontra. As proteínas podem ser classificadas como integrais, ou seja, que atravessam a bicamada lipídica e podem constituir cerca de 70% da massa total de proteínas em certas membranas; e periféricas, ou seja, localizam-se à superfície das membranas, por vezes associadas a proteínas integrais (CANTOR & SCHIMMEL, 1980).

As moléculas lipídicas presentes na membrana plasmática são de caráter anfifílico, ou seja, possuem uma parte da molécula hidrofílica polar e outra parte hidrofóbica, apolar. Os lipídios mais abundantes são os fosfolipídios, que possuem uma cabeça polar e duas caudas de hidrocarbonetos apolares, sendo que uma cauda tipicamente possui uma ou mais ligações insaturadas (duplas) do tipo *cis*, enquanto que a outra não possui esse tipo de ligação, sendo saturada. Cada ligação *cis* cria uma pequena torção na cauda (Figura 5), gerando diferenças no comprimento e na saturação das cadeias lipídicas, influenciando no modo de como as moléculas fosfolipídicas se acoplam umas com as outras, contribuindo para a fluidez da membrana (PRALLE et al., 2000).

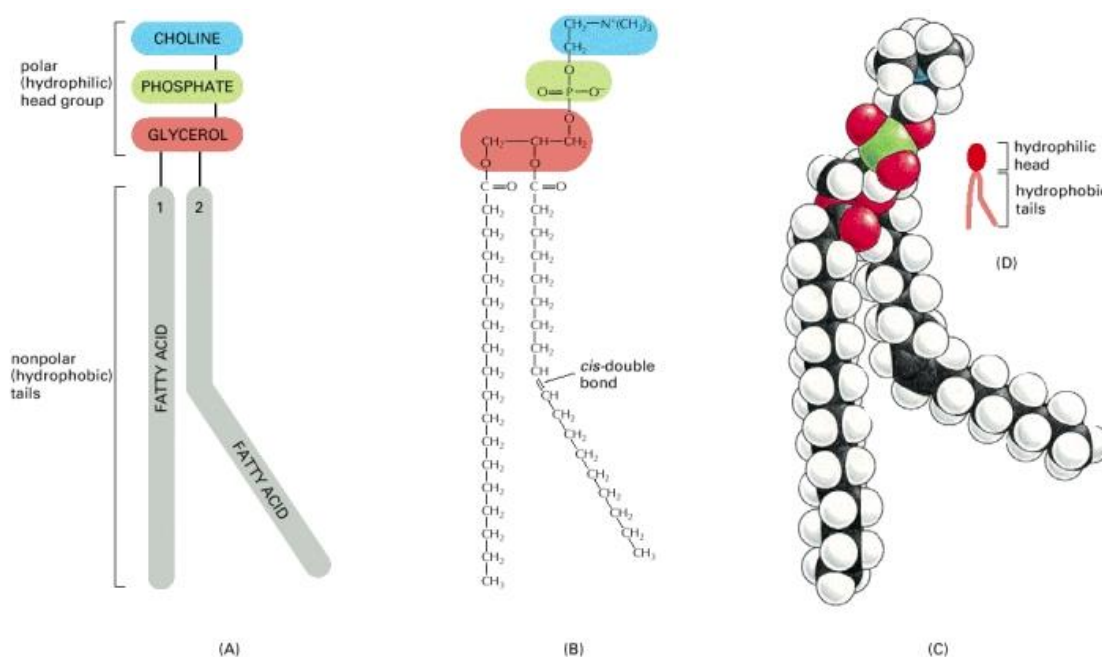


Figura 7: Partes de uma molécula de um fosfolípido (fostatidilcolina)

(A) cabeça polar (hidrofílica) composta por uma colina, grupo fosfato e glicerol; parte apolar composta por duas caudas (hidrofóbicas) de ácidos graxos; (B) representação por fórmula química, indicando a dupla ligação; (C) por modelo de estrutura tridimensional; e (D) representação simbólica do grupo polar hidrofílica e pernas hidrofóbicas (Adaptado de Alberts, 2002).

Na camada externa da bicamada lipídica, pode-se encontrar principalmente fosfolípidios como a fosfatidilcolina e a esfingomielina, enquanto na camada interna, encontram-se glicolipídios, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina (BRATTON et al., 1997). Já as proteínas, são embebidas na bicamada com orientações específicas cruciais para a sua função. A assimetria dos lipídios é estabelecida durante a sua produção, para que a membrana cresça por igual, sendo para isso, uma proporção dos lipídios recém-sintetizados, transferida para a monocamada oposta. Essa transferência é catalisada por enzimas chamadas flipases, que transferem seletivamente moléculas de fosfolípidios para sua respectiva monocamada, fazendo com que cada uma tenha sua concentração específica de fosfolípidios (CANTOR & SCHIMMEL, 1980).

2.12 Efeitos da suplementação lipídica sobre a reprodução e na qualidade oocitária

Uma melhora aparente na fertilidade tem sido associada a suplementação lipídica (ADAMIAK et al., 2006). Atualmente, tem-se destacado

a importância da inclusão de duas famílias de ácidos graxos essenciais na alimentação: Ômega 3 (n-3) e Ômega 6 (n-6), também conhecido por ácido linolênico e linoléico, respectivamente. Esses ácidos são denominados essenciais, pois devem ser fornecidos a partir da alimentação, já que o organismo não é capaz de produzi-los (WATHES et al., 2007).

A suplementação de PUFA's na dieta de bovinos têm influência no crescimento folicular e na ovulação, incluindo efeitos sobre liberação de GnRH, na síntese e liberação de FSH, LH e GH, além de promoverem também alterações no metabolismo dos esteróides (ABAYASEKARA e WATHES, 1999; WEBB et al., 2004).

Aumento da concentração de progesterona (LOPES et al., 2009), melhora da qualidade embrionária (CERRI et al., 2004) e supressão de sinais luteolíticos nas proximidades do reconhecimento materno da gestação (MATTOS et al., 2000), foi observado quando se suplementou os animais com PUFA's.

Aumento no número de folículos de tamanho médio e aumento do tamanho do folículo dominante foi observado quando se adicionou gordura na dieta (De FRIES et al., 1998), o que torna favorável à realização da OPU-PIVE. Por outro lado, pode-se verificar que a alteração na dinâmica folicular com a utilização na dieta de ácidos graxos poli-insaturados é acompanhada de mudanças nas concentrações sanguíneas de insulina, colesterol, GH e nas concentrações intrafoliculares de IGF-I e HDL-colesterol (THOMAS e WILLIAMS, 1996).

Quando se fornece dieta com PUFA's aos ruminantes, ocorre uma alteração na população de microbiota ruminal, afetando a produção e a proporção de AGVs no rúmen, dessa forma favorecendo uma maior produção de ácido propiônico (NUSSIO et al., 2006). Depois de absorvido pela parede ruminal, este ácido é conduzido ao fígado e por meio da gliconeogênese é metabolizado até se transformar em glicose, que gera um aumento no nível de glicose circulante (LEURY et al., 1990) e, por consequência, no nível de insulina sanguínea (GUTIÉRREZ et al., 1997) e IGF-1 (NOGUEIRA, 2008).

A glicose também tem efeito positivo sobre a secreção do LH, pois aumenta sua frequência e dessa forma o crescimento e maturação dos folículos (MATTOS et al., 2000; FUNSTON, 2004).

Em outros estudos, adicionaram ácido linoléico ou linolênico na dieta e não observaram alteração no tamanho do folículo dominante (AMBROSE et al., 2006), nem no diâmetro e nem na taxa de crescimento do folículo pré-ovulatório (CHILDS et al., 2008; CERRI et al., 2009).

A mudança no conteúdo de AG contidos na dieta pode alterar sua distribuição pelos tecidos reprodutivos (BILBY et al., 2006). A finalidade dos PUFA's adicionados na dieta sobre a reprodução pode ser parcialmente decorrente por mudanças alterações na composição de AG no fluido folicular, ambiente que os CCOs estão inseridos, durante seu desenvolvimento e maturação (CHILDS et al., 2008; FOULADI-NASHTA et al., 2009).

Foram encontradas diferenças significativas no perfil de ácidos graxos no plasma e no leite quando se forneceu saís de cálcio de óleo de palma (rico em C16:0 e C18:1) ou soja tostada (rica em C18:2) ou semente de linhaça extrusada (rica em C18:3) por período de 25 dias para vacas da raça Holandesa em lactação. No entanto, nas células da granulosa e a qualidade dos oócitos observaram diferenças nas proporções de ácidos graxos saturados e insaturados. Os autores concluíram que a suplementação por poucos dias (25 dias) não foi capaz de modificar o perfil lipídico das células da granulosa e a qualidade dos oócitos, necessitando de um período maior de alimentação para que tal evento ocorresse (FOULADI-NASHTA et al., 2009).

Maior período de suplementação foi testado por Ponter et al., (2012), fornecendo linhaça ou grãos de soja para novilhas não-lactantes da raça Holandesa por seis semanas e não observaram diferença no número e qualidade dos oócitos. Da mesma forma Nogueira et al., (2008), suplementaram com 4% de óleo de soja ou Megalac na dieta de novilhas Nelore por 35 dias e não encontraram diferenças significativas em relação ao número e à qualidade dos oócitos aspirados.

Os oócitos utilizam-se dos ácidos graxos como fonte de energia durante a maturação e ao longo do período de desenvolvimento embrionário, porém, alterações na composição de ácidos graxos nos oócitos podem melhorar tais eventos (KIM et al., 2001).

Os oócitos de fêmeas bovinas possuem grandes quantidade de lipídios, aproximadamente 20 vezes maior que a quantidade encontrada em oócitos de ratas e, sua distribuição encontra-se da seguinte maneira:

aproximadamente 50% de triglicerídios, 20% de fosfolipídios, 20% de colesterol e 10% de ácidos graxos livres. Dentre a fração fosfolipídica, os ácidos graxos saturados (C16:0 = 25% e C18:0 = 16%) estão em maior quantidade do que os PUFA (C18:2; 5-8% e C20:4; 1-3%) (McEVOY et al., 2000).

O perfil lipídico dos oócitos de bovinos já é bem estabelecido, porém, pouco se sabe sobre como os folículos e os oócitos absorvem esses AG. Outro desafio, é saber como nutrição com esses AGs modificam esses compartimentos reprodutivos e como alteram o desenvolvimento após a fertilização (ADAMIAK et al., 2006).

Alguns estudos apontam para que a qualidade do oócito esteja relacionada à composição de ácidos graxos, especialmente da fração fosfolipídica (McEVOY et al., 2000). Os fosfolipídios são os principais componentes das membranas celulares, sendo que estas recebem influência do número, posição da dupla ligação e do comprimento da cadeia dos ácidos graxos interferindo diretamente nas suas propriedades (STUBBS & SMITH, 1984), contribuindo para a fluidez da mesma e melhorando o processo de criopreservação.

Existem diferenças na composição de AGs entre oócitos de grau 1 e os de grau 2 ou 3, havendo maior concentração de C18:1, C18:2 e C20:4 nos oócitos grau 1 do que nos graus 2 e 3 (KIM et al., 2001). Os autores sugeriram que a aparência do citoplasma dos oócitos pode refletir o conteúdo de AGs, porém não há interferência na maturação dos mesmos, mas pode não ser benéfica nas taxas de fertilização e produção de embrião.

Vale lembrar que o ambiente também possui efeito na qualidade oocitária e quando submetidos a altas temperaturas, há evidências de mudanças na composição dos ácidos graxos. Zeron et al., (2001) verificaram a composição de AGs nos oócitos, células da granulosa e fluido folicular de vacas e novilhas Holandesas aspiradas no verão e inverno e observaram maior porcentagem de AG saturados nos oócitos (C16:0), células da granulosa (C16:0 e C18:0) e fluido folicular (C16:0 e C18:0) durante o verão, e no inverno foram encontradas maiores porcentagens de PUFA (C18:2 e C22:6) nos oócitos e células da granulosa. Em seguida, observaram que a taxa de clivagem e a produção de embrião no inverno foi significativamente maior do que no verão, sugerindo uma mudança no perfil lipídico dos oócitos

acarretando em modificações morfológicas nos mesmos. Os autores relataram que o efeito da temperatura ambiente sobre a embriogênese, pode ser devido as mudanças das propriedades físico-químicas das membranas. Pois como já visto em outros trabalho, a composição dos lipídios das membranas sofrem influência da temperatura (QUINN, 1985).

Outro aspecto a ser considerado é o aumento na insaturação dos ácidos graxos nas membranas. A maior insaturação está associado à maior fluidez e, muitas vezes, isso está intimamente correlacionada à diminuição de temperatura (CROWE et al., 1989).

2.13 Matrix-assisted laser desorption and ionization - time of flight/ espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS) em análises de lipídios e fosfolipídios

Estudos anteriores relatavam a dessorção e ionização de laser assistida por matriz – tempo de voo/espectrometria de massa (MALDI-TOF/MS) parecia ser quase um sinônimo para analises de proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos (SCHILLER et al., 2007). No entanto, há evidências crescentes de que esta técnica é também uma ferramenta útil na análise de lipídios e lipidomas por causa de seu desempenho rápido e simples, permitindo gravar espectros de massa celular, tecidos e fluidos corporais em alguns minutos (PETKOVIC et al., 2001).

Resumidamente, a técnica da MALDI-TOF consiste na deposição de uma determinada amostra em uma matriz capaz de fornecer prótons (ou H⁺) para o processo de ionização dos componentes da amostra. Quando esta matriz absorve a energia emitida por um laser, ocorre a transferência de prótons da matriz para os componentes da amostra e ao mesmo tempo desencadeia-se um processo de dessorção, o que possibilita a passagem da amostra do estado sólido para o gasoso. Dessorção é um fenômeno pelo qual uma substância é liberada através de uma superfície. O processo é o oposto de sorção (isto é, adsorção e absorção ocorrendo simultaneamente). Como tal, é o efeito de gases ou líquidos a serem incorporados num material de um estado diferente e aderente à superfície de outra molécula. A absorção é a incorporação de uma substância em um estado, para outro de estado diferente (por exemplo, líquidos a serem absorvidos por um sólido, ou gases a serem

absorvidos por um líquido). Adsorção é a adesão física ou ligação de íons e moléculas na superfície de outra molécula. O processo inverso da sorção é a dessorção (CROXATTO, 2012)

Os componentes da amostra ionizados e dessorvidos são direcionados para o analisador TOF, onde são acelerados através de um campo elétrico dentro de um tubo a vácuo (sem qualquer gás ou molécula presente, como o espaço sideral), até que atinja o detector. Neste tubo a vácuo, os componentes da amostra são separados de acordo com suas m/z , chegando ao detector em diferentes tempos (Figura 8).

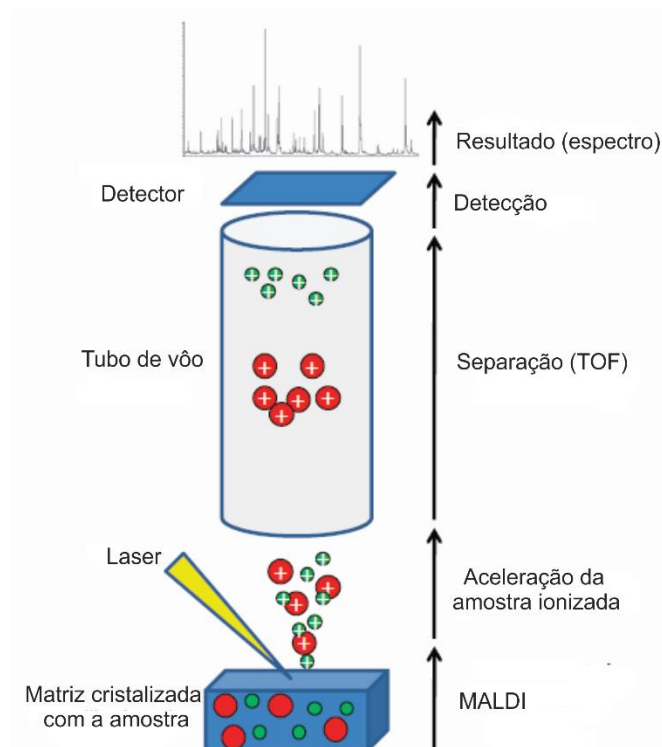


Figura 8: Descrição da técnica de MALDI-TOF. (Adaptado de Croxatto, 2012).

A amostra é misturada com uma matriz sobre uma placa de metal condutora. Depois da cristalização da matriz junto com a amostra, a placa metálica é introduzida no espectrômetro de massas, onde é bombardeada com breves pulsos de laser. As moléculas dessorvidas e ionizadas são aceleradas por meio de um campo elétrico e entram em um tubo metálico submetido a vácuo (tubo de voo, por onde as moléculas passam) até atingirem o detector. Os íons com tamanho menor (m/z) viajam mais rapidamente pelo tubo de voo do que os de tamanho maior. Como uma pessoa gorda e uma magra correndo duzentos metros, chega primeiro quem for mais leve e mais rápido. Desse modo, os analitos ou substâncias das amostras, separados por TOF formam espectros de massa (como a impressão digital dos seres humanos, cada um tem uma diferente) de acordo com sua razão m/z (massa/carga) e com picos que indicam quantidades variáveis de cada substância analisada (analito). Para a

identificação dos analitos, cada pico é comparado com um banco de dados, arquivo contendo todas as impressões digitais das moléculas.

Os métodos utilizados para análise lipídica em embriões e oócitos geralmente envolvem a extração seletiva de lípidios a partir de um *pool* de muitas amostras seguido de manipulação química, separação e caracterização de componentes individuais técnicas cromatográficas. Nesse contexto, foi relatado análise direta por MALDI-TOF de embriões individuais e intatos ou oócitos de várias espécies. As amostras biológicas eram simplesmente hidratada com a solução de matriz e os perfis lipídicos característicos (representado por fosfatidilcolinas, esfingomielinas e triacilgliceróis) foram obtidos através de MALDI-TOF (FERREIRA et al., 2012).

