

# USO DOS COMPONENTES PRINCIPAIS NA DETERMINAÇÃO DA ORIGEM DOS ÁCIDOS GRAXOS NO LEITE DE BÚFALAS (*Bubalus bubalis* L.)<sup>1</sup>

SÉRGIO AUGUSTO DE ALBUQUERQUE FERNANDES<sup>2</sup>, WILSON ROBERTO SOARES MATTOS<sup>3</sup>, SORAIA VANESSA MATARAZZO<sup>4</sup>, MARCO ANTÔNIO SUNDFIELD GAMA<sup>5</sup>, DANTE PAZZANESE DUARTE LANNA<sup>3</sup>, LUÍS ROBERTO PIMENTEL TREVISAN<sup>3</sup>, HUMBERTO TONHATI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor realizado na ESALQ, USP. Recebido para publicação em 19/06/06. Aceito para publicação em 25/09/06.

<sup>2</sup>UESB, Pr. Primavera, 40, CEP 45700-000, Itapetinga, BA. E-mail: [fernandes@uesb.br](mailto:fernandes@uesb.br)

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, ESALQ, USP, Av. Páduas Dias, 11, Caixa postal 9, CEP 13418-000, Piracicaba, SP.

<sup>4</sup>CAPTA, Instituto de Zootecnia, APTA, SAA do Estado de São Paulo, Caixa postal 60, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP, Brasil.

<sup>5</sup>EMBRAPA Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Dom Bosco, CEP 36038-330, Juiz de Fora, MG.

<sup>6</sup>FCAV, UNESP, Via de Acesso Paulo Donato Castellane, s/nº, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP.

**RESUMO:** Este experimento objetivou verificar mudanças no perfil de ácidos graxos no leite de búfalas ao longo da lactação. Foram coletadas amostras mensais de leite de 40 búfalas, de abril a novembro de 2002, nos municípios de Sarapuí e Pilar do Sul, em São Paulo. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com 40 repetições (búfalas) em esquema de parcela subdividida com medidas repetidas no tempo, em cinco fazendas, com oito animais por fazenda. Os dados foram analisados utilizando-se o método multivariado de componentes principais (PCA). Tal análise demonstrou-se eficiente na avaliação da variação dos ácidos graxos no leite bubalino. Os componentes principais 1 e 2 explicaram 59% da variação observada nos dados. Os ácidos graxos originados pela síntese de novo agruparam-se fortemente, com exceção do C4:0. Por sua vez, os ácidos graxos de cadeia ímpares e ramificados agruparam-se, demonstrando assim, a origem microbiana comum. O aumento no teor de ácidos graxos de cadeia longa inibiu os ácidos graxos de origem microbiana. Os ácidos graxos C14:1c9 e C16:1c9 correlacionaram-se negativamente com seus precursores, C14:0 e C16:0. Os ácidos graxos que dependem da atividade da enzima  $\Delta^9$ -dessaturase correlacionaram-se positivamente. A correlação entre os ácidos vacênico e CLA (C18:2c9t11) foi alta.

Palavras-chave: ácidos graxos, componentes principais,  $\Delta^9$ -dessaturase

## USE OF PRINCIPAL COMPONENTS ANALYSIS ON MILK FATTY ACIDS PROFILE OF LACTATING BUFFALOES (*Bubalus bubalis* L.)

**ABSTRACT:** The aim of this experiment was to verify the changes in fatty acids profile during lactation period of water buffaloes. The milk samples were collected monthly from 40 animals, from April to November of 2002 in five herds located at Sarapuí and Pilar do Sul, São Paulo, Brazil. Experimental design was randomly assigned with eight buffaloes per farm in split-plot on time scheme, in five farms. Data were analyzed using a multivariate technique of principal components (PRINCOMP procedure) of SAS. The principal components analysis was an efficient technique to explain the fatty acids variation in the buffaloes milk. Principal components 1 and 2 had explained 59% of the variation observed in the data. Fatty acids originated by "de novo" synthesis been grouped stronger, excepting C4:0. Fatty acids with odd and ramified chain had been grouped, explaining their common microbial origin. The increase in level of long chain fatty acids inhibited the fatty acids of microbial origin. The fatty acids C14:1c9 and C16:1c 9 correlated negatively with its precursor, C14:0 and C16:0. The fatty acids that depend on the enzyme

$\Delta^9$ -desaturase activity correlated positively. The correlation between the vaccenic acid and CLA (C18:2 c 9 t 11) acid was higher.