Oócitos das mais variadas espécies como de humano, bovino e ovino, assim como embriões bovinos foram analisadas por MALDI-TOF demonstrando ser capaz de caracterizar o perfil lipídico de gametas e embriões e também responder modificações de diferentes estágios de desenvolvimento embrionário e condições de cultivo *in vitro*. Dessa forma, a investigação no desenvolvimento das funções biológicas de lípidios estruturais e de reserva em embriões e oócitos deve, portanto, beneficiar as análises desses perfis pelo fato de ser realizado a partir de uma única estrutura (MATORRAS, et al., 1998; McEVOY et al., 2000; SILVA-SANTOS et al., 2014).

3. Referências Bibliográficas

ABAYASEKARA, D.R.; WATHES, D.C. Effects of altering dietary fatty acid composition on prostaglandin synthesis and fertility. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids**, v.61, p.275-287, 1999.

ADAMIAK, S.J.; POWELL, K.; ROOKE, J.A. et al. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v.131, p.247-258, 2006.

ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., et al. Molecular Biology of the Cell. 4^o edição. New York: Garland Science; 2002.

ALVAREZ, P., SPICER, L.J., CHASE Jr, C.C., PAYTON, M.E., HAMILTON, T.D., STEWART, R.E., HAMMOND, A.C., OLSON, T.A., WETTEMANN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal Animal Science**, v.78, p.1291–302, 2000.

AMBROSE, D.J.; KASTELIC, J.P.; CORBETT, R.; PITNEY, P.A.; PETIT, H.V.; SMALL, J.A.; ZALKOVIC, P. Lower pregnancy losses in lactating dairy cows fed

a diet enriched in linolenic acid. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.3066-3074, 2006.

ARROYO, R. J. O. **Classificação dos ovocitos imaturos de bovinos pela utilização do azul de cresil brilhante**. 2008. 31f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

BARNETT, K.R., SCHILLING, C.C.R., GREENFELD, C.R., TOMIC, D., FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Hum Reprod**, v.10, p.1-19, 2006.

BATISTA, E. O. S., MACEDO, G.G., SALA, R.V., ORTOLAN, M.D.D.V., SÁ FILHO, M.F., DEL VALLE, T.A., JESUS, E.F., LOPES, R.N.V.R., RENNÓ, F.P., BARUSELLI, P.S. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction Domestic Animals** 49, 448–452, 2014.

BERAN, F. H. B.; SILVA, L. D. F.; RIBEIRO, E. L. A.; CASTRO, V. S.; CORREA, R. A.; KAGUEYAMA, E. O.; ROCHA, M. A. Degradabilidade ruminal in situ da matéria seca, matéria orgânica e proteína bruta de alguns suplementos concentrados usados na alimentação de bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 26, n. 3, p. 405-418, 2005.

BERGMAN, E. N. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 70, n. 2, p. 567-590, 1990.

BETTERIDGE, K.J., SMITH, C., STUBBINGS, R.B., XU, K.P., KING, W.A. Potencial genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **Journal of reproduction and Fertility**, v.38, p.87-98, 1989.

BILBY, T.R.; BLOCK, J.; do AMARAL, B.C.; SA FILHO, O.; SILVESTRE, F.T.; HANSEN, P.J.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. **J. Dairy Science**, v.89, p.3891-3903, 2006.

BINELLI, M.; PORTELA, V.; MURPHY, B. Dinâmica ovariana e eficiência reprodutiva: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 134-139, 2009.

BRATTON, D.L., V.A.FADOK, D.A.RICHTER, J.M.KAILEY, L.A.GUTHRIE, P.M.HENSON. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium mediated non specific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. **J. Biol. Chem.** v.272, p.26159-26165, 1997

BREVINI, T.A.; LONERGAN, P.; CILLO, F.; FRANCISCI, C.; FAVETTA, L.A.; FAIR, T.; GANDOLFI, F. Evolution of mRNA polyadenylation between oocyte maturation and first embryonic cleavage in cattle and its relation with developmental competence. **Molecular Reproduction and Development**, v.63, n.4 p.510-7, 2002.

BYERS, F. M.; SCHELLING, G. T. Los lipidos en la nutricion de los rumiantes. In: CHURCH, C. D. **El rumiante: fisiologia y nutricion**. Zaragoza: Acibria, p.339-356, 1993.

CARNEIRO, G.F. Maturação in vitro de oócitos eqüinos. **Ciênc Tecnol Vet**, v.2, p.5-10, 2002.

- CANTOR, C.R., SCHIMMEL P.R. Biophysical Chemistry Part I: The conformation of biological molecules. W.H.Freeman and Company, New York, 1980.
- CAVALIERI, F. B.; SANTOS, G. T.; MATSUSHITA, M.; PETIT, H. V.; RIGOLON, L. P.; SILVA, D. Milk production and milk composition of dairy cows fed Lac100® or whole flaxseed. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 85, p. 413-6, 2005.
- CERRI, R.L.A.; BRUNO, R.G.S.; CHEBEL, R.C. et al. Effect of fat sources differing in fatty acid profile on fertilization rate and embryo quality in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 87, p. 297, 2004.
- CHILDS, S.; CARTER, S.; LYNCH, C.O.; SREENAN, J.M.; LONERGAN, P.; HENNESSY, A.A.; KENNY, D.A. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). **Theriogenology**, v.70, p.992–1003, 2008.
- CHURCH, D. C. **El Rumiante. Fisiología digestiva y nutrición**. Zaragoza: Editora Acribia, 1993. 641 p.
- COPPOCK, C.E., WILKS, D.L. Supplemental Fat in High-Energy Rations for Lactating Cows: Effects on Intake, Digestion, Milk Yield, and Composition. **Journal of Animal Science**, v. 69, p.3826-3837, 1991.
- CROXATTO, A., G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **Microbiol Rev**, v.36(2), p. 380-407, 2005.
- CROWE, J.H.; HOEKSTRA, F.A.; CROWE, L.M. et al. Lipid phase transitions measured in intact cells with Fourier transform infrared spectroscopy. **Cryobiology**, v.27, p.76-84, 1989.
- CROWE, M.A. Gonadotrophic control of terminal follicular growth in cattle. **Reproduction Domestic Animals**, v.34, n.3, p.157-166, 1999.
- CZERKAWSKI, J. W. Microbial fermentation in the rumen. **Proceedings Nutrition Society**, v.43, p.101-180, 1984.
- DE FRIES, C.A.; NEUENDORFF, D.A.; RANDEL, R.D. Fat supplementation influences postpartum reproductive performance in Brahman cows. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.864-870, 1998.
- DINIZ, E. G.; ESPER, C. R.; JACOMINI, J. O.; VIEIRA, R. C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p. 70-76, 2005.
- DOREAU, M. & CHILLIARD, Y. Digestion and metabolismo of dietary fat in farm animals. **British Journal of Nutrition**, v.78, p.15-35, 1997.
- DOREAU, M.; AUROUSSEAU, E.; MARTIN, C. Effects of linseed lipids fed as rolled seeds, extruded seeds or oil on organic matter and crude protein digestion in cows. **Animal Feed Science Technology** v.150: 187-196. 2009.
- EPPIG, J.J. Coordination of nuclear and cytoplasmatic maturation in eutherian mammals. **Reprod Fertil Dev**, v.8, n.4, p.485-9, 1996.
- ERICKSON, G.F. Na analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproduction Endocrinology**, v.4, p.233-254, 1986.

ERICKSON, G.F., SHIMASAKI, S. The spatiotemporal expression. Pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.5, p.1-9, 2003.

EVANS, A. C.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **J Reprod Fertil**, v. 102, n. 2, p. 463-70, 1994.

EVANS, A. C.; MOSSA, F.; FAIR, T.; LONERGAN, P.; BUTLER, S. T.; ZIELAKSTECWKO, A. E.; SMITH, G. W.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J. K.; IRELAND, J. L.; IRELAND, J. J. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v. 67, p. 421- 9, 2010.

FERREIRA, C.R., PIRRO, V., EBERLIN, L.S., HALLETT, J.E., COOKS, R.G. Developmental phases of individual mouse preimplantation embryos characterized by lipid signatures using desorption electrospray ionization mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem** v.404, p. 2915–2926, 2012.

FERREIRA CR, SARAIVA SA, CATHARINO RR, GARCIA JS, GOZZO FC, SANVIDO GB, et al. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. **Journal of lipid research**, v.51, p.1218-27, 2010.

FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R., AMORIN, C.A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais – Moifopa. In: GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V..J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1.ed. São Paulo: Varela, 2002. P.340.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 225-232, 1994.

FOULADI-NASHTA, A.A.; WONNACOTT, K.E.; GUTIERREZ, C.G.; GONG, J.G.; SINCLAIR, K.D.; GARNSWORTHY, P.C.; WEBB, R. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. **Reproduction**, v.138, p.771–781, 2009.

FRANCO, G.L.; DAVY, F.C.A. Interação entre nutrição e reprodução em vacas de corte. In: OLIVEIRA, R.L.; BARBOSA, M.A.A. **Bovinocultura de corte: desafios e tecnologias**. Salvador: EDUFBA, 2007. Cap.2, p.82-112.FUNSTON, R. N. Fat supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science**, v.82, p.154-161, 2004.

GARCIA-BAJALIL, C.M., STAPLES, C.R., THATCHER, W.W. Protein Intake and Development of Ovarian Follicles and Embryos of Superovulated Nonlactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**. v.77, n° 9, p. 2537-2548, 1994.

GENNIS,R.B. Biomembranes: Molecular Structure and Function. Springer-Verlag, New York, 1989.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal during associations oestrous cycles among ovarian events in cattle with two and three follicular waves. **Journal Reproduction Fertility**, v.87, p.223-230, 1989a.

_____. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **J Reprod Fertil**, v. 87, n. 1, p. 223-30, Sep 1989b.

- GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol Reprod**, v. 55, n. 6, p. 1187-94, 1996.
- GOES, R. H. T. B.; SOUZA, K. A.; PATUSSI, R. A.; CORNELIO, T. C.; OLIVEIRA, E. R.; BRABES, K. C. S. Degradabilidade in situ dos grãos de crambe, girassol e soja, e de seus coprodutos em ovinos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 32, n. 3, p. 271-277, 2010.
- GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M.M.; VISITIN, J.A.; COSTA, L.F.S. Produção in vitro de embriões. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.261-291.
- GUTIÉRREZ, C. G.; OLDHAM, J.; BRAMLEY, T. A. et al. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1876-1884, 1997.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Manole, 2004. 513 p.
- HARFOOT, C.G.; HAZLEWOOD, G.P. Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson P N et Stewart CS (eds). The rumen microbial ecosystem. **Blackie Academic**, p.382-426, 1997.
- HAVERTINE, K. J.; ALLEN, M. S. Effects of fatty acid supplements on milk yield and energy balance of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.89, p.1081-1091, 2006.
- HUNTER, M.G. Oocyte maturation and ovum quality in pigs. **Rev Reprod**, v.5, p.122-130, 2000.
- HYTTEL, P., FAIR, T., CALLESEN, H., GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.
- HYTTEL, P.; VIUFF, D.; FAIR, T.; LAURINCIK, J.; THOMSEN, P.D.; CALLESEN, H.; VOS, P.L.A.M.; HENDRIKSEN, P.J.M; DIELEMAN, S.J.; KARL SCHELLANDER, K.; BESENFELDER, U.; GREVE, T. Ribosomal RNA gene expression. And chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, v.122, p.21-30, 2001.
- HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F., BEVERS, M.M., VAN DEN KURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16(2), p.78-80, 1994.
- IRELAND, J. J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L.; SMITH, G. W.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Hum Reprod**, v. 22, n. 6, p. 1687-95, 2007.
- IRELAND, J. L.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMMEN, A. P.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C.; IRELAND, J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biol Reprod**, v. 79, n. 6, p. 1219-25, 2008.

- JENKINS, T.C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.3851-3863, 1993.
- JOHNSON A.L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.185-201, 2003.
- KEMP, P.; LANDER, D. J. Hydrogenation in vitro of α -linolenic acid to stearic acid by mixed cultures of pure strains of rumen bacteria. **Journal of General Microbiol**, v.130, p.527-533, 1984.
- KENNELLY, J.J. Producing milk with 2.5% fat – the biology and health implications for dairy cows. **Anim. Food Sci. Technol**, v.60, p.161-180, 1996.
- KENNELLY, J. J.; KHORASANI, R. G. Influence of flaxseed feeding on the fatty acid composition of cow's milk. **Proceedings of the 54th Flax Inst. Conf. J. F. Carter**, ed. North Dakota State University, Fargo, ND. p.99-105, 1992.
- KIDDER, G.M., MHAWI, A.A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**, v.123, p.613, 2002.
- KIM, J. Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. **Reproduction**, v.122, p.131–138, 2001.
- KOZLOSKI, G. V. **Bioquímica dos ruminantes**. 3. ed. Santa Maria: UFSM, p. 113-183; 187-212, 2011.
- LAMB, C. Entendendo os efeitos da nutrição na reprodução de vacas de corte. **Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos**, 7, 2003, Uberlândia. Anais... Uberlândia: UNESP, p. 139-151, 2003.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995, 839p.
- LEURY, B. J.; MURRAY, P. J.; ROWE, J. B. Effect of nutrition on the response in ovulation rate in merino ewes following short-term supplementation and insulin administration. **Australian Journal Agriculture Research**, v. 4, p. 751-759, 1990.
- LOPES, C.N.; SCARPA, A.B.; CAPPELLOZZA, B.I. et al. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of Bos indicus beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.87, p.3935-3943, 2009.
- LOUREIRO, B.; ERENO, R. L.; FAVORETO, M. G.; PUPULIM, A. G.; FONTES, P. K.; TICIANELLI, J. S.; PINTO, R. F. P.; CASTILHO, A. C. S.; BARROS, C. M. Expression of androgen producing enzymes in low and high follicle count Nellore cows. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 458, 2012.
- MATORRAS, R., J. I. RUIZ, R. MENDOZA, N. RUIZ, P. SANJURJO, AND F. J. RODRIGUEZ-ESCUADERO. Fatty acid composition of fertilization failed human oocytes. **Hum. Reprod.** v.13, p.2227 – 2230, 1998.
- MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 36-49, 2008.
- MATTOS, R., STAPLES, C.R., THACTHER, W.W. Effects of dietary on reproduction in ruminants. **Rev. reprod.**, v. 5, p. 38-45, 2000.
- McEVOY, T.G.; ASHWORTH, C.J.; ROOKE J.A.; SINCLAIR, K.D. Consequences of manipulating gametes and embryos of ruminant species. **Reproduction**, v.61, p.167-182, 2003.

McLAUGHLIN, E.A.; McIVER, S.C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. **Reproduction**, v.137, p.1-11, 2009.

MEIRELLES, F.V.; MERIGHE, G.K.; SCHWARZ, K.L.; GARCIA, S.M.; EMANUELLI, I.P.; FIGUEIREDO, P.R.; PUELKER, R.Z.; CARAMBULA, S.F.; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F. Cytoplasm genetics and epigenetics during embryo development. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31 (Suplemento), p.57-63, 2003.

MEIRELLES, F.V.; CAETANO, A.R.; WATANABE, Y.F.; RIPAMONTE, P.; CARAMBULA, S.F.; MERIGHE, G.K.; GARCIA, S.M. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.13-20, 2004.

MOLLE, G.; BRANCA, A.; LIGIOS, S. et al. Effect of grazing background and flushing supplementation on reproductive performance in Sarda ewes. **Small Ruminant Research**, v.17, p.245-254, 1995.

MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M.A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, v.73, p.1367-79, 2006.

MORRIS, D.H.; VAISEY-GENSER, M. Flaxseed. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, v.10, n.2, p.2525-2531, 2003.

MADHUSUDHAN, B. Potential benefits of flaxseed in health and disease - a perspective. **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v.74, n.2, p.67-72, 2009.

MILINSKI, M. C. **Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal**. 2007. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Pós-Graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

MÜLLER, M.; PRADO, I. N.; NASCIMENTO, W. G.; SCOMPARIN, V. X.; CAVALIERI, F. L. B.; MARQUES, J. A. Fontes de gordura ômega-3 e ômega-6 sobre o consumo voluntário de novilhas de corte confinadas. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 221-228, 2008.

MURASAWA, M.; TAKAHASHI, T.; NISHIMOTO, H.; YAMAMOTO, S.; HAMANO, S.; TETSUKA, M. Relationship between ovarian weight and follicular population in heifers. **J Reprod Dev**, v. 51, n. 5, p. 689-93, 2005.

MURDOCH, W. J. Ovarian surface epithelium ovulation and carcinogenesis. **Biology Reviews of the Cambridge Philosophical Society**. V. 71, p.529-543, 1996.

NAGANO, M.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S. In vitro fertilization and cortical granule distribution of bovine oocytes having heterogeneous ooplasm with dark clusters, **J Vet Med Sci**, v.61, p.531-535, 1999.

NEPA; UNICAMP. Tabela brasileira de composição de alimentos. TACO. 2ed. Campinas: NEPA-UNICAMP, 2011. Disponível em: <<http://www.unicamp.br/nepa/taco/>> Acesso em: 10 de novembro de 2015.

NOGUEIRA, E. **Efeitos da suplementação energética e lipídica no perfil metabólico, desenvolvimento folicular e produção in vitro de embriões em novilhas da raça Nelore (Bos indicus taurus)**. 2008. 87f. Tese (Doutorado) –

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

NOLAN, R.; DUFFY, P.; WADE, M.. Effect of quantity and type of diet and frequency of trans-vaginal ovum aspiration on in-vitro embryo development in heifers. **Theriogenology**. v.49, p. 402, 1998.

NUNEZ, Q.M. Morfologia del tracto genital de los pequenos ruminantes. **Revista Científica**, v.3, p.77-86, 1993.

NUSSIO, L. G.; CAMPOS, F. P.; LIMA, M. L. M. Metabolismo de carboidratos estruturais. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V. V.; OLIVEIRA, S. G. (Ed.) **Nutrição de ruminantes**. 1. ed. Jaboticabal: FUNEP, p. 183-223, 2006.

OBA, M.; THANGAVELU, G.; DEGHAN, B. M.; AMBROSE, D. J. Unprocessed whole flaxseed is as effective as dry-rolled at increasing (-linolenic acid concentration in milk of dairy cows. **Livestock Science** v.122: 73-76. 2009.

OLIVEIRA, S.G.; SIMAS, J.M.C.; SANTOS, F.A.P. Main aspects related to changes in the profile of fatty acids in ruminant milk fat. **Archives of Veterinary Science**, .9, n.1, p.73-80, 2004.

OOMAH, B.D.; KENASCHUK, E.O.; MAZZA, G. Tocopherols in fl axseed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**,v.45, n.6, p.2076-2080 1997.

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

PALMQUIST, D.L.; MATTOS, W.R.S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (2Eds.) **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, p.299-322, 2011.

PEREIRA, R.M.; MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell tissue Banking**, v.9, p.267-277, 2007.

PENNINGTON, J. A.; DAVIS, C. L. Effects of intraruminal and intra-abomasal additions of cod-liver oil in milk fat production in the cow. **Journal of Dairy Science**, v.58, p.49-55, 1975.

PETIT, H. V. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. **Journal Dairy Science**. v.85: 1482-1490. 2002.

PETIT, H. V. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed formaldehyde treated flaxseed or sunflower seed. **Journal Dairy Science**. v.86: 2637-2646. 2003.

PETKOVIC, M., J. SCHILLER, M. MULLER, S. BENARD, S. REICHL, K. ARNOLD, AND J. ARNHOLD. 2001 . Detection of individual phospholipids in lipid mixtures by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry: phosphatidylcholine prevents the detection of further species. **Anal. Biochem**. v.289, p.202 – 216, 2001.

PINEDA, M;H; Female reproductive system. In: MCDONALD, L.E. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. Lea & Febiger, Philadelphia. p. 303-354. 1989.

PONTER, A. A.; GUYADER-JOLYC, C.; NUTTINCK, F.; GRIMARD, B.; BHUMBLOT, P. Oocyte and embryo production and quality after OPU-IVF in

dairy heifers given diets varying in their n-6/n-3 fatty acid ratio. **Theriogenology**, v. 78, p. 632-645, 2012.

PRALLE, A., KELLER, P., FLORIN, E., SIMONS, K., HORBER, J.K.H. Sphingolipid-Cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells, **The journal of cell biology**, v.148, p.997-1007, 2000.

QUINN, P.J. A lipid-phase separation model of low temperature damage to biological membranes. **Cryobiology**, v.22, p.128-146, 1985.

RANKIN, T.L., O'BRIEN, M., LEE, E., WIGGLESWORTH, K., EPPIG, J., DEAN, J. Defective zona pellucida in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. **Development**, v.128, p.1119-1126, 2001.

RODRIGUES, A. S. **Contagem de folículos antrais em fêmeas nelore submetidas a um protocolo de IATF**. 78f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

ROSA, B. L. **Óleo de linhaça na dieta de fêmeas e machos castrados Nelore x Canchim, terminados em confinamento**. 72 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2014.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v.24, p.77-92, 1983.

SANTOS, G. M. G. S.; SANTOS, K. C. S.; SILOTO, L. S.; MOROTTI, F.; MARCANTONIO, T. N.; THASMO, R. L. O.; JÚNIOR KOETZ, C.; LIMA, D. C. M.; SENEDA, M. M. Comparison o embryo production after OPU/IVP and MOET/ET among bovine females with high and low antral follicular counts: preliminary results. **Animal Reproduction**. v. 9, p. 590, 2012.

SANTOS, V. C.; EZEQUIEL, J. M. B.; OLIVEIRA, P. S. N.; GALATI, R. L.; BARBOSA, J. C. Consumo e digestibilidade em ovinos alimentados com grãos subprodutos da canola. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, n. 1, p. 96-105, 2009.

SAUMANDE, J. La Folliculogénese Chez les Ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.167, p.205-218, 1991.

SCHILLER, J. R. SUß, J. ARNHOLD, B. FUCHS, J. LEßIG, M. MUßLLER, M. PETKOVIC, H. SPALTEHOLZ, O. ZSCHOßRNIG, K. ARNOLD. Matrix-assisted laser desorption and ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry in lipid and phospholipid research. **Progress in Lipid Research**, v.43, p. 449–488, 2004.

SEIDEL G. E., Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. **Theriogenology**. v.65, p.228-35, 2006.

SENEDA, M. M.; SILOTO, L. S.; MOROTTI, F.; SCHNEIDER, C. L. Fisiologia do crescimento folicular em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 4., 2010, Londrina. **Anais...** Londrina: Biotecnologia da Reprodução em Bovinos, v. 1. p. 14-22. 2010

SHAW, D.W.; FARIN, P.W.; WASHBURN, Effect of Retinol palmitate rate and embryo quality in superovulated cattle. **Theriogenology**. v.44, p.51-58, 1995

SILVA, J. R. V.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; FIGUEIREDO, J. R. Características Morfológicas E Controle Do Crescimento Folicular Durante A Folliculogênese Em Ruminantes Domésticos. **Ciência Animal**, v. 12, p. 105-117, 2002.

SILVA, D. C.; SANTOS, G. T. D.; BRANCO, A. F.; DAMASCENO, J. C.; KAZAMA, R.; MATSUSHITA, M. HORST, J. A.; DOS SANTOS, W. B. R.; PETIT, H. V. Milk production and composition, intake, digestion, blood composition, and fatty acid profile of milk of dairy cows fed whole or ground flaxseed with or without monensin. **Journal Dairy Science**. v.90: 2928-2936. 2007.

SILVA, J.R.V., VAN DEN HURK, R., MATOS, M.H.T., SANTOS, R.R., PESSOA, C., MORAES, M.O., FIGUEIREDO, J.R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v.61, p.1691-1704, 2004.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M., SILOTO, L.S., HERTEL, M.F., ANDRADE, E.R., RUBIN, M.I., STURION, L., MELO-STERZA, F.A., SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v.76(6), p. 1051-7, 2011.

SILVA-SANTOS, K. C.; MARINHO, L. S. R.; SANTOS, G. M. G.; MACHADO, F. Z.; GONZALEZ, S. M.; LISBOA, L. A.; SENEDA, M. M. Ovarian follicle reserve: emerging concepts and applications. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 180-86, 2013.

SILVA-SANTOS, K. C.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; EBERLIN, M. N.; SILOTO, L. S.; ROSA, C. O.; MARCANTONIO, T. N.; SENEDA, M. M. MALDI-MS Lipid profile of oocytes recovered by ovum pick up from *Bos indicus* and $\frac{1}{2}$ *indicus* x *taurus* with high vs low oocyte yields. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 49, p.711-718, 2014.

SINGER, S.J., NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, 175, 720-731, 1972.

SKINNER, M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Hum Reprod Update**, v.11, p.461-471, 2005.

SOTO-SUAZO, M., ZORN, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**, v.3, p. 147-160, 2005.

STAPLES, C.R.; BURKE, J.M.; THATCHER, W.W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.856-871, 1998.

STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochim. Biophys. Acta**, v.779, p.89-137, 1984.

SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction Update**, v.9, n.1, p.35-48, 2003.

TARPILA, S.; ARO, A.; SALMINEN, I.; TARPILA, A.; KLEEMOLA, P.; AKKILA, J.; ADLERCREUTZ, H. The effect of flaxseed supplementation in processed foods on serum fatty acids and enterolactone. **European Journal of Clinical Nutrition**, v.56, n.2, p.157-165, 2002.

TATA, A.; SUDANO, M. J.; SANTOS, V. G.; LANDIM-ALVARENGA, F. D.; FERREIRA, C. R.; EBERLIN, M. N. Optimal single-embryo mass spectrometry fingerprinting. **J Mass Spectrom** v.48, p. 844-9, 2013.

THOMAS, M.G.; WILLIAMS, G.L. Metabolic hormone secretion and FSH induced superovulatory responses of beef heifers fed dietary fat supplements containing predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. **Theriogenology**, v.45, p.451-458, 1996.

TRUCOM, C. **A importância da linhaça na saúde**. São Paulo: Alaúde, 2006. 151 p.

VAN DEN HURK, R., ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p. 1717-1751, 2005.

VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press. p. 325-336, 1994.

WATHES, D.C.; ROBERT, D.; ABAYASEKARA, E.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biol. Reprod.**, v.77, p.190-201, 2007.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; GONG, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. **J. Anim. Sci.** v.82, p.63-74, 2004.

WRIGHT, T., B. MCBRIDE, AND B. HOLUB. 1998. Docosahexaenoic acid enriched milk. **World Rev. Nutr. Diet.** 83:160–165.

WURTH, Y.A., KRIUP, T.H.A.M. Bovine embryo production in vitro after selection of the follicles and oocytes. In: International Congress on Animal Reproduction, 1992, The Hague. **Proceedings...** The Hague: ICAR, v.1, p.387-389, 1992.

ZERON Y, TOMCZAK M, CROWE J, ARAV A. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**. v.45, p.143-52, 2002.

CAPÍTULO 2 – Artigo científico (Pesquisa Agropecuária Brasileira)

Desempenho e características digestivas em bovinos leiteiros mantidos em regime de pastoreio suplementados com linhaça

Christopher Junior Tavares Cardoso⁽¹⁾; Fabiana de Andrade Melo-Sterza⁽²⁾, Marcus Vinicius Morais de Oliveira⁽²⁾ e Ériklis Nogueira⁽³⁾

⁽¹⁾Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Av. Senador Felinto Muller 2443, 79070-900 Campo Grande - MS – Brasil. E-mail: christopherjtc@hotmail.com. ⁽²⁾Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Rodovia Aquidauana-UEMS, km 12, 79200-000, Aquidauana, MS, Brasil. E-mail: fabiana.sterza@uems.br, marcusvmo@uems.br, ⁽³⁾Embrapa – Pantanal, Rua 21 de Setembro, 1880 - Bairro Nossa Senhora de Fátima, Caixa Postal 109 - Corumbá, MS-Brasil - 79320-900

Resumo - A linhaça destaca-se pela composição de ácidos graxos ricos em ácidos insaturados e por apresentar lenta liberação do óleo no rúmen. O presente estudo teve como objetivo avaliar o consumo, a degradabilidade ruminal e a digestibilidade em bovinos leiteiros mantidos em regime de pastoreio e suplementados com linhaça em grão. Foram utilizadas 12 fêmeas da raça Girolando, mantidas em sistema de pastoreio rotacionado de capim-mombaça (*Panicum Maximum*) e divididas em 2 grupos experimentais. O grupo CONTR (n=6) recebeu apenas a dieta base (pastagem) e o grupo LINH (n=6) recebeu suplementação com 800 g/animal/dia de linhaça. A degradabilidade ruminal foi avaliada utilizando-se 2 machos fistulados no rúmen e submetidos a mesma dieta. A produção de matéria seca não apresentou diferenças durante o período experimental. As vacas suplementadas com linhaça consumiram mais proteína bruta e extrato etéreo e tiveram menor consumo de fibra em detergente neutro, porém não foi suficiente para alterar o ganho de peso e os coeficientes de digestibilidade, exceto do extrato etéreo. Em nível ruminal a linhaça apresentou baixa

degradabilidade efetiva e potencial, tendo efeito negativo sobre a degradabilidade do capim.

Termos para indexação: gordura protegida, linolênico, *linum usitatissimum*

INTRODUÇÃO

O interesse da utilização de lipídios na alimentação de ruminantes cresceu nas últimas décadas, pois dietas com maior densidade energética para bovinos podem aumentar a eficiência alimentar, pela redução da ingestão de alimentos associada ou não a maiores ganhos de peso e melhora na qualidade do leite (GONZALEZ et al., 2015).

Tem-se enfatizado a importância da inclusão de duas famílias de ácidos graxos essenciais na alimentação, o Ômega 3 (n-3) e o Ômega 6 (n-6), também conhecidos como ácidos linolênico e linoléico, respectivamente. Os mesmos são denominados essenciais, pois devem ser obtidos a partir da alimentação, já que o organismo é incapaz de produzi-los em velocidade suficiente para atender a demanda (WATHES et al., 2007).

A suplementação com gordura em dietas de bovinos afeta negativamente a digestão de fibras, em razão da ação dos ácidos graxos de cadeia longa sobre os microrganismos ruminais (OLIVEIRA et al., 2012). Uma das maneiras de se evitar o efeito negativo da gordura sobre a fermentação ruminal é fornece-la na forma protegida artificialmente ou em sementes de oleaginosas *in natura* (SILVA et al., 2007). Sementes integrais, pouco afetam o consumo e a digestibilidade, devido à baixa degradabilidade e a lenta liberação do óleo no ambiente ruminal (ROSA et al., 2013). Nesse sentido, a linhaça em grãos desperta interesse, por ser um alimento rico em ácidos graxos poli-insaturados, em especial o ácido linolênico (BENCHAAAR et al., 2012), e pela menor bio-hidrogenação ruminal desses ácidos graxos (CAVALIERI et al., 2005).

O conhecimento da degradação ruminal de grãos de oleaginosas, seja na forma inteira ou moída, ainda é restrito. A técnica de análise da degradabilidade *in situ*, avalia os parâmetros cinéticos dos alimentos por meio do desaparecimento da massa de amostra incubada, sendo um método preciso, simples e rápido para determinar o valor nutritivo de um alimento (ORSKOV et al., 1980). Embora o alimento não esteja sujeito a todos os eventos digestivos, como mastigação, ruminação e passagem, não há melhor forma de simulação do ambiente ruminal para um dado regime de alimentação do que a técnica *in situ*, isto porque esta técnica permite o contato íntimo do alimento com o ambiente ruminal (VAN SOEST, 1994).

Por outro lado, o estudo da digestibilidade é importante para quantificar o aproveitamento dos alimentos pelo animal. As fontes lipídicas apresentam resultados diversos sobre seus efeitos na digestibilidade dos nutrientes. Não foi observado efeito na digestibilidade da matéria seca e da fibra da dieta quando foi fornecido caroço de algodão (JORGE et al., 2008). Mas quando se utilizou lipídeos na forma de grãos e óleo de soja, foi observado que o óleo de soja influenciou negativamente na digestibilidade da fibra (OLIVEIRA et al., 2012). Portanto, além do nível de extrato etéreo, a fonte pode influenciar a digestibilidade e o desempenho animal.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o consumo, a degradabilidade ruminal e a digestibilidade em bovinos leiteiros mantidos em regime de pastoreio e suplementados com linhaça em grão.

MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio foi realizado no Setor de Bovinocultura Leiteira da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS, Unidade de Aquidauana, MS, Brasil), entre os meses de dezembro/2014 a junho de 2015. Todas as manipulações envolvendo os animais foram realizadas de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação

Animal, aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEMS (Protocolo nº 012/2014). As análises da composição químico-bromatológica das amostras de pastagem, linhaça e fezes foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da UEMS.

Para a avaliação do desempenho, ou seja, consumo, ganho de peso e digestibilidade, utilizou-se 12 vacas Girolando ($\frac{3}{4}$ Holandes x $\frac{1}{4}$ Gir) não gestantes, não lactantes, com idade média de $5,2 \pm 1,9$ anos e peso corporal médio de $583,9 \pm 67,6$ kg. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos experimentais homogêneos, sendo o Grupo Controle (CONTR, n = 6), não suplementado e o outro o Grupo Linhaça (LINH, n = 6), suplementado com linhaça marrom.

Os animais foram mantidos em sistema de pastoreio rotacionado com capim-mombaça (*Panicum Maximum*) recebendo água e suplementação mineral à vontade. Todos os animais eram manejados conjuntamente. Para eliminar o efeito ambiental do manejo, diariamente todos os animais eram conduzidos ao curral e apenas os animais do grupo LINH recebiam a dieta experimental. O fornecimento da linhaça era feito individualmente, com o intuito de que os animais consumissem a quantia desejada sem haver competição.

Inicialmente foi realizado um período de adaptação de quinze dias para estabilização do consumo desejado. Após esse período os animais receberam 800 gramas de linhaça por 126 dias. A degradabilidade ruminal foi determinada utilizando-se machos bovinos castrados da raça Jersey, fistulados no rúmen e submetidos ao mesmo manejo alimentar.

Em relação à pastagem, infere-se que a mesma era formada por seis piquetes com tamanho de 1,2 hectares cada e foram pastoreados durante 6 dias consecutivos, permanecendo durante os próximos 30 dias em descanso. Foram utilizados animais

reguladores para controlar a disponibilidade de biomassa e manter a qualidade nutricional da forrageira, de modo que a gramínea fosse consumida de forma semelhante em todos os piquetes.

Na entrada e saída dos animais de cada piquete, foram realizadas coletas do capim, sendo lançado aleatoriamente um quadrado de 4m² e efetuadas a separação e pesagem das frações de folha, colmo e material senescente. Esse material foi guardado em freezer e, posteriormente determinado os teores de matéria seca e assim, quantificado o rendimento forrageiro do período experimental, tanto da disponibilidade inicial de capim, quanto do resíduo após o pastoreio.

O consumo de forragem pelos animais foi determinado indiretamente através da Fibra em Detergente Ácido Insolúvel (FDAi) como marcador interno segundo o método descrito por Craig et al. (1984).

Para a determinação da digestibilidade, amostras de capim foram coletadas em períodos distintos ao longo do experimento pela técnica de pastejo simulado, , sempre na entrada e saída dos animais de cada piquete. A coleta foi realizada, por um período de 40 minutos, sempre com início antes do arraçoamento, sendo os animais acompanhados a uma distância inferior a 2 metros, para observar o hábito de pastejo e a preferência dos componentes estruturais das forrageiras. Assim, de maneira sincronizada com as vacas, foi efetuada a colheita manual da forragem. Em seguida o material foi homogeneizado e uma sub-amostra de aproximadamente 500 gramas foi armazenada para posterior avaliação bromatológica.

As amostras das fezes foram coletadas diretamente da ampola retal das vacas, em períodos distintos ao longo do experimento. Foram realizadas 4 coletas de cada animal. As amostras foram armazenadas em freezer e posteriormente efetuada análise dos seus componentes químicos.

No último dia do arração a produção fecal dos animais foi determinada realizando-se a coleta total de fezes por um período de 24 horas. O capim foi disponibilizado no cocho *ad libitum* e a linhaça fornecida para os animais do grupo LINH.

Ao término do experimento, as amostras de capim, linhaça e fezes foram descongeladas, secas em estufa de ventilação forçada à 65°C por 72 horas e, posteriormente, trituradas a 2 mm em moinho tipo Willey, colocadas em potes plásticos, identificadas e armazenadas para posteriores determinações dos teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), extrato etéreo (EE) e matéria mineral (MM), fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) segundo metodologia proposta pela AOAC (1990). A hemicelulose (HEM) foi determinada pela diferença entre a FDN e FDA do material analisado. Os valores referentes a carboidratos totais (CHOT) foram obtidos por intermédio da equação: $100 - (PB\% + EE\% + MM\%)$; e os carboidratos não-fibrosos (CNF) pela diferença entre CHOT e %FDN.