Key words: fatty acid, principal components,  $\Delta^9$ -desaturase

## INTRODUÇÃO

O leite de bovídeos possui grande importância econômica e social em todo o mundo, devido, principalmente, às suas características nutritivas. No Brasil, a produção leiteira tem aumentado, inclusive com excesso de oferta no mercado interno. Entretanto, observa-se que o consumo per capita ainda é baixo, aproximadamente 120kg de leite por habitante por ano, contudo, o Ministério da Saúde recomenda que este seja de 200kg de leite por habitante por ano, o que deixa claro para as instituições do segmento leiteiro, a necessidade de ações em marketing, que associados a outros fatores de ordem política e social podem elevar o consumo (ZOCAL, 2006).

O leite é produto da secreção glândula mamária composto por gordura, proteína, açúcares, minerais e vitaminas, além da água. Possui elevada importância (fluido ou processado) na alimentação humana, sendo considerado produto de alto valor biológico, devido à sua equilibrada composição em nutrientes. Dentre estes componentes, a gordura é o mais susceptível a alterações (SUTTON, 1989).

Assim, refletir a respeito disso parece relevante. A gordura do leite de ruminantes é formada, em sua maior parte, por triglicerídeos (97-98%), os quais são compostos por três ácidos graxos ligados covalentemente à uma molécula de glicerol por pontes éster, e pequenas quantidades de esteróis, de ácidos graxos livres e de fosfolipídeos. Os triglicerídeos são sintetizados nas células epiteliais mamárias e os ácidos graxos usados para sua síntese são obtidos pré-formados da dieta ou da mobilização das reservas corporais (ácidos graxos não esterificados - AGNE e lipoproteína de muito baixa densidade - VLDL), essa fonte fornece os ácidos graxos de cadeia longa (18 ou mais átomos de carbono) e cerca de 40% do ácido palmítico. A partir de acetato e b-hidroxibutirato, originam-se os ácidos graxos de cadeia média e curta que são sintetizados na própria glândula mamária. Por sua vez, os ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada originam-se da população microbiana do rúmen e tam-

bém chegam pré-formados na glândula mamária (PALMQUIST *et al.*, 1993; DADO *et al.*, 1993; KENNELLY, 1996; CHILLIARD *et al.*, 2000; Palmquist e Mattos, 2006).

Os principais ácidos graxos saturados são o palmítico (C16:0), mirístico (C14:0) e o esteárico (C18:0), destacando-se o primeiro, como o de maior teor. Entre os insaturados destaca-se o ácido oléico (C18:1), principalmente o C18:1c9. Por sua vez, os teores de ácidos graxos poliinsaturados, em especial o conteúdo em CLA varia em função da dieta. Dietas em que haja teores elevados de precursores de CLA (ácido linoléico, C18:2c9c12 e linolênico, C18:3c9c12c15) elevam a concentração de CLA, com destaque para o isômero C18:2c9t11 (PALMQUIST *et al.*, 1993; LOCK e GARNSWORTHY, 2003; Kay *et al.*, 2004). Contudo, certos ácidos graxos são tóxicos aos microrganismos, especialmente os poliinsaturados, incluído-se entre estes os precursores de CLA, anteriormente citados (PALMQUIST e MATTOS, 2006), assim, à medida que se eleva a concentração destes na dieta, espera-se, como resultado, a diminuição da concentração dos ácidos graxos de cadeia ímpar e ramificada, oriundos dos microrganismos.

Em modelos de regressão múltipla, é comum a observação de variáveis independentes com alta correlação. Estas, por sua vez, determinam coeficientes de regressão estimados com baixa precisão. Ao analisar fato como este, torna-se vantajoso o descarte de algumas variáveis, com o intuito de aumentar os coeficientes de regressão estimados, reduzindo-se assim, a dimensionalidade dos dados (MARQUES e MARQUES, 2005). Existem diversos métodos de se efetuar esta redução, entre eles o uso de componentes principais, que é a transformação das variáveis originais em novo conjunto de variáveis não-correlacionadas. Estas novas variáveis, componentes principais, são combinações lineares das variáveis originais e derivadas em ordem decrescente em ordem de importância, em função disso a primeira componente principal é a combinação linear com variância máxima (MOITA NETO e MOITA, 1998; MARQUES e MARQUES, 2005).

Os objetivos da análise que empregam os com-

ponentes principais são reduzir o número de variáveis e analisar quais as variáveis ou conjunto de variáveis explicam a maior parte da variabilidade total (BOUROCHE e SAPORTA, 1982). Dessa forma, a proposta deste trabalho foi empregar os componentes principais para avaliar as interações entre os ácidos graxos no leite de búfalas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em cinco fazendas localizadas nos municípios de Pilar do Sul e Sarapuí, na região de Itapetininga, no Sul do Estado de São Paulo, onde a temperatura média no mês mais frio (julho) do ano de 2002 foi 16,3°C e a temperatura média do mês mais quente foi 25,3°C (CIAGRO, 2004). Foram utilizadas 40 búfalas multíparas da raça Murrah (*Bubalus bubalis* L.) ou mestiças com predominância genética da raça Murrah.