A verificação da degradabilidade ruminal do capim potencialmente ingerido (amostras coletadas no pastejo simulado das vacas Girolando) e dos grãos de linhaça marrom foram efetuadas por meio da técnica *In Situ*, utilizando-se dois machos adultos da raça Jersey, castrados, pesando em média 650 kg e dotados de cânula permanente no rúmen.

Os bois foram mantidos durante todo o período experimental com as vacas Girolando, e assim, utilizados também como animais reguladores da pastagem. Assim, sequencialmente ao ensaio de desempenho, determinou-se a degradabilidade ruminal incubando-se as amostras do capim potencialmente ingerido pelas vacas Girolando, em sacos confeccionados de TNT, medindo 14 x 7 cm, com poros de 50 micrômetros, contendo aproximadamente 5 g de amostras previamente secas e moídas.

Posteriormente os saquinhos foram colocados em sacolas de filó, medindo, 15 x 30 cm, com um pequeno peso de chumbo de 100 g, amarrado a uma linha de náilon de aproximadamente 0,5 m de comprimento livre.

As sacolas foram introduzidas diretamente no rúmen, em ordem decrescente de 96, 72, 48, 24, 12, 8, 6, 4 e 2h. No tempo de 0h, os saquinhos contendo os alimentos foram pré-incubados em recipiente com água. Os sacos de TNT foram retirados todos ao mesmo tempo e lavados em água corrente. Os resíduos remanescentes das incubações foram secos em estufa de ventilação forçada a 65°C, por 48h e armazenados para serem analisados, a fim de se determinar os teores de MS, PB, FDN, FDA e EE.

Posteriormente, os bois foram suplementados diariamente com 800 gramas de grãos de linhaça marrom. Após cinco dias de adaptação ruminal, efetuou-se uma nova incubação de amostras dos alimentos potencialmente ingeridos pelas vacas Girolando (capim e linhaça), de modo a se observar o possível efeito da suplementação sobre a degradabilidade do capim.

Os dados sobre desaparecimento da MS, PB, FDN, FDA e EE foram calculados baseando-se na diferença entre o peso incubado e os resíduos após a incubação. Para a estimativa dos parâmetros avaliados foi utilizado o modelo assintótico de primeira ordem proposto por Orskov e McDonald (1979): $DP = a + b(1 - e^{-ct})$; em que DP é a degradabilidade ruminal potencial dos alimentos; “a” é a fração solúvel; “b”, a fração potencialmente degradável da fração insolúvel que seria degradada a uma taxa “c”; “c”, que seria a taxa de degradação da fração “b”; e “t” o tempo de incubação em horas.

A fração considerada não-degradável (I) foi calculada por meio da seguinte equação: $I = (100 - (a+b))$; Para se estimar a degradabilidade efetiva (DE), utilizou-se o modelo matemático: $DE = a + [(b * c)/(c + K)]$; em que K é a taxa de passagem de

sólidos pelo rúmen, definida como sendo de 2, 5 e 8,0%/hora, que pode ser atribuído ao nível de consumo alimentar baixo, médio e alto.

Foram realizadas seis coletas de sangue em todos os animais, para quantificação de glicose, albumina e colesterol ao longo do período de suplementação. As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa caudal e depositadas em tubos de ensaio. Após a coleta, o sangue era centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos para separação do soro e em seguida essa fração foi congelada a -20°C até posterior análise.

No soro sanguíneo foram quantificadas o colesterol total (método enzimático colorimétrico), albumina (método enzimático colorimétrico-verde de bromocresol) e glicose (método enzimático-hexoquinase com kits comerciais, através de procedimentos de espectrofotometria automatizado COBAS® (Roche-Hitachi)). As análises dos metabólitos sanguíneos foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

O perfil lipídico da linhaça foi obtido segundo metodologia de Nunes et al., (2015) por cromatografia gasosa (Agilent 6890N, California) para obter picos individuais de ésteres metílicos dos ácidos graxos e foi realizado no laboratório de nutrição da Universidade Católica Dom Bosco.

Foram realizadas pesagens das vacas Girolando a cada 21 dias para acompanhamento do ganho médio diário, totalizando 6 mensurações ao longo do experimento. As pesagens eram realizadas sempre pela manhã, antes do fornecimento da linhaça.

As condições ambientais foram monitoradas durante todo o período experimental, através de leituras feitas na estação meteorológica da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - Unidade de Aquidauana.

Na Figura 1 estão demonstrados a temperatura e umidade relativa do ar médios observados durante o período experimental. A temperatura média foi de 26°C e umidade relativa do ar de 79,93%, não sendo observada mudanças substanciais.

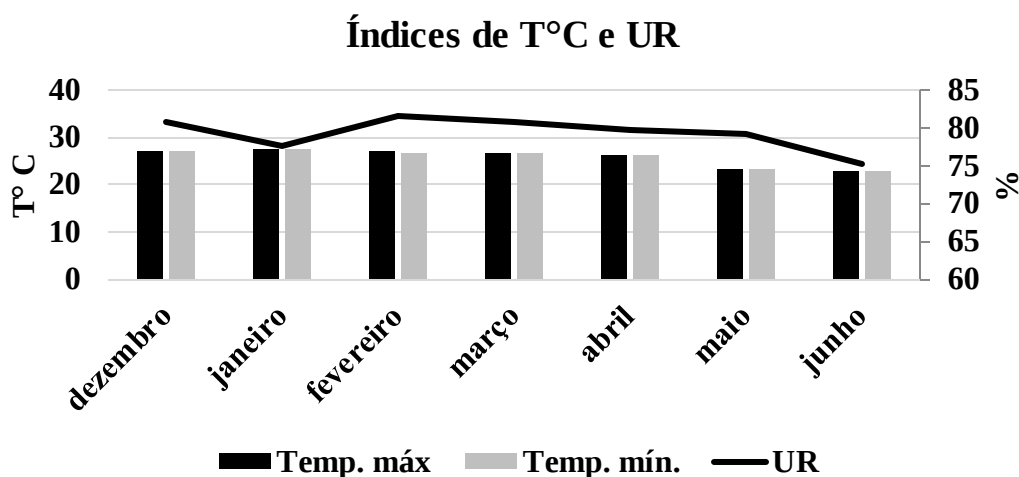


Figura 1: Índices de temperatura e umidade relativa do ar durante o período experimental

O delineamento foi inteiramente casualizado com dois tratamentos. Para cada variável estudada, foi verificada a normalidade da distribuição das variâncias pelo teste de Shapiro-Wilk, considerando-se probabilidade de 0,05 como significativa, e os dados transformados, caso houvesse indicação. As análises estatísticas para as variáveis: consumo, digestibilidade e ganho de peso foram analisados com auxílio do software R, sendo efetuada uma ANOVA e admitida uma diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre as médias.

RESULTADOS

Neste ensaio, a produção média de biomassa forrageira foi de 1.856,1 kg de matéria seca por hectare, ou 7.138,8 kg de matéria verde, com as folhas, colmo e material senescente representando o equivalente a 45,7, 44,0 e 10,3%, respectivamente. Não foram verificadas diferenças do rendimento forrageiro ao longo do período experimental.

As composições químicas da linhaça e do pasto potencialmente ingerido pelos animais estão apresentadas na Tabela 1, sendo notificada uma boa qualidade nutricional do capim-mombaça, com média de 7,5% de proteína bruta. Já a linhaça apresentou alta quantidade de proteína e de extrato etéreo, o que lhe confere a característica de alimento proteico-energético.

Tabela 1- Composição química, expressa na matéria seca, do capim potencialmente ingerido e dos grãos de linhaça marrom.

Variáveis *	Capim-mombaça	Linhaça
Matéria Seca - MS (%)	29,69	92,99
Proteína Bruta - PB (%)	7,47	22,00
Extrato Etéreo - EE (%)	1,52	27,32
Fibra em Detergente Neutro - FDN (%)	66,25	40,09
Fibra em Detergente Ácido - FDA (%)	31,62	20,59
Carboidratos Totais - CT (%)	81,36	43,66
Carboidratos Não Fibrosos - CNF (%)	15,11	3,57
Matéria Mineral - MM (%)	9,66	7,03

* Média das amostras coletadas durante o experimento.

A linhaça apresentou em média 27,3% de extrato etéreo e a composição em ácidos graxos foi consistente com dados da AOCS (FIRESTONE, 2006). O óleo de linhaça é composto por 51% de ácidos graxos Omega-3, 15,6% de Omega-6 e 16% de ácidos graxos monoinsaturados e somente 10% de ácidos graxos saturados. A predominância de Omega-3 é três vezes superior ao Omega-6, fazendo com que seja a maior fonte vegetal deste ácido linolênico (RAMCHARITAR et al, 2006).

Tabela 2: Composição dos ácidos graxos presentes nas sementes de linhaça.

Ácidos Graxos	Média±DP
C12:0 - Ácido láurico	0,12 ± 0,01
C14:0 - Ácido mirístico	0,24 ± 0,01
C16:0 - Ácido palmítico	6,20 ± 0,12
C16:1 - Ácido palmitoleico	0,11
C18:0 - Ácido esteárico	3,21 ± 0,03
C18:1 (trans) - Ácido eláidico	0,25 ± 0,02
C18:1 - Ácido oleico	16,32 ± 0,05
C18:2 - Ácido linoleico	15,68 ± 0,01
C18:3n3 - Ácido linolênico (ômega 3)	51,89 ± 0,14

C20:0 - Ácido araquídico	0,10
C20:1 - Ácido cis-11-eicosênico	0,16 ± 0,04
C22:0 - Ácido behênico	0,13 ± 0,01
Ácidos graxos poli-insaturados	69,95 ± 5,68
Ácidos graxos mono-insaturados	16,85 ± 0,09
Ácidos graxos saturados	10,00 ± 0,07

Inferiu-se que a suplementação com linhaça não alterou ($P>0,05$) o consumo de capim-mombaça e de MS total, expressos em kg de MS/dia, % do peso corpóreo e peso metabólico da fibra em detergente ácido, dos carboidratos totais, dos carboidratos não fibrosos e da matéria mineral. Nesse estudo, a linhaça se destacou pelo seu alto valor de proteína (22%) e FDN (40,09), provavelmente devido ao fato de sua casca ser composta por uma matriz fibro-protéica. Esses resultados se assemelham aos encontrados por Wada et al., (2008), que registraram 23,09% de PB e 48% de FDN na semente de linhaça.

Ao avaliar o desempenho de bezerros em pastagem de capim-mombaça, Moreira et al. (2008) verificaram 38% de folhas, sendo este valor inferior ao obtido neste estudo. Provavelmente devido a diferenças de categoria animal, e ao fato da dieta dos bezerros ser composta apenas de capim e sal mineral. Lima et al. (2007), observaram 55,5% de folhas no manejo rotacionado de vacas em lactação, valores próximos aos encontrados nesse experimento, no qual o pastejo também foi em sistema rotacionado.

Todavia, as vacas do grupo LINH apresentaram um menor consumo de fibra em detergente neutro ($P=0,0352$) e um aumento significativo nos consumos de proteína bruta ($P=0,0048$) e de extrato etéreo ($P<0,0001$), em consequência do alto teor de proteína e ácidos graxos contidos na linhaça (Tabela 2).

Tabela 3: Consumo diário, expresso na matéria seca, de vacas suplementadas com linhaça.

Variáveis	Controle	Linhaça	Valor de P
Capim-mombaça – kg	12,67	12,15	0,2046
MS Total (capim + linhaça) - kg	12,67	12,92	0,5452
Peso Corpóreo (PC) - %	2,13	2,14	0,9665
Peso Metabólico - g/kg PC ^{0,75}	105,29	106,13	0,7988

Proteína Bruta - kg	1,01	1,09	0,0048
Fibra em Detergente Neutro - kg	9,06	8,56	0,0352
Fibra em Detergente Ácido - kg	4,40	4,16	0,1073
Extrato Etéreo - kg	0,20	0,40	<0,0001
Carboidratos Totais - kg	11,11	11,08	0,9328
Carboidratos Não Fibrosos - kg	2,02	1,94	0,1317
Matéria Mineral - kg	0,31	0,30	0,8591

Nesse trabalho, o consumo de MS, expressos em kg/dia, porcentagem do peso corpóreo e peso metabólico; de FDA kg/dia/MS; de CT kg/dia/MS; de CNF kg/dia/MS e de MM kg/dia/MS não foram influenciados significativamente pela dieta experimental (Tabela 2). Por outro lado, ocorreu declínio ($P < 0,05$) no consumo de FDN e aumento no consumo de EE e PB em detrimento da ingestão de linhaça com benefícios para o consumo da dieta total (pasto e linhaça), caracterizando portanto o clássico efeito substitutivo. Dessa forma, os animais substituíram parte do pasto pela linhaça, melhorando a dieta ingerida, ou seja, tiveram à disposição uma maior quantidade de energia e proteína.

Sousa et al. (2008) ao avaliarem o consumo de vacas leiteiras sob pastejo com diferentes quantidades de concentrado, verificaram que o acréscimo no consumo de MS da dieta total se deu por substituição parcial do capim pelo concentrado, ou seja, o aumento no consumo de concentrado provocou decréscimo no consumo de pasto. Silva et al. (2009) observaram que houve declínio no consumo de pasto, destacando a influência direta do consumo de MS do pasto sobre os níveis de concentrado (0, 1, 3 e 5 kg/vaca/dia).

No presente trabalho, a quantidade de linhaça fornecida (0,800 kg), foi relativamente baixa em comparação com os demais trabalhos acima citados. Desse modo acredita-se que a quantidade de suplemento fornecida não foi suficiente para alterar estatisticamente o consumo de capim pelos animais. Assim, os resultados demonstram o equilíbrio nutricional entre os grupos experimentais, indicando que a quantidade de capim foi suficiente para atender a demanda nutricional dos animais.

Em termos ruminais, avaliações *in situ*, infere-se que a linhaça apresentou baixa taxa de fermentação em todas as variáveis analisadas (MS, PB, FDN, FDA e EE), não ultrapassando 57% de desaparecimento no tempo de 96 horas, com exceção do nível de proteína que atingiu 73%, demonstrando que grande parte da casca, endosperma e óleo da semente ultrapassam o ambiente ruminal, ficando disponíveis para serem digeridos no intestino delgado (Tabela 3). Todavia, observa-se que a porcentagem de desaparecimento das variáveis MS, PB, FDN, FDA e EE do capim-mombaça foi maior em todos os tempos de incubação, quando os animais estavam submetidos apenas a dieta base (capim), quando comparados a dieta acrescida de linhaça, indicando efeito negativo desta semente oleaginosa sobre a fermentação do capim.

Tabela 4: Percentagem de desaparecimento ruminal médio da matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra em detergente neutro (FDN), fibra em detergente ácido (FDA) e extrato etéreo (EE) do capim-mombaça e da semente de linhaça, em função dos tempos de incubação

Dieta		Tempo Incubação (horas)									
		0	2	4	6	8	12	24	48	72	96
Capim-Mombaça											
Pasto	MS	6,6	26,4	30,9	34,5	37,1	45,4	55,2	66,8	72,5	76,1
	PB	20,1	43,9	51,9	58,4	61,7	67,9	75,2	85,6	87,8	90,5
	FDN	6,6	12,7	15,5	17,6	22,9	29,5	39,4	56,9	66,4	70,5
	FDA	11,4	36,4	45,6	46,4	52,5	52,9	60,9	69,2	77,1	80,5
Linhaça											
Pasto + Linhaça	MS	0,7	9,9	14,3	15,1	16,5	18,5	23,1	34,7	45,7	54,8
	PB	1,4	18,6	21,6	29,8	32,7	38,3	42,7	53,4	66,1	73,0
	FDN	1,3	4,5	9,8	12,2	21,9	23,1	23,8	33,4	46,6	50,4
	FDA	0,8	5,2	11,9	17,0	21,1	22,8	24,8	30,3	38,3	41,9
	EE	0,7	9,9	14,3	15,1	16,5	18,5	23,1	34,7	45,7	54,8
Capim-Mombaça											
Linhaça	MS	5,7	27,2	29,2	31,1	35,1	36,8	40,5	52,4	62,8	70,2
	PB	14,9	45,9	50,6	53,3	56,5	59,6	63,8	72,9	77,5	77,7
	FDN	5,8	7,5	11,1	15,2	19,9	23,3	27,6	40,3	51,2	62,0
	FDA	8,1	30,4	44,1	47,4	49,7	51,2	51,6	60,1	66,3	73,7

Tabela 5: Valores dos coeficientes "a", "b", "c" e "I", referentes a degradabilidade ruminal da matéria seca e suas degradabilidades efetivas (DE) para as velocidades de passagem de 2, 5 e 8 % por hora do capim-mombaça e da semente de linhaça, de acordo com a dieta ingerida.

Dieta	Coeficientes*					DE (%/h)		
	Variáveis	a (%)	b (%)	c (%/h)	I (%)	2	5	8
Pasto	Capim-Mombaça							
	MS	15,23	57,99	0,0559	26,78	57,9	45,8	39,1
	PB	25,83	60,03	0,1185	14,14	77,2	68,1	61,7
	FDN	8,20	66,44	0,0284	25,36	47,2	32,2	25,6
	FDA	22,14	51,14	0,1060	26,72	65,2	56,9	49,8
Pasto + Linhaça	Linhaça							
	MS	8,11	69,56	0,0111	22,33	32,9	20,7	16,6
	PB	11,11	56,73	0,0449	32,16	50,4	38,0	31,5
	FDN	5,28	47,3	0,0259	47,42	31,9	21,4	16,8
	FDA	3,15	34,02	0,0654	62,83	29,2	22,4	18,5
	EE	6,88	41,85	0,0431	51,27	35,5	26,3	21,5
	Capim-Mombaça							
	MS	15,14	43,51	0,0636	41,35	48,2	39,5	34,4
	PB	26,57	46,47	0,1416	26,96	67,3	60,9	56,3
	FDN	8,35	69,27	0,0143	22,38	37,2	23,7	18,8
FDA	11,43	49,81	0,2916	38,76	58,0	54,0	50,5	

*a: fração solúvel; b: fração potencialmente degradável; c: taxa de degradação da fração b.

de "a": fração solúvel degradada no tempo zero, "b": degradabilidade potencial em função do tempo, "c": taxa fracional de degradação da fração "b" por unidade de tempo, e "I" fração indegradável.

O grão de linhaça apresentou baixa degradabilidade potencial (DP). Goes et al., (2011) incubaram linhaça triturada e relataram que a fração potencialmente degradável "b" da linhaça era de 87,89%. Neste ensaio a taxa de degradação da fração "b" da MS foi de 69,56. A diferença encontrada, pode ser explicada pela forma como a linhaça foi incubada, já que a triturada, promove maior exposição dos nutrientes e facilita o acesso aos microrganismos.

Semelhante a Goes et al., (2011), a linhaça apresentou baixa porcentagem da fração potencialmente degradável e de fração solúvel para PB. Além disso, a linhaça

apresentou alta fração indegradável. Inúmeras alternativas são avaliadas com o propósito de diminuir a degradabilidade da proteína no rúmen e, com isso, permitir melhor disponibilidade de aminoácidos para a digestão intestinal. De modo geral, os grãos inteiros apresentaram baixa fração solúvel para a PB, o que acarreta em menor degradabilidade efetiva.

Inferese-se que, não foi encontrada nenhuma informação na literatura referente a degradação ruminal da FDN, FDA e EE da linhaça, sendo neste trabalho verificado uma baixa degradabilidade efetiva para essas variáveis.

Em relação à pastagem, observou-se valores de DP e DE menores em todas as variáveis quando os animais consumiam linhaça. A diminuição da degradabilidade da fibra é explicada pelo efeito do óleo da linhaça sobre as partículas do capim. Segundo Nagaraja et al. (1997), geralmente os ácidos graxos insaturados são tóxicos para as bactérias gram-positivas, cujo mecanismo pode envolver uma alteração na permeabilidade da membrana celular, que reduz a capacidade da célula regular o pH intracelular e a captação de nutrientes. Ainda segundo estes autores, os ácidos oleico, linoleico e linolênico inibem fortemente o crescimento das bactérias celulolíticas *B. fibrisolvens*, *R. albus* e *R. flavefaciens*, dessa forma, diminuindo a degradabilidade da fibra da pastagem.

Notifica-se ainda baixa fração solúvel (“a”) de MS, PB, FDN, FDA e EE na semente de linhaça. A linhaça apresentou taxa de degradação da fração potencialmente degradável (“b”) e da taxa da fração indegradável (“c”) de 42 e 51%, respectivamente para a variável EE. Deste modo foi ocasionada uma baixa degradabilidade potencial e efetiva (%/h) desta semente oleaginosa (Tabela 4).

Em relação ao capim-mombaça, verifica-se que a fração solúvel (“a”) das variáveis, MS, PB, FDN, FDA e EE, em ambas as dietas (pasto e pasto mais linhaça)

foram semelhantes. Todavia, observou-se uma redução da fração potencialmente degradável (“b”) das variáveis MS e PB do capim na dieta pasto mais linhaça em comparação a dieta controle (somente pasto). Como consequência, houve aumento na fração não degradável (“I”) para essas mesmas variáveis. Também notifica-se que nos animais alimentados exclusivamente com pasto, a Degradabilidade Efetiva do capim-mombaça foi maior em todas as variáveis analisadas nas taxa de passagens de 2, 5 e 8%/h¹.

Os coeficientes de digestibilidade da matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente ácido, carboidratos totais e não fibrosos, matéria mineral e nutrientes digestíveis totais não apresentaram diferenças significativas ($P>0,05$) entre os tratamentos (Tabela 5). No entanto, no grupo LINH, observou-se coeficiente de digestibilidade de extrato etéreo maior ($P<0,0001$) quando comparado ao grupo CONTR. Em contrapartida, houve uma tendência ($P=0,0579$) do coeficiente de digestibilidade de FDN ser menor no grupo LINH.

Tabela 6: Coeficientes de digestibilidade, expressos na matéria seca, das dietas controle (capim-mombaça) e Linhaça (capim-mombaça mais linhaça) em vacas Girolando, mantidas em regime de pastoreio.

Variáveis	Controle	Linhaça	Valor de P
Matéria Seca - %	62,88	63,11	0,8394
Proteína Bruta - %	55,26	62,70	0,2541
Fibra em Detergente Neutro - %	77,15	75,36	0,0579
Fibra em Detergente Ácido - %	74,77	72,45	0,1194
Carboidratos Totais - %	70,47	69,91	0,4854
Carboidratos Não Fibrosos - %	40,25	37,0	0,4447
Extrato Etéreo - %	40,70	69,31	<0,0001
Matéria Mineral - %	31,41	30,92	0,8591
Nutrientes Digestíveis Totais - %	62,89	63,83	0,2179
Energia Digerível - kcal/gMS ¹	2,77	2,81	0,2179

¹ ED: (%NDT/100) * 4,409, segundo NRC (2001).

O estudo da digestibilidade é importante para quantificar o aproveitamento dos alimentos pelo animal. Todavia, no presente trabalho não foi observada influência significativa ($P>0,05$) da linhaça sobre a digestibilidade da matéria seca, proteína bruta,

carboidratos totais, carboidratos não fibrosos, fibra em detergente ácido, matéria mineral, bem como dos nutrientes digestíveis totais.

O coeficiente de digestibilidade do EE foi maior no grupo LINH devido a maior quantidade de lipídios (provenientes da linhaça) ingerido pelos animais. Essa situação pode ter ocorrido pelo fato de a linhaça ser revestida por uma matriz fibroproteica, proporcionando lenta liberação dos lipídios no ambiente ruminal. Este fato permite a ação dos microrganismos ruminais em hidrogenar as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados, de forma cadenciada, impedindo o efeito inibidor dos lipídios sobre a digestibilidade da fibra (COPPOCK et al., 1991). Além da quantidade não ser suficiente para aderir à partícula do alimento, ocasionando impedimento físico aos microrganismos e às enzimas microbianas (VALINOTE et al., 2005).

Infere-se todavia que houve uma tendência do coeficiente de digestibilidade da FDN ser menor ($P = 0,0579$) para o grupo LINH. Em um trabalho realizado por Wada et al., (2008), foram reportados menores valores na digestibilidade de MS para o tratamento com linhaça. Embora os autores não tenham encontrado diferença estatística na digestibilidade da fibra, eles citam que a mesma foi numericamente inferior e atribuiu isso aos lipídios contidos nas sementes de linhaça, os quais podem ter provocado inibição dos microrganismos celulolíticos.

Existe redução na digestibilidade da fibra quando fontes lipídicas são adicionadas às rações, e a magnitude de redução está relacionada não só a quantidade, mas principalmente ao tipo de ácido graxo presente no suplemento, sendo que os lipídios ricos em ácidos graxos insaturados tendem a provocar maior depressão na digestibilidade (SMITH et al., 2006), corroborando com a tendência de menor coeficiente de digestibilidade para os animais suplementados com linhaça observada nesse estudo.

O efeito das dietas sobre as concentrações plasmáticas dos metabólitos podem ser observados na Tabela 7. Não houve efeito ($P>0,05$) da suplementação lipídica sobre as concentrações plasmáticas de glicose, albumina e colesterol, estando os valores dentro dos limites considerados normais para bovinos (glicose: 45,00 a 75,00mg/dL; albumina: 3,3 a 3,55 g/dL e colesterol: 80 e 120 mg/dL).

Tabela 7: Concentrações plasmáticas dos metabólitos sanguíneos, em vacas Girolando mantidas em regime de pastoreio em capim-mombaça, com ou sem a suplementação de grãos de linhaça.

Variáveis	Controle	Linhaça	Valor de P
Glicose - mg/dL	59,4	59,2	0,8274
Albumina - g/dL	3,61	3,5	0,5642
Colesterol - mg/dL	104,1	116,3	0,7453

Neste trabalho, não foi observado efeito da suplementação sobre as concentrações de glicose ($P>0,05$). Tais resultados corroboram com os de outros autores que forneceram dietas enriquecidas com ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) para fêmeas bovinas (NOGUEIRA et al., 2012). Devido aos mecanismos de economia de glicose dos ruminantes, os efeitos dos tratamentos sobre as concentrações de glicose plasmáticas não são esperados, o que explica a manutenção da glicemia (GAGLIOSTRO et al., 1991).

Não foram encontradas diferenças na concentração plasmática total de albumina entre os grupos ($P> 0,05$). A avaliação da albumina no plasma é uma maneira de controlar a ingestão de proteína dos alimentos (NOGUEIRA et al., 2012). Apesar do consumo de PB ter sido maior ($P<0,05$) no grupo LINH em comparação ao CONTR, não foi suficiente para que alterasse as concentrações plasmáticas de albumina, que permaneceram dentro do padrão normal para a espécie (DAVID, 2008).

A administração de gordura para fêmeas bovinas, estimula a síntese e o acúmulo de colesterol nos tecidos e fluidos corporais. Diversos autores incrementando gordura na dieta observaram aumento nos níveis de colesterol (NOGUEIRA et al., 2012). Nesse

experimento não foi encontrada diferença na concentração plasmática de colesterol entre os grupos.

Neste ensaio também não foi observada diferenças significativas ($p>0,05$) entre o ganho de peso médio diário, indicando que a suplementação com linhaça não teve influencia na deposição de tecidos corpóreos. As médias dos pesos e o ganho médio diário estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 8: Pesos corpóreos inicial e final e ganhos diários em vacas Girolando mantidas em regime de pastoreio em capim-mombaça, com ou sem suplementação com grãos de linhaça.

Variáveis*	Controle	Linhaça
Peso Corpóreo Inicial - kg	583,3	584,5
Peso Corpóreo Final - kg	613,1	618,5
Ganho de Peso Médio Diário - kg	0,236	0,270

* Não foram observados valores maiores de $P<0,05$.

Com relação ao ganho de peso infere-se que os mesmos são relativamente baixos, média de 250 gramas ao dia. Todavia, foram coerentes com a dieta oferecida e com a categoria avaliada, ou seja, vacas adultas com peso corpóreo estabilizado.

CONCLUSÕES

A linhaça possui baixa degradabilidade efetiva e potencial e diminui a degradabilidade e digestibilidade do capim. Porém não altera as concentrações dos metabólitos séricos, o ganho de peso dos animais e os coeficientes de digestibilidade, exceto do extrato etéreo quando 800g de linhaça é consumida diariamente por fêmeas Girolando.

AGRADECIMENTOS

À UEMS, À FUNDECT e CNPq pelo suporte e apoio financeiro dado nesse experimento e à UFMS e UCDB pela realização das análises.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. **Official methods of analysis**. 15^o ed. Washington: AOAC, 1990; 1990.

BENCHAAAR, C.; ROMERO-PÉREZ, G.A.; CHOUINARD, P.Y.; HASSANAT, F.; EUGENE, M.; PETIT, H.V.; CÔRTEZ, C. Supplementation of increasing amounts of linseed oil to dairy cows fed total mixed rations: Effects on digestion, ruminal fermentation characteristics, protozoal populations, and milk fatty acid composition. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.8, p.4578-4590, 2012.

CAVALIERI, F. B.; SANTOS, G. T.; MATSUSHITA, M.; PETIT, H. V.; RIGOLON, L. P.; SILVA, D. Milk production and milk composition of dairy cows fed Lac100® or whole flaxseed. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 413-6, 2005.

COPPOCK C.E, WILKS D.L. Supplemental fat in high-energy rations for lactating cows: effects on intake, digestion, milk yield, and composition. **Journal of Animal Science**, v.69, p.3826-37, 1991.

CRAIG, W.M.; HONG, B.J.; BRODERICK, G.A.; BULA, R.J. In vitro inoculum enriched with particle-associated microorganisms for determining rates of fiber digestion and protein degradation. *Journal of Dairy Science*, v.67, n.12, p.2902-2909, 1984.

DAVID ECKERSALL P. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**, 6 ed. San Diego: Academic Press. p. 117-55, 2008

GAGLIOSTRO, G.; CHILLIARD, Y. Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 4. In vivo and in vitro adipose tissue lipolytic responses. **Journal of dairy science**.74:1830-1843, 1991.

GOES, R.H.T.B.; SOUZA, K.A., NOGUEIRA, K.A.; GUIMARÃES, PEREIRA, D. F.; OLIVEIRA, E.R.; BRABES, K.C.S. Degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta, e tempo de colonização microbiana de oleaginosas, utilizadas na alimentação de ovinos. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v.33, n.4, p.373-378, 2011.

GONZALEZ, F; MUIÑO, R; PEREIRA, V; MARTINEZ, D; CASTILLO, C; HERNÁNDEZ, J; BENEDITO, J.L. Milk yield and reproductive performance of dairy heifers and cows supplemented with polyunsaturated fatty acids. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.50, n.4, p.306-312, abr. 2015.

JORGE, J.R.V.; ZEOULA, L.M.; PRADO, I.N.; SILVA, R.R.; ANDRADE, R.V.; PRADO, J.M.; BUBLITZ, E.E. Lipídios em dietas para novilhos holandeses: digestibilidade aparente. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v.9, n.4, p.743-753, 2008.

LIMA, M.L.P.; LEME, P.R.; PINHEIRO, M.G.; BERCHIELLI, T.T.; NOGUEIRA, J.R. Vacas leiteiras mantidas em rotacionado de capim elefante guaçu e capim tanzânia: produção e composição do leite. **Pesquisa e Tecnologia**, v.4, n.1, p.67-75, 430 2007.

MOREIRA, F.B.; MIZUBUTI, I.Y.; PRADO, I.N.; MATSUSHIATA, M.; MATSUBARA, M.T.; DOGANI, R. Suplementação com sal mineral proteinado para bezerros mantidos em pastagem de capim Mombaça, no inverno. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.203-210, 2008.

NAGARAJA, T.G.; NEWBOLD, C.J.; van NEVEL, C.J.; DEMEYER, D.I. Manipulation of ruminal fermentation. In: Hobson, P.N., Stewart, C.S., editors. **The Rumen Microbial Ecosystem**: Springer Netherlands, p.523-632, 1997.

NOGUEIRA, É.; SILVA, A.S.D.; AMARAL, T.B.; ÍTAVO, L.C.V.; DIAS, A.M.: MINGOTI, G.Z. Follicular dynamics and production of oocytes in young Nellore heifers with energetic supplementation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 41:2012-2017, 2012.

NUNES, A. A., FAVARO, S. P., GALVANI, F.; MIRANDA, C. H. B. Good practices of harvest and processing provide high quality Macauba pulp oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, 117: 2036–2043, 2015

OLIVEIRA, E. A.; SAMPAIO, A. A. M.; HENRIQUE, W.; PIVARO, T. M.; ROSA, B. L.; FERNANDES, A. R. M.; ANDRADE, A. T. Quality traits and lipid composition of meat from Nellore young bulls fed with different oils either protected or unprotected from rumen degradation. **Meat Science**, v. 90, n. 1, p. 28-35, jan-2012.

ORSKOV, E.R.; McDONALD, I. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. **Journal of Agriculture Science**, v.92, n.1, p.499-508, 1979.

ORSKOV, E. R.; HOVELL, F. D. D.; MOULD, F. The use of the nylon technique for the evaluation of feedstuffs. **Tropical Animal Production**, v. 5, n. 3, p. 195-213, 1980.

RAMCHARITAR, A.; BADRIE, N.; MATTFELDT-BEMAN, M.; MATSUO, H.; RIDLEY, C. Consumer acceptability with Muffind flaxseed (*linum usitatissimum*). **Journal of food Science**, v.70, n.7, 2005.

ROSA, B.L.; SAMPAIO, A.A.M.; HENRIQUE, W.; OLIVEIRA, E.A.; PIVARO, T.M.; ANDRADE, A.T.; FERNANDES, A.R.M. Performance and carcass characteristics of Nellore young bulls fed different sources of oils, protected or not from rumen degradation. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.42, n.2, p.109-116, 2013.

SILVA, M.M.C; RODRIGUES, M.T.; RODRIGUES, C.A.F.; BRANCO, R.H.; LEÃO M.I.; MAGALHÃES, A.C.M.; MATOS, R.S. Efeito da suplementação de lipídios sobre a digestibilidade e os parâmetros da fermentação ruminal em cabras leiteiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa, v. 36, n. 1, p. 246-256, Fev-2007.

SILVA C.V.D.; LANA R.D.P.; CAMPOS J.M.D.S.; QUEIROZ A.C.D.; LEÃO M.I.; ABREU D.C.D. Consumo, digestibilidade aparente dos nutrientes e desempenho de vacas leiteiras em pastejo com dietas com diversos níveis de concentrado e proteína bruta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.1372-1380, out-2009.

SMITH, S. B., LUNT, D. K.; CHUNG, K. Y.; CHOI, C. B.; TUME, R. K.; ZEMBAYASHI, M. Adiposity, fatty acid composition, and delta-9 desaturase activity during growth in beef cattle. **Animal Science Journal**. 77:478–486, 2006.

SOUSA, B.M.; SATURNINO, H.M.; BORGES, A.L.C.C.; LOPES, F.C.F.; SILVA, R.R.; CAMPOS, M.M.; PIMENTA, M., CAMPOS, W.E. Estimativa de consumo de matéria seca e de fibra em detergente neutro por vacas leiteiras sob pastejo, suplementadas com diferentes quantidades de alimento concentrado. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.890-895, ago-2008.

VALINOTE, A.C.; NOGUEIRA FILHO, J.C.M.; LEME, P.R.; SILVA, S.D.L.E.; CUNHA, J.A. Fontes de lipídeos e monensina na alimentação de novilhos Nelore e sua relação com a população de protozoários ciliados do rúmen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, p.1418-1423, 2005.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional Ecology of the Ruminant**. 2. ed. New York: Cornell University Press, 1994. 476p.

WADA, F.Y.; PRADO, I.N.; SILVA, R.R.; MOLETTA, J.L.; VISENTAINER, J.V.; ZEOULA, L.M. Grãos de linhaça e de canola sobre o desempenho, digestibilidade aparente e características de carcaça de novilhas Nelore terminadas em confinamento. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.4, p.883-895, 2008.