Na Tabela 1 estão apresentadas as características dos rebanhos nas fazendas avaliadas. Em todas as fazendas a dieta e a suplementação mineral eram ofertadas, ao mesmo tempo, a todos os animais, o que impossibilitou a quantificação da ingestão individual de matéria seca. Ressalta-se que apenas na Fazenda 5, havia dieta formulada para atender as exigências de búfalas em lactação.

As pastagens eram compostas por *Brachiaria decumbens*, manejadas sob pastejo contínuo, sem fertilização, com exceção da Fazenda 5, cujas pastagens eram compostas por *Brachiaria ruziziensis*, manejada sob pastejo rotacionado, sendo também fertilizadas.

Coletou-se uma amostra de leite (50mL) mensal por búfala, entre os meses de abril a novembro de 2002, compreendendo assim uma lactação. Após a colheita, estas eram resfriadas em caixa térmica com gelo ou em geladeira, até ser congelada em freezer, em intervalo máximo de uma hora, sendo em seguida estocada a menos 20°C. Estas amostras serviram para posterior extração da gordura para determinação do perfil de ácidos graxos do leite. A extração da gordura do leite para fins de análise do perfil de ácidos graxos foi realizada segundo HARA e RADIM (1978) e para a metilação dos ácidos graxos, seguiu-se à metodologia descrita por CHRISTIE (1982), adaptada por CHOUINARD *et al.* (1999).

A quantificação dos ácidos graxos do leite e dos

alimentos foi realizada através de cromatografia gasosa em equipamento Trace GC 3, com detector de chama (FID), coluna capilar SUPELCO 2-4056 SPTM - 2560, com 100m x 0,25mm de diâmetro, e espessura do filme 0,2mm. Como gás de arraste utilizou-se o hidrogênio, com fluxo de 40mL/minuto. Após a obtenção do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa, que expressa o teor de ácidos graxos, em percentagem, utilizou-se o padrão CRM-164 (Commission of the European Communities, Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium), que estabelece os valores de correção para 11 ácidos graxos encontrados, corrigindo-os.

Devido ao grande número de variáveis, utilizou-se o método multivariado de Análises de Componentes Principais (PCA), lançando-se mão do pacote computacional SAS (2004) e procedimento para análise de componentes principais PROC PRINCOMP, utilizando-se matriz de correlação.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro componente principal (CP1, eixo do "x") explica 37,4%, e o segundo componente principal (CP2, eixo do "y"), 21,6%, totalizando assim 59% da explicação da variação total nos ácidos graxos do leite de búfalas, conforme se observa na Tabela 2. Na mesma tabela se observam ainda, os auto-valores, variância e variância acumulada.

Na Figura 1 é possível visualizar a distribuição espacial dos ácidos graxos no leite de búfalas (quadrantes A, B, C e D).

Nos quadrantes A e B, encontram-se os ácidos graxos de cadeia curta e média, enquanto que os de cadeia longa situam-se nos quadrantes C e D, caracterizando, assim, correlação negativa entre eles. Essa correlação negativa também foi observada por FIEVEZ *et al.* (2003) em trabalho similar.

Os ácidos graxos C4:0; C6:0; C8:0; C10:0 e o C16:0 (quadrante A), apresentaram CP1 negativo, embora próximo de zero, e CP2 positivo. Dentre estes, os que mais se relacionaram entre si foram os C6:0; C8:0 e C10:0. Todavia, o C4:0 não está fortemente agrupado a estes ácidos graxos, mesmo sendo originado da mesma rota metabólica (síntese de novo). Este ácido graxo (C4:0) por possuir estrutura de quatro átomos de carbono origina-se via ácido

Tabela 1. Características da alimentação, ordenha e lactação dos rebanhos bubalinos nas fazendas estudadas

Item	Fazenda 1	Fazenda 2	Fazenda 3	Fazenda 4	Fazenda 5
Exploração	Confinada	Confinada	Pasto	Pasto	Pasto
Dieta (kg) <sup>1</sup>					
Volume	Silagem de milho: 35	Sil. de milho ou Capim-elefante ou cana-de-açúcar: 25	<i>Brachiaria decumbens</i> ou Cana-de-açúcar <sup>2</sup> : 30	<i>Brachiaria decumbens</i> ou Silagem de milho <sup>3</sup> : 30	<i>Brachiaria ruziziensis</i> ou silagem de <i>B. ruziziensis</i> <sup>2</sup>
Concentrada	Res. de cervejaria: 20	Res. de cervejaria: 30	Res. de cervejaria: 30	Res. de cervejaria <sup>3</sup> : 25	Fórmula <sup>4</sup>
Lactação					
DEL* no início					
das colheitas	30±10	46±15	42±14	47±13	18±9
Duração (dias)	242±39	254±28	232±51	246±45	285±45
Produção (kg)	1.930±570	2.402±418	1.513±448	1.423±360	2.955±692
Ordenha					
Número	2	2	1	1	2
Tipo	Manual	Mecânica	Mecânica	Manual	Mecânica