WATHES, D.C.; ROBERT, D.; ABAYASEKARA, E.; AITKEN, R.J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biology of Reproduction**, v.77, p.190-201, ago-2007.

CAPÍTULO 3 – Artigo científico (Theriogenology)

Performance nutricional e perfil lipídico de oócitos de fêmeas bovinas suplementadas com linhaça

C. J. T. Cardoso^a, M. B. Souza-Cáceres^b, M. V. M. Oliveira^a, E. Nogueira^c, L. P. Silva^d, F. A. Melo-Sterza^a

^a UEMS - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brasil.

^b UEL, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil.

^c Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Pantanal, Corumbá, Mato Grosso do Sul, Brasil

^d Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa – Cenargen - Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Resumo

Apesar dos inúmeros trabalhos relatando os efeitos da nutrição sobre a reprodução, pouco se sabe sobre o impacto dos ácidos graxos poli-insaturados sobre os oócitos. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com linhaça sobre o consumo, degradabilidade ruminal e digestibilidade, metabólitos sanguíneos (glicose, albumina e colesterol séricos), bem como a qualidade e perfil lipídico de oócitos bovinos. Para tanto, foram utilizadas doze fêmeas bovinas da raça Girolando e distribuídas aleatoriamente em 2 grupos experimentais: controle (CONTR, n = 6) e grupo linhaça (LINH, n = 6), diferindo apenas pelo fornecimento de 0,800kg/animal/dia de linhaça na dieta do grupo LINH. A digestibilidade foi aferida por meio da técnica *in situ*, sendo utilizado animais submetidos ao mesmo regime alimentar. Foram realizadas 7 sessões de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU). Os animais do grupo

LINH consumiram mais proteína bruta e extrato etéreo e tiveram menor consumo de fibra insolúvel em detergente neutro. A linhaça fornecida em grão para os animais, teve baixa degradabilidade efetiva e potencial. Não houve diferença dos coeficientes de digestibilidade exceto do extrato etéreo. Não houve efeito ($P>0,05$) da suplementação lipídica sobre os metabolitos sanguíneos entre os grupos e as OPUs. Não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) no número médio de CCOs recuperados e a taxa de viabilidade. A suplementação de 0,800 kg de linhaça na dieta de vacas Girolando não alterou o perfil lipídico dos oócitos.

Palavras chave: criopreservação, embriões, ácidos graxos.

1. INTRODUÇÃO

O aumento da densidade energética da dieta através da suplementação com gordura é uma pratica comumente utilizada, principalmente em rebanhos leiteiros. Entretanto, além de fornecer calorias, os lipídios possuem efeitos diretos na reprodução, melhorando a fertilidade dos animais em diversas situações [1].

Já foi observado efeitos dos ácidos graxos sobre o desenvolvimento folicular ovariano, tamanho de corpo lúteo e qualidade oocitária [2]. Dietas enriquecidas com PUFA's também podem influenciar nas concentrações circulantes de progesterona [3], $\text{PGF}_{2\alpha}$ [4] e até mesmo na qualidade embrionária [5]. No entanto, alguns resultados são contraditórios quando se utilizam da suplementação lipídica para bovinos, pois na maioria das vezes é impossível distinguir o nível de impacto dos PUFA's sobre os oócitos [6]. Todavia, pouco se sabe sobre como os folículos e os oócitos absorvem esses AGs.

Nesse contexto, diversos estudos vem sendo realizados com o objetivo de avaliar o fornecimento de diferentes fontes de lipídios como incremento na densidade energética da dieta dos animais buscando melhoras na condição reprodutiva do gado leiteiro. Dentre elas se destacam o uso do óleo de soja [7], sementes de girassol [8] e sementes de linhaça [9].

A linhaça em grão é um alimento rico em ácidos graxos poli-insaturados, em especial o ácido linolênico [10], e por estar na forma de grão, o óleo da linhaça pode ter liberação mais lenta, diminuindo, assim, a bio-hidrogenação ruminal [11], no entanto, pouco se sabe sobre seu consumo, comportamento em ambiente ruminal e digestibilidade intestinal.

Já foi relatado aumento da fluidez da membrana plasmática de embriões bovinos consequente a incorporação direta de PUFA's na estrutura da membrana e redução no teor de lipídios de embriões após suplementação com ácido linoleico conjugado (CLA – membro da família dos PUFA's) durante o cultivo embrionário *in vitro*. [12] [13].

A semi-permeabilidade membrana plasmática permite manter gradiente químico adequado de íons e outros componentes solúveis. Ela é composta de lipídios, proteínas e carboidratos, sendo os lipídios responsáveis pela integridade estrutural. Sua fluidez, depende da temperatura, da sua composição lipídica, especialmente do conteúdo de colesterol. O comprimento e o grau de insaturação das cadeias de ácidos graxos são de extrema importância [14].

Portanto, mudanças no perfil de ácidos graxos ou alterações na organização molecular dos lipídios da membrana podem afetar sua fluidez e, consequentemente, a capacidade de gametas e embriões resistirem à criopreservação [15] [16].

A análise direta por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz - espectrometria de massa (MALDI-MS) é suficientemente sensível para permitir a análise de oócitos [17] e pode ser utilizada para monitorar mudanças na composição lipídica da membrana em diferentes fases e serve como auxílio no estudo das biotecnologias de reprodução[18].

Nossa hipótese é que a suplementação de PUFA's na dieta de doadoras de oócitos possa promover alteração do perfil lipídico das membranas dos oócitos em função do tempo de suplementação.

Com base nisso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com linhaça sobre o consumo, degradabilidade ruminal e digestibilidade; metabólitos sanguíneos (glicose, albumina e colesterol séricos), bem como a qualidade e perfil lipídico de oócitos bovinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e local do experimento

O experimento foi realizado no setor de Bovinocultura Leiteira da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS, unidade de Aquidauana, MS, Brasil), entre os meses de janeiro a junho de 2015. Todas as manipulações envolvendo os animais foram realizadas de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da UEMS (Protocolo nº 012/2014).

Doze fêmeas bovinas da raça Girolando (3/4 Holandes x 1/4 Gir) cíclicas, não gestantes, não lactantes, com idade média de $5,16 \pm 1,97$ anos, peso médio de $558,41 \pm 67,6$ kg e escore de condição corporal (ECC) médio de $4,06 \pm 0,41$ (escala 1-5) foram utilizadas no experimento e distribuídas aleatoriamente em 2 grupos experimentais homogêneos de acordo com o grau de sangue, peso, idade e ECC: grupo controle (CONTR, n = 6) e grupo linhaça (LINH, n = 6).

Os animais foram mantidos em sistema de pastejo rotacionado em seis piquetes com tamanho médio de 1,2 hectares cada, formados com capim *Panicum Maximum* sp. (cv. Mombaça) recebendo água e suplementação mineral à vontade com 87g/kg de fósforo (Montana 87®, Montana Suplementos Minerais e Rações Ltda, Jardim, MS, Brasil). Todos os animais eram manejados conjuntamente. Para eliminar o efeito ambiental do manejo, diariamente todos os animais eram levados ao curral e apenas os animais do grupo LINH recebiam a dieta experimental. O fornecimento da dieta experimental era feito individualmente, com o intuito de que os animais consumissem a quantia desejada sem haver competição. Na Tabela 8, estão demonstrados os valores médios da composição bromatológica do pasto e da linhaça utilizados durante o período experimental. A aferição da degradabilidade foi efetuada utilizando-se dois bovinos machos castrados com media de 650 kg de peso e submetidos ao mesmo regime alimentar.

Tabela 9: Composição bromatológica dos alimentos

Variáveis	Pasto*	Linhaça
MS (%)	29,69	92,99

PB (%)	7,47	21,99
EE (%)	1,52	27,32
FDN (%)	66,25	40,09
FDA (%)	31,62	20,59
CHOT (%)	81,36	43,66
CNF (%)	15,11	3,57
MM (%)	9,66	7,03

Matéria seca (MS); proteína bruta (PB); extrato etéreo (EE); fibra insolúvel em detergente neutro (FDN); fibra insolúvel em detergente ácido (FDA); carboidratos totais (CHOT); carboidratos não fibrosos (CNF) e matéria mineral (MM). *Os valores estão expresso em médias das amostras coletadas (n=24) durante o período experimental.

2.2 Delineamento experimental

O período experimental foi de dezembro/2014 a junho/2015. Inicialmente foi realizado um período de adaptação de quinze dias, com fornecimento diário de sementes de linhaça, com consumo progressivo até a estabilização do consumo na quantidade desejada. Após o período de adaptação, os animais foram divididos em dois grupos experimentais (CONTR e LINH) e foi iniciada a suplementação diferenciada durante 126 dias. O grupo CONTR (n=6) recebeu apenas a dieta base (pastagem) e o grupo LINH (n=6) recebeu suplementação com 800 g/animal/dia de linhaça marrom uma vez ao dia.

Durante o período experimental foram realizadas 7 sessões de aspiração folicular guiada por ultrassonografia – OPU (ovum pick-up), sendo a primeira realizada um dia antes do início do período de adaptação dos animais. Foi denominado D0 o dia seguinte ao término da adaptação, no qual os animais passaram a consumir a quantia desejada individualmente. A partir do D0, foram realizadas 6 sessões de OPU em ambos os grupos com intervalo de 21 dias, conforme a Figura 10.

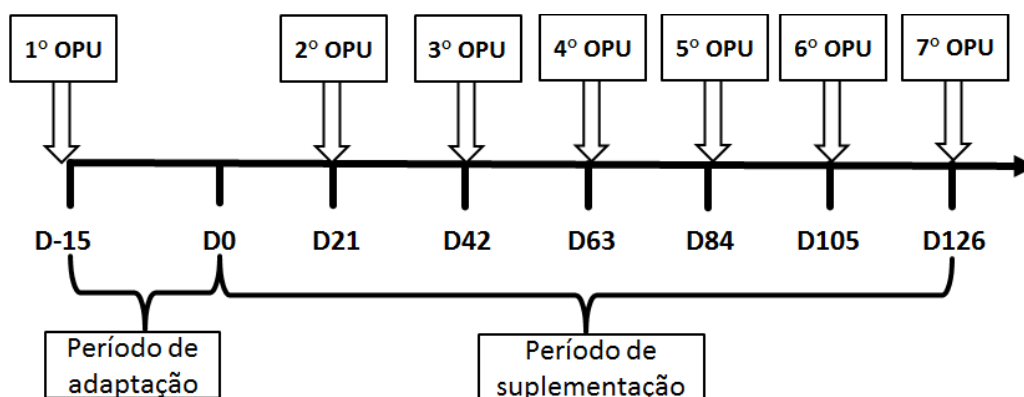


Figura 9: Delineamento experimental.

2.3 Consumo e digestibilidade

O consumo de forragem pelos animais foi determinado indiretamente através da Fibra em Detergente Ácido Insolúvel (FDAi) como marcador interno segundo o método descrito por Craig et al., (1984).

Para as análises de digestibilidade, foram coletadas amostras de capim em períodos distintos ao longo do experimento, as quais foram feitas pela técnica do pastejo simulado. As amostras das fezes foram coletadas diretamente da ampola retal dos animais, também em períodos distintos ao longo do experimento. A produção fecal total dos animais foi determinada realizando-se a coleta total de fezes num período de 24 horas, sendo esta realizada no último dia de arraçãoamento.

As amostras de pasto e fezes foram, pré-secas em estufa de ventilação forçada (65°C, 48 horas) e, posteriormente, trituradas a 2 mm em moinho tipo Willey, colocadas em potes plástico, identificadas e armazenadas para posteriores determinações de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) segundo metodologia proposta pela AOAC, (1990). Os teores de fibra em detergente neutro (FDN) e fibra em detergente ácido (FDA) de acordo com Van Soest et al., (1991) [19] e os teores de extrato etéreo (EE) e matéria mineral (MM) segundo Silva & Queiroz (2006) [20]. A hemicelulose (HEM) foi determinada pela diferença entre a FDN e FDA do material analisado. Os valores referentes a carboidratos totais (CHOT) foram obtidos por intermédio da equação: $100 - (PB\% + EE\% + MM\%)$. Os carboidratos não-fibrosos (CNF) pela diferença entre CHOT e %FDN.

2.4 Degradabilidade ruminal de linhaça

Para o ensaio de degradabilidade foram utilizados dois bovinos mestiços, machos castrados, em idade adulta, tendo em média 650 kg de peso, dotados de cânula permanente no rúmen. As degradabilidades da MS, PB, FDN, FDA e EE dos alimentos foram determinadas pela técnica “in situ”, utilizando-se sacos confeccionados de TNT conforme metodologia descrita por Nocek, (1988)[21]. As sacolas foram introduzidas diretamente no rúmen, em ordem decrescente de 96, 72, 48, 24, 12, 8, 6, 4 e 2 horas conforme NRC (2001)[22]. Os dados sobre desaparecimento da MS, PB e EE foram calculados baseando-se na diferença entre o peso incubado e os resíduos após a incubação. Para a estimativa dos parâmetros cinéticos das variáveis foi utilizado o modelo assintótico de primeira ordem proposto por Orskov e McDonald (1979)[23]: $DP = a + b(1-e^{-ct})$; em que DP é a degradabilidade ruminal potencial dos alimentos; “a” é a fração solúvel; “b”, a fração potencialmente degradável da fração insolúvel que seria degradada a uma taxa “c”; “c”, que seria a taxa de degradação da fração “b”; e “t” o tempo de incubação em horas. A fração considerada não-degradável (I) foi calculada segundo: $I = (100 - (a+b))$; Para se estimar a degradabilidade efetiva (DE), foi utilizado o modelo matemático: $DE = a + [(b * c)/(c + K)]$; em que K é a taxa de passagem de sólidos pelo rúmen, definida aqui como sendo de 2, 5 e 8,0%/ h⁻¹, que pode ser atribuído ao nível de consumo alimentar baixo, médio e alto.

2.5 Coleta de sangue e análise de metabólitos sanguíneos

Em cada sessão de OPU era realizada coleta de sangue de todos os animais para quantificação de glicose, albumina e colesterol. As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa caudal e depositadas em tubos de ensaio. Após a coleta, eram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos para separação do soro e em seguida foram congeladas a -20°C até posterior análise.

As amostras foram quantificadas em seus níveis de colesterol total (método enzimático colorimétrico), albumina (método enzimático colorimétrico-verde de bromocresol) e glicose (método enzimático-hexoquinase com kits comerciais, através de procedimentos de espectrofotometria automatizado COBAS® (Roche-Hitachi) com controle de qualidade. Todas as análises dos

metabólitos sanguíneos foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

2.6 Aspiração folicular *in vivo* guiada por ultrassonografia

No dia de cada sessão de OPU, as fêmeas eram manejadas até o curral e contidas adequadamente em tronco de contenção. Era feito o esvaziamento do reto e lavagem da região perineal, para realização do procedimento anestésico. Prosseguiu-se com a aplicação de 3 mL de lidocaína (Lidovet®, Laboratório Bravet LTDA., Rio de Janeiro, RJ, Brasil) no espaço intervertebral, entre a última vértebra sacral e a primeira coccígea.

Todos os folículos maiores do que 3 mm visualizados nos ovários foram puncionados para obtenção dos complexos cumulus oócito (CCOs). Para tanto, foi utilizada agulha de calibre 20G (50 mm x 9 mm; Terumo®, Bio Brasil, São Paulo, Brasil) acoplada à transdutor microconvexo, com bomba de sucção a vácuo, 80 mm/Hg (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda., Cravinhos, SP, Brasil). O conteúdo folicular foi recuperado a partir de um circuito de Teflon (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda., Cravinhos, SP, Brasil), de 2 mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento, ligando a agulha diretamente a um tubo plástico de 50 mL, contendo 5 mL de meio de coleta, constituído de DPBS, suplementado com 1% de soro fetal bovino - SFB (Gibco BRL) e 20 UI de heparina sódica/mL (Hepamax®, Blau Farmacêutica, Cotia, SP, Brasil), em temperatura de 35 a 37°C. Após a aspiração dos folículos, cada tubo de coleta foi identificado com os dados do animal e número de estruturas puncionadas, sendo então conduzido ao laboratório. O material coletado foi depositado em um filtro de coleta de embriões, com malha de 80 µm (WTA Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda., Cravinhos, SP, Brasil) e lavado. Então, os CCOs recuperados no filtro foram transferidos para placas de poliestireno 100x20 mm (Corning Incorporated, NY, USA), contendo DPBS suplementado com 5% de SFB e avaliados sob estereomicroscópio. Após classificação dos CCOs, os viáveis (graus I e II - citoplasma com granulações homogêneas e pelo menos 3 camadas de células do cumulus compactas) foram armazenados em tubos de 0,6mL contendo 1:1 (v / v) metanol / água ultrapura a -20 ° C até análise do perfil lipídico.

2.7 Análise lipídica por MALDI-TOF/MS

2.7.1 Design experimental

Dos 285 oócitos recuperados por OPU, somente 84 oócitos classificados em graus I e II (CONTR n = 34; LINH n = 50), foram utilizados para a análise do perfil lipídico e análise estatística para comparação entre os tratamentos. Os grupos experimentais foram definidos de acordo com o tempo de suplementação e data das OPUs.

2.7.2 Preparação das amostras e aquisição dos dados

O material armazenado em solução de metanol a cada sessão de OPU foi descongelado e os oócitos desnudados em vortex. Somente os oócitos íntegros foram selecionados para a análise. Cada oócito foi alocado individualmente num poço alvo na placa de MALDI sob o estereomicroscópio. Os oócitos secaram à temperatura ambiente e em seguida 1 µL de 1,0 M de ácido 2,5-di-hidroxibenzóico (DHB) diluído em metanol puro foi depositado em cada poço para cobrir os oócitos, e novamente secaram em temperatura ambiente. Os espectros de MALDI-MS foram adquiridos no modo positivo de reflexão de íons com o auxílio de um Autoflex III MALDI, espectrômetro de massa (Brucker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os dados foram adquiridos em uma faixa de MS entre 700-1200 m/z com 1.500 disparos de laser consecutivos, até que se fosse observado que os sinais na região de interesse desaparecessem, devido ao consumo de amostra. A aquisição do MALDI-TOF/MS foi manual, aumentando a energia de colisão. Para verificar o espectro de massa foi utilizado o software Flex Analysis 3.0 (Brucker Daltonics). Os íons mais intensos claramente distintos do ruído após a exclusão de picos isotópicos foram considerados o ponto de partida para procurar valores correspondentes aos lipídios. Os espectros obtidos foram analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, EUA) que considera as intensidades dos picos mais intensos detectados comparando as razões m/z principalmente, ou seja, ele atribui um peso se uma dada razão massa/carga aparece ou não e confere um peso bem menor para a intensidade dele de modo a pesquisar nos diferentes espectros apresentados.

2.8 Análises estatísticas dos dados de campo

Dados de consumo, digestibilidade, número de oócitos recuperados, número de oócitos viáveis, taxa de viabilidade foram analisados com o software ASSISTAT v. 7.7 estão apresentados como médias $\pm$ DP. As análises dos metabólitos sanguíneos foram realizadas com o PROC GLIMMIX do SAS 9.3 e a correlação de Pearson com o PROC CORR pelo software SAS System for Windows - (Statistical Analysis System, version 9.3), Para todas as análises, as diferenças com $p \leq 0,05$ foram consideradas como significativas.

3. RESULTADOS

3.1 Consumo, degradabilidade ruminal e digestibilidade

A suplementação com linhaça não alterou ($P > 0,05$) o consumo de capim expressos em kg/dia-1, porcentagem do peso corpóreo, peso metabólico, da fibra em detergente ácido, dos carboidratos totais e não fibrosos e de matéria mineral (Tabela 9).

O grupo LINH apresentou um aumento significativo no consumo de proteína bruta ($P = 0,0048$) e de extrato etéreo ($P < 0,0001$), devido ao alto teor de PB (21,99%) e EE (27,32%) contidos na linhaça. Entretanto, o consumo de FDN pelo grupo LINH foi significativamente menor ($P = 0,0352$) comparado ao CONTR (Tabela 9).

Tabela 10: Consumo diário na matéria seca de fêmeas bovinas tratadas com linhaça.

Variáveis ¹	Controle	Linhaça	Valor de P
CMS TOTAL – kg/dia	12,67	12,92	0,5452
CPC - %	2,13	2,14	0,9665
CPM – g/kg PC ^{0,75}	105,29	106,13	0,7988
CPB – kg/dia	1,01	1,09	0,0048
CFDN – kg/dia	9,06	8,56	0,0352
CFDA – kg/dia	4,40	4,16	0,1073
CEE – kg/dia	0,20	0,40	<0,0001
CCHOT – kg/dia	11,11	11,08	0,9328
CCNF– kg/dia	2,02	1,94	0,1317

CMM – kg/dia	0,31	0,30	0,8591
---------------------	-------------	-------------	---------------

¹Consumos de matéria seca, expresso em kg/dia⁻¹ (CMS); em porcentagem do peso corpóreo (CPC); em função do peso metabólico (CPM – g/kg⁻¹ PC^{0,75}); de proteína bruta (CPB); fibra em detergente neutro (CFDN); fibra em detergente ácido (CFDA); extrato etéreo (CEE); carboidratos totais (CHOT); carboidratos não fibrosos (CCNF); matéria mineral (CMM).

O desaparecimento médio da matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (%EE) no tempo zero (0) e nas horas de incubação ruminal (horas) de acordo com a dieta recebida podem ser vistos na Figura 11.

A linhaça apresentou baixa taxa de desaparecimento no tempo 0 em todas as variáveis analisadas, aumentando gradativamente até o período de 96 horas não excedendo 60% de desaparecimento, exceto o nível de proteína atingindo acima de 70% de desaparecimento, demonstrando que parte da casca e do óleo da semente ultrapassa o ambiente ruminal.

Para a semente oleaginosa, em todas as variáveis foi observado baixa fração solúvel, o que refletiu na degradabilidade efetiva. A linhaça apresentou taxa de degradação da fração potencialmente degradável (b) do extrato etéreo de 41,85 %, e alta taxa de fração indegradável (c) 51,27%, o que acarretou em baixa degradabilidade potencial e efetiva (%/h), semelhante às demais variáveis e refletiu na menor taxa de degradabilidade efetiva de 26,3% para taxa de passagem de 5% h⁻¹ (Tabela 10).

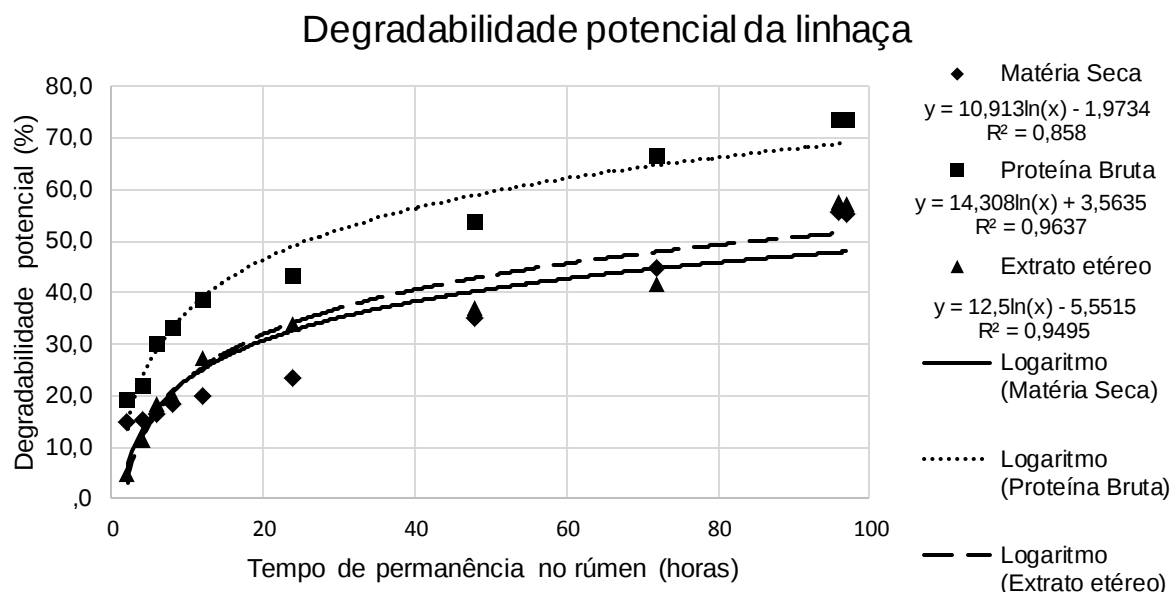


Figura 10: Degradabilidade potencial da matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE).

Tabela 11: Parâmetros cinéticos da degradação *in situ* da matéria seca (MS), proteína bruta (PB) e extrato etéreo (EE) da linhaça.

Nutrientes	Parâmetros*				Degradabilidade efetiva (%/h)		
	a (%)	b (%)	c (%/h)	l (%)	2	5	8
MS	8,11	69,56	0,0111	22,33	32,9	20,7	16,6
PB	11,11	56,73	0,0449	32,16	50,4	38,0	31,5
EE	6,88	41,85	0,0431	51,27	35,5	26,3	21,5

*a=fração solúvel; b=fração potencialmente degradável; c=taxa de degradação da fração b.

Os coeficientes de digestibilidade da matéria seca, proteína bruta, fibra em detergente ácido, carboidratos totais e não fibrosos, matéria mineral e nutrientes digestíveis totais não apresentaram diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Tabela 11). No entanto, no grupo LINH, observou-se coeficiente de digestibilidade de extrato etéreo maior ($P < 0,0001$) quando comparado ao grupo CONTR. Em contrapartida, houve uma tendência ($P = 0,0579$) do coeficiente de digestibilidade de FDN ser menor no grupo LINH.

Tabela 12: Coeficientes de digestibilidade da dieta de fêmeas bovinas manejadas sob pastejo e tratadas com linhaça.

Parâmetros ¹	Controle	Linhaça	Valor de P
DMS - %	62,88	63,11	0,8394
DPB - %	55,26	62,70	0,2541
DFDN - %	77,15	75,36	0,0579
DFDA - %	74,77	72,45	0,1194
DCT - %	70,47	69,91	0,4854
DCNF - %	40,25	37,0	0,4447
DEE - %	40,70	69,31	<0,0001
DMM - %	31,41	30,92	0,8591
NDT - %	62,89	63,83	0,2179
ED - kcal/gMS ³	2,77	2,81	0,2179

¹Digestibilidade em matéria seca, expresso em % (DMS); de proteína bruta (DPB); fibra em detergente neutro (DFDN); fibra em detergente ácido (DFDA); de carboidratos (DCT); de carboidratos não fibrosos (DCNF); de extrato etéreo (DEE); matéria mineral (DMM) e nutrientes digestíveis totais (NDT), ³(%NDT/100) * 4,409, segundo NRC (2001).

3.2 Metabólitos plasmáticos

O efeito da dieta nas concentrações plasmáticas dos metabólitos está demonstrado na Figura 11. Como não foi detectada interação entre OPU e tratamento, os valores médios de cada grupo estão demonstrados em cada sessão de aspiração folicular. Não houve efeito ($P>0,05$) da suplementação lipídica sobre as concentrações plasmáticas de glicose, albumina e colesterol. Os valores observados são considerados normais para bovinos (glicose: 45,00 a 75,00mg/dL; albumina: 3,3 a 3,55 g/dL e colesterol: 80 e 120 mg/dL).

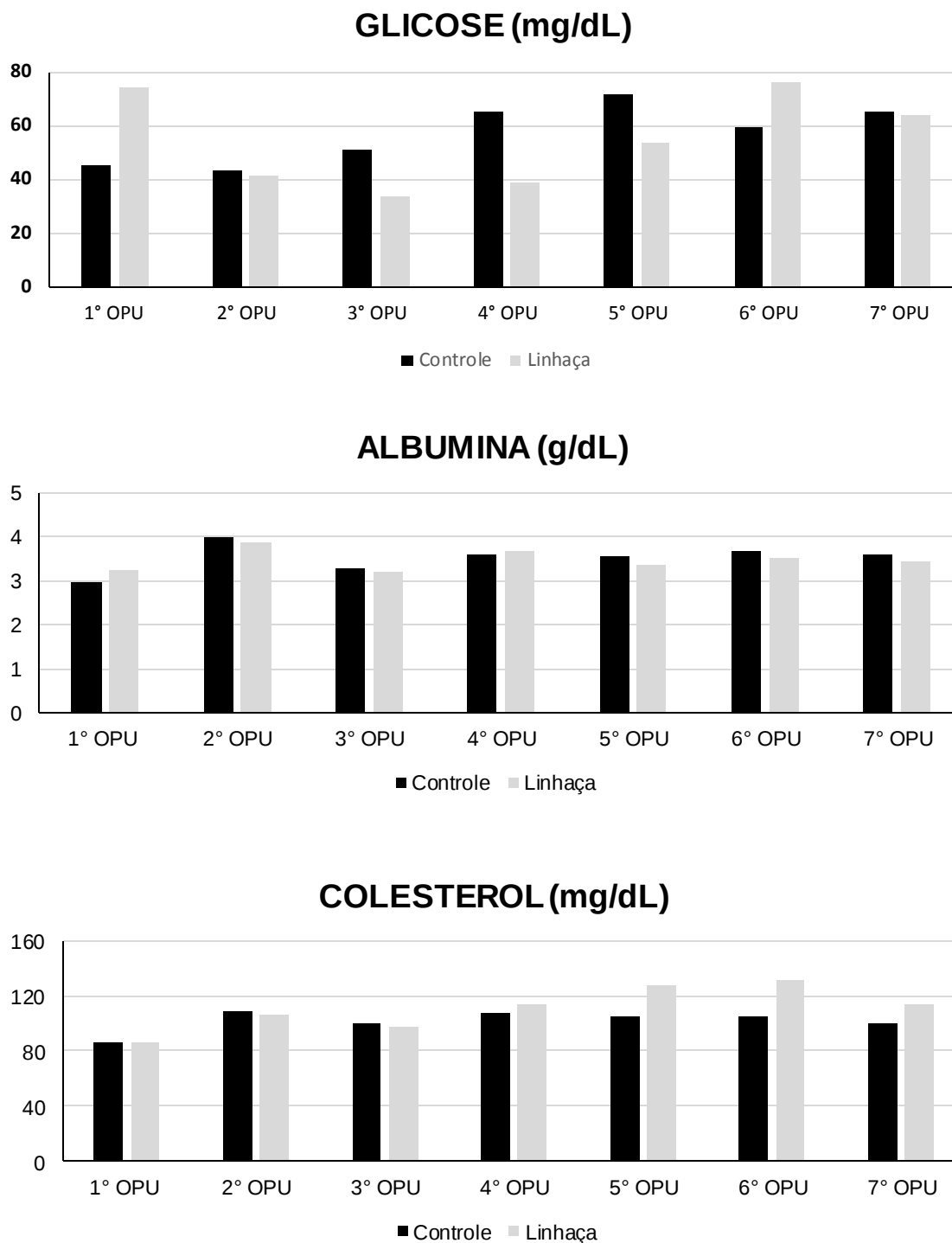


Figura 11: Efeitos da suplementação lipídica na dieta sobre os metabólitos sanguíneos (colesterol, albumina e glicose).

3.3 Aspiração folicular, recuperação e qualidade oocitária

No total foram realizadas 7 sessões de aspiração folicular (uma antes do período de adaptação e outras seis durante o período de suplementação) com intervalos médios de 21 entre si. Não foi observada diferença significativa

do número médio de CCOs recuperados ($6,45 \pm 1,66$ vs $5,28 \pm 1,18$) e o número médio de oócitos viáveis ($4,16 \pm 1,04$ vs $3,64 \pm 0,59$) não diferiu significativamente ($P > 0,05$) entre os grupos e as sessões de OPU (Tabela 9).

Tabela 13: Média $\pm$ DP do número de oócitos recuperados (viáveis e inviáveis) e taxa de viabilidade de vacas Girolando suplementadas com linhaça (LINH) ou não (CONTR).

Variáveis	CONTR (n=6)	LINH (n=6)	Valor P
Total de oócitos recuperados (n)	6,45 $\pm$ 1,66	5,28 $\pm$ 1,18	0,3495
Oócitos (graus I, II e III) (n)	4,16 $\pm$ 1,04	3,64 $\pm$ 0,59	0,2853
Oócitos inviáveis (n)	2,28 $\pm$ 0,85	1,64 $\pm$ 0,96	0,2925
Taxa de viabilidade (%)	60,48 $\pm$ 8,46	64,54 $\pm$ 7,77	0,2209

Não houve diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$).

3.4 Perfil lipídico dos oócitos por MALDI-TOF

A análise do perfil lipídico de oócitos individuais já está estabelecida e bem adaptada para análise de impressão digital de lipídios por MALDI, que por sua vez, é uma análise de alta sensibilidade que fornece quantificação relativa por meio de comparação da abundância relativa das moléculas detectadas [34].

A abordagem estatística multivariada aplicada neste estudo foi através de dendrograma, quanto mais próximos estão os perfis lipídicos dos oócitos obtidos por OPU, mais semelhante são entre si. Portanto, observa-se que a suplementação não alterou os perfis lipídicos dos oócitos em função do tempo de suplementação (Figura 13).

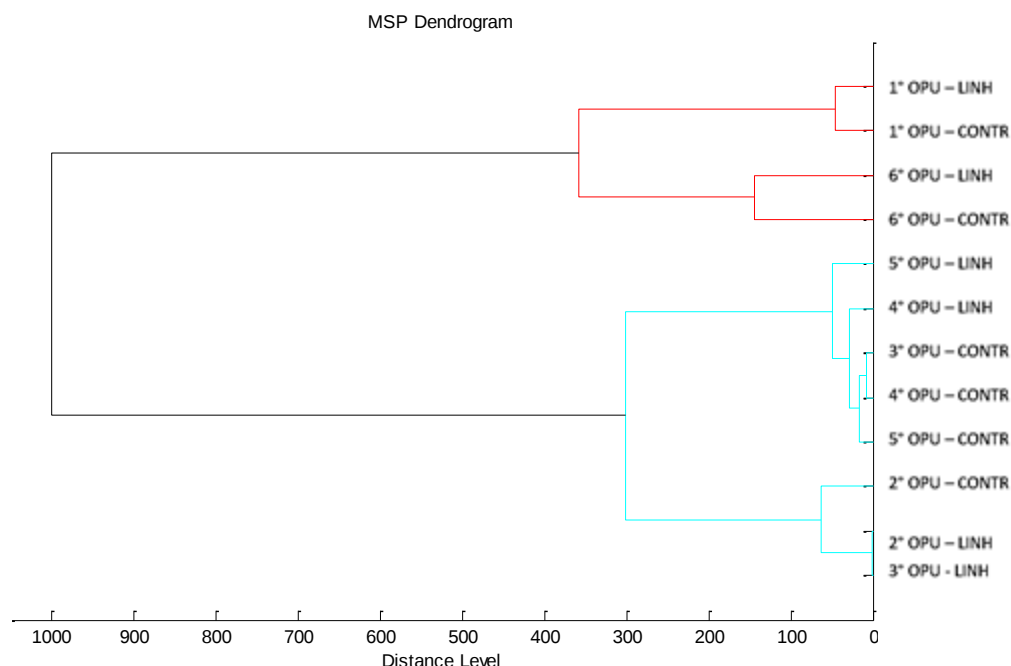


Figura 12: Perfil lipídico dos oócitos de fêmeas bovinas suplementadas com linhaça

4. DISCUSSÃO

Em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia o efeito da suplementação lipídica para doadoras no perfil lipídico dos oócitos. Neste estudo realizamos a adição de linhaça como fonte de gordura na dieta dos animais, que é um produto rico em PUFA's da família n-3 (α -linolênico) e em menor quantidade nos da família n-6 (linoleico). Quando fornecido na forma de grão, acredita-se que o óleo presente na linhaça tem liberação mais lenta, diminuindo assim, a bio-hidrogenação ruminal [11].

No presente experimento, o período de suplementação foi de 126 dias, pois de acordo com Webb et al. [24], em bovinos, são necessários, aproximadamente, três meses para que os folículos pré-antrais (folículo primordial) cresçam até o estágio de folículo pré-ovulatório. Neste período, teoricamente, todos os oócitos estariam totalmente sob o efeito da alimentação.

A suplementação com linhaça não influenciou o número de oócitos recuperados, bem como a taxa de viabilidade. Na literatura esses dados também são controversos [7, 9, 25, 26]. Acredita-se que tais diferenças sejam variáveis em função da condição corporal inicial dos animais [26]. Já foi

relatado que o aumento do fornecimento de energia na dieta de bovinos foi benéfico para a qualidade oocitária de animais com ECC moderado e deletério em animais com elevado ECC. No presente estudo, a média do ECC dos animais de ambos os grupos era alto (4, em escala de 1 a 5) a taxa de viabilidade (70%) dos dois grupos se encontram semelhantes aos encontrados na literatura (75% [26]; 67% [9].

O efeito dos PUFA's fornecidos na dieta sobre a qualidade dos oócitos pode ser parcialmente mediado por alterações na composição dos ácidos graxos do fluido folicular, ou seja, do microambiente que cerca o CCO durante seu desenvolvimento e maturação [9, 27]. Entretanto, alterações na composição de ácidos graxos dos oócitos são relativamente pequenas, indicando que estes tem um mecanismo de captação seletiva de PUFA's [28]. Estas alterações podem influenciar a maturação nuclear e o nível de expansão das células do *cumulus*, pontos críticos para o desenvolvimento oocitário pós fertilização [29]. Nesse sentido pode-se pressupor que mesmo não havendo alteração significativa do perfil lipídico dos oócitos, um efeito benéfico pode ser observado em função das inter-relações entre o fluido folicular e o oócito.

Neste trabalho, não foi observado efeito da suplementação sobre as concentrações de glicose ($P > 0,05$). Tais resultados corroboram com os de outros autores que forneceram dietas enriquecidas com PUFA's para fêmeas bovinas [26, 27, 30]. A importância da glicose como fonte de energia para o ovário de fêmeas bovinas e de embriões pós-implantados, foi documentada anteriormente por Boland et al., [31]. Devido aos mecanismos de economia de glicose dos ruminantes, os efeitos dos tratamentos sobre as concentrações de glicose plasmática normalmente não são esperados, o que explica a manutenção da glicemia [32].

Não foram encontradas diferenças na concentração plasmática total de albumina entre os grupos ($P > 0,05$). A avaliação da albumina no plasma é uma maneira de controlar a ingestão de proteína dos alimentos [26]. Apesar do consumo de PB ter sido maior ($P < 0,05$) no grupo LINH em comparação ao CONTR, não foi suficiente para que alterasse as concentrações plasmáticas de albumina, que permaneceram dentro do padrão normal para a espécie [33].

A administração de gordura para fêmeas bovinas, estimula a síntese e o acúmulo de colesterol e ésteres de colesterol nos tecidos e fluidos corporais,

inclusive nos ovários [26, 34, 35]. As lipoproteínas predominantemente presentes na circulação sanguínea de ruminantes são as lipoproteínas de alta densidade (HDL), as quais parecem ser as únicas lipoproteínas com acesso ao compartimento intrafolicular [35, 36]. Ryan et al. [37] avaliaram o número de folículos responsivos ao tratamento superovulatório e o número e qualidade de embriões produzidos, fornecendo dietas com e sem suplementação de óleo de soja. Os autores observaram aumento do número de folículos médios, da concentração de colesterol total e da progesterona do líquido folicular de novilhas que receberam a suplementação. Todavia, não houve variação na resposta superovulatória e no número e qualidade de embriões produzidos. Esses resultados confirmam as hipóteses de Mihm et al., [38] que acreditam que o incremento do número de folículos recuperados pode ser explicado pelo aumento nos níveis plasmáticos e foliculares de HDL-colesterol provenientes do aumento na ingestão de gordura. O HDL-colesterol, livre nas células luteais da granulosa, estimularia a produção de IGF-I e outros fatores de crescimento. Segundo Monniaux et al. [39], os fatores de crescimento modulam o crescimento, maturação e atresia folicular. Estes fatores são determinantes no desenvolvimento de folículos pequenos até que se tornem dependentes das gonadotrofinas. No entanto, apesar de não terem sido encontradas diferenças nas concentrações plasmáticas de colesterol entre os grupos, houve uma tendência ($P = 0,0507$) na correlação do colesterol com o número de oócitos viáveis, o que nos leva a especular sobre um possível efeito positivo do colesterol sobre a qualidade oocitária conforme citado acima.

Houve declínio ($P < 0,05$) no consumo de FDN e aumento no consumo de EE e PB em detrimento da ingestão de linhaça com benefícios para o consumo da dieta total (pasto e linhaça), caracterizando portanto o clássico efeito substitutivo. Dessa forma, com o consumo de concentrado, os animais substituíram parte do pasto pela linhaça, melhorando a dieta ingerida, ou seja, tiveram à disposição uma maior quantidade de energia e proteína.

O coeficiente de digestibilidade do EE foi maior no grupo LINH devido a maior quantidade de lipídios (provenientes da linhaça) ingerido pelos animais. Essa situação pode ter ocorrido pelo fato de a linhaça ser revestida por uma matriz fibroproteica, proporcionando lenta liberação dos lipídios no ambiente ruminal. Este fato permite a ação dos microrganismos ruminais em hidrogenar

as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados, de forma cadenciada, impedindo o efeito inibidor dos lipídios sobre a digestibilidade da fibra [40]. Além da quantidade não ser suficiente para aderir à partícula do alimento, ocasionando impedimento físico aos microrganismos e às enzimas microbianas [41].

A linhaça apresentou taxa de degradação da fração potencialmente degradável (b) do extrato etéreo de 41,85 %, e alta taxa de fração indegradável (c) 51,27%, o que acarretou em baixa degradabilidade potencial e efetiva (%/h), semelhante a taxa de proteína, refletindo na menor taxa de degradabilidade efetiva de 26,3% para taxa de passagem de 5% h⁻¹. Dessa forma, entende-se que o óleo da linhaça não sofreu grandes modificações do metabolismo microbiano ruminal, chegando a nível intestinal. O fornecimento de linhaça não alterou o consumo e digestibilidade da matéria seca. O coeficiente de digestibilidade do extrato etéreo foi maior no grupo LINH devido a maior quantidade de lipídios (provenientes da linhaça) ingerido pelos animais, demonstrando que houve absorção pelo animal. Como não houve efeito da suplementação no perfil lipídico dos oócitos, especula-se que a quantidade de linhaça fornecida não foi suficiente para alterar tal evento. Para reduzir ainda mais a biohidrogenação e assim, aumentar a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados que chegam ao intestino delgado seria interessante fornecer dietas que diminuem o pH ruminal, ou seja, fornecer junto com a linhaça, uma fonte de carboidratos de rápida degradação ruminal impedindo os microorganismos de degradarem os lipídios de interesse.

Os lipídios têm sido estudados por demonstrarem ser biomarcadores confiáveis para o desenvolvimento dos oócitos pois desempenham papéis importantes, tais como armazenamento de energia e estrutura celular (por meio do ajuste das propriedades físicas da célula; [42]).

Os lipídios estruturais mais importantes em membranas eucarióticas são os glicerofosfolípidos, tais como fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, ácido fosfatídico, e a fosfatidilcolina, sendo o último presente em mais de 50% do perfil lipídico na maioria das membranas eucarióticas. Os esfingolípídeos constituem outra classe de lipídios estruturais, e os principais esfingolípídeos em células de mamíferos são a esfingomielina e os glicoesfingolípídeos[43]. Assim, é evidente que a composição, a localização,

quantidade e função de cada um dos lipídios do oócito é um extremamente complexos [44], e estudos (como o presente) que determinem e monitorem possíveis alterações lipídicas que deverão contribuir para melhorar as condições de criopreservação de oócitos e embriões de mamíferos.

A análise do perfil lipídico em função do período de suplementação foi feita por MALDI-MS. Foi observado que independente do grupo, em algumas coletas os oócitos apresentaram alta abundância de alguns íons que estavam em menor abundância em oócitos de outras coletas. Silva-Santos et al. [45], avaliando o perfil lipídico de oócitos de diferentes qualidades e estágios observaram que folículos pré-antrais e oócitos expandidos tendiam a ser separado dos outros grupos devido a diferenças significativas nos seus perfis de lipídios. Os autores relataram que estas mudanças no perfil de lipídios observada nos CCOs de folículos pré-antrais pode estar relacionado com o estado metabólico, conteúdo reduzido de membrana citoplasmática ou a especialização da membrana dos oócitos diferentes de acordo com a fase de crescimento em comparação com oócitos de folículos antrais, pois as diferenças no perfil lipídico entre os CCOs folículos pré-antrais ou expandidos foram principalmente relacionadas às espécies de fosfatidilcolina. Neste trabalho, teoricamente todos os oócitos obtidos estariam no mesmo estado metabólico, portanto não havendo grandes diferenças no perfil lipídico.

5. CONCLUSÃO

Vacas Girolando suplementadas com 0,800 kg de linhaça consumiram mais PB e EE e tiveram menor consumo de FDN, sem alterar os coeficientes de digestibilidade, exceto do EE. A linhaça fornecida em grão para os animais, tem baixa DE e DP. A suplementação de fêmeas bovinas com linhaça, não alterou as concentrações séricas de glicose, albumina e colesterol e a qualidade de oócitos obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassonografia, bem como o perfil lipídico dos óocitos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Guardieiro MM, Bastos MR, Mourão GB, Carrijo LHD, Melo EdO, Rumpf R, et al. Função ovariana de novilhas Nelore alimentadas com dieta suplementada com gordura protegida ruminal. *Pesquisa Agrop. Brasileira*. 2010;45:408-14.
- [2] Staples CR, Burke JM, Thatcher WW. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *Journal of dairy science*. 1998;81:856-71.
- [3] Lopes CN, Scarpa AB, Cappellozza BI, Cooke RF, Vasconcelos JL. Effects of rumen-protected polyunsaturated fatty acid supplementation on reproductive performance of *Bos indicus* beef cows. *Journal of animal sc.* 2009;87:3935-43.
- [4] Mattos R, Staples CR, Thatcher WW. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Reviews of reproduction*. 2000;5:38-45.
- [5] Cerri RL, Juchem SO, Chebel RC, Rutigliano HM, Bruno RG, Galvao KN, et al. Effect of fat source differing in fatty acid profile on metabolic parameters, fertilization, and embryo quality in high-producing dairy cows. *Journal of dairy science*. 2009;92:1520-31.
- [6] Leroy JL, Van Hoeck V, Clemente M, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Van Soom A, et al. The effect of nutritionally induced hyperlipidaemia on in vitro bovine embryo quality. *Human reproduction*. 2010;25:768-78.
- [7] Ponter AA, Guyader-Joly C, Nuttinck F, Grimard B, Humblot P. Oocyte and embryo production and quality after OPU-IVF in dairy heifers given diets varying in their n-6/n-3 fatty acid ratio. *Theriogenology*. 2012;78:632-45.
- [8] Thangavelu G, Colazo MG, Ambrose DJ, Oba M, Okine EK, Dyck MK. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. *Theriogenology*. 2007;68:949-57.
- [9] Fouladi-Nashta AA, Wonnacott KE, Gutierrez CG, Gong JG, Sinclair KD, Garnsworthy PC, et al. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. *Reproduction*. 2009;138:771-81.
- [10] Kennelly JJ. Producing milk with 2.5% fat — the biology and health implications for dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*. 60:161-80.
- [11] Cavalieri FB, Santos GT, Matsushita M, Petit HV, Rigolon LP, Silva D, et al. Milk production and milk composition of dairy cows fed Lac100® or whole flaxseed. *Canadian Journal of Animal Science*. 2005;85:413-6.
- [12] Hochi S, Kimura K, Hanada A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensitivity of in vitro-produced bovine morulae. *Theriogenology*. 1999;52:497-504.
- [13] Pereira RM, Baptista MC, Vasques MI, Horta AE, Portugal PV, Bessa RJ, et al. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). *Animal reproduction science*. 2007;98:293-301.
- [14] ALBERTS BJ, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. New York 2004.
- [15] Seidel GE, Jr. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. *Theriogenology*. 2006;65:228-35.

- [16] Zeron Y, Tomczak M, Crowe J, Arav A. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. *Cryobiology*. 2002;45:143-52.
- [17] Ferreira CR, Saraiva SA, Catharino RR, Garcia JS, Gozzo FC, Sanvido GB, et al. Single embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *Journal of lipid research*. 2010;51:1218-27.
- [18] Tata A, Sudano MJ, Santos VG, Landim-Alvarenga FD, Ferreira CR, Eberlin MN. Optimal single-embryo mass spectrometry fingerprinting. *Journal of mass spectrometry : JMS*. 2013;48:844-9.
- [19] Vansoest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for Dietary Fiber, Neutral Detergent Fiber, and Nonstarch Polysaccharides in Relation to Animal Nutrition. *J Dairy Sci*. 1991;74:3583-97.
- [20] SILVA DJQ, A. C. *Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos*. Viçosa: UFV; 2002.
- [21] Nocek JE. Insitu and Other Methods to Estimate Ruminant Protein and Energy Digestibility - a Review. *J Dairy Sci*. 1988;71:2051-69.
- [22] Council N-NR. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7 ed. Washington, D.C: National Academy Press; 2001.
- [23] Orskov ER, McDonald I. Estimation of Protein Degradability in the Rumen from Incubation Measurements Weighted According to Rate of Passage. *J Agr Sci*. 1979;92:499-503.
- [24] Webb R, Garnsworthy PC, Gong JG, Armstrong DG. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of animal science*. 2004;82 E-Suppl:E63-74.
- [25] Bilby TR, Block J, do Amaral BC, Sa Filho O, Silvestre FT, Hansen PJ, et al. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. *Journal of dairy science*. 2006;89:3891-903.
- [26] Nogueira É, Silva ASd, Amaral TB, Ítavo LCV, Dias AM, Mingoti GZ. Follicular dynamics and production of oocytes in young Nellore heifers with energetic supplementation. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2012;41:2012-7.
- [27] Childs S, Carter F, Lynch CO, Sreenan JM, Lonergan P, Hennessy AA, et al. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). *Theriogenology*. 2008;70:992-1003.
- [28] Santos JE, Cerri RL, Sartori R. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology*. 2008;69:88-97.
- [29] Marei WF, Wathes DC, Fouladi-Nashta AA. The effect of linolenic Acid on bovine oocyte maturation and development. *Biology of reproduction*. 2009;81:1064-72.
- [30] Petit HV. Digestion, milk production, milk composition, and blood composition of dairy cows fed whole flaxseed. *Journal of dairy science*. 2002;85:1482-90.
- [31] Boland MP, Lonergan P, O'Callaghan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology*. 2001;55:1323-40.

- [32] Gagliostro G, Chilliard Y. Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 4. In vivo and in vitro adipose tissue lipolytic responses. *Journal of dairy science*. 1991;74:1830-43.
- [33] David Eckersall P. Chapter 5 - Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In: Bruss JJKWHL, editor. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals (Sixth Edition)*. San Diego: Academic Press; 2008. p. 117-55.
- [34] Thomas MG, Williams GL. Metabolic hormone secretion and FSH-induced superovulatory responses of beef heifers fed dietary fat supplements containing predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. *Theriogenology*. 1996;45:451-8.
- [35] Williams GL. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. *Journal of animal science*. 1989;67:785-93.
- [36] Hawkins DE, Niswender KD, Oss GM, Moeller CL, Odde KG, Sawyer HR, et al. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. *Journal of animal science*. 1995;73:541-5.
- [37] Ryan DP, Bao B, Griffith MK, Williams GL. Metabolic and luteal sequelae to heightened dietary fat intake in undernourished, anestrus beef cows induced to ovulate. *Journal of animal science*. 1995;73:2086-93.
- [38] Mihm M, Crowe MA, Knight PG, Austin EJ. Follicle wave growth in cattle. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 2002;37:191-200.
- [39] Monniaux D, Huet C, Besnard N, Clement F, Bosc M, Pisselet C, et al. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *Journal of reproduction and fertility Supplement*. 1997;51:3-23.
- [40] Coppock CE, Wilks DL. Supplemental Fat in High-Energy Rations for Lactating Cows - Effects on Intake, Digestion, Milk-Yield, and Composition. *J Anim Sci*. 1991;69:3826-37.
- [41] Valinote AC, Nogueira JCM, Leme PR, Silva SDE, Cunha JA. Effects of feeding monensin and different sources of fat on the ruminal population of ciliate protozoa in Nellore steers. *Rev Bras Zootecn*. 2005;34:1418-23.
- [42] Kim JY, Kinoshita M, Ohnishi M, Fukui Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. *Reproduction*. 2001;122:131-8.
- [43] van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Bio*. 2008;9:112-24.
- [44] Leao BCS, Rocha-Frigoni NAS, Cabral EC, Franco MF, Ferreira CR, Eberlin MN, et al. Membrane lipid profile monitored by mass spectrometry detected differences between fresh and vitrified in vitro-produced bovine embryos. *Zygote*. 2015;23:732-41.
- [45] Silva-Santos KC, Ferreira CR, Santos GM, Eberlin MN, Siloto LS, Rosa CO, et al. MALDI-MS lipid profiles of oocytes recovered by ovum pickup from *Bos indicus* and 1/2 *indicus* x *taurus* with high vs low oocyte yields. *Reproduction in domestic animals*. 2014;49:711-8.

CAPÍTULO 3 - Considerações finais

Apesar de não ter sido observado alterações na quantidade e qualidade dos oócitos, sabe-se que em torno de 50% do óleo da linhaça passou sem ser degradado no rumen, estando disponível a nível intestinal. Observou-se também que o coeficiente de digestibilidade do EE foi maior no grupo LINH indicando que houve absorção pelo animal.

No entanto, alterações na composição lipídica dos ácidos graxos presentes na corrente sanguínea e no fluido folicular, poderiam justificar se realmente os PUFAs estariam disponíveis para os oócitos. Apesar do pouco conhecimentos dos processos de captação dos AGs pelos folículos e oócitos, sabe-se que há uma melhora na qualidade dos mesmos.

Tendo em vista que o foco deste trabalho, é alterar o perfil lipídico da membrana dos oócitos, para que haja melhor fluidez, aumentando a eficiência de troca de água pelo crioprotetor, compreender o perfil lipídico da membrana é, portanto, fundamental para compreender e superar o grande desafio da sobrevivência embrionária pós-criopreservação.