1: consumo estimado; 2: suplementação no período seco (julho); 3: ofertado em abril, outubro e novembro; 4: 2 kg de caroço de algodão, 2 kg de polpa cítrica, 10 kg de resíduo de cervejaria e 50 g de uréia

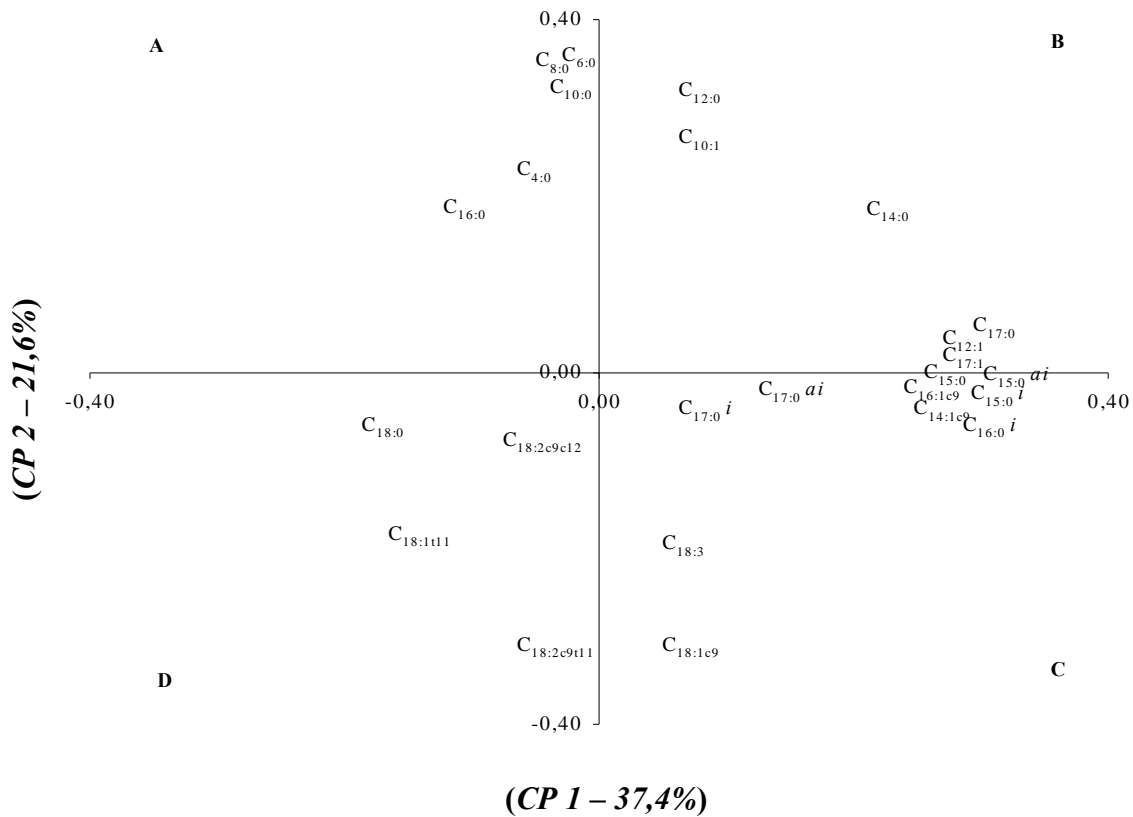
\*DEL: dias em leite

**Tabela 2. Autovalor, variância e variância acumulada de cada componente principal referentes aos ácidos graxos do leite de búfalas**

Componente principal	Autovalor	Variância	Variância acumulada
1	10,848	0,374	0,374
2	6,263	0,216	0,590
3	3,207	0,111	0,701
4	2,094	0,072	0,773
5	1,817	0,063	0,835
6	1,021	0,035	0,871

butírico (da dieta) ou através da condensação de unidades de acetil ( $\beta$ -oxidação) o que determina menor variação em seu teor no leite (PALMQUIST, 1993; Palmquist e Mattos, 2006).

Os ácidos graxos de cadeia ímpar e o C16:0 iso no componente principal 1 (CP1) apresentaram valores positivos e próximos entre si. Apenas o C17:0 iso apresentou valor próximo de zero, localizando-se mais distante do grupo. No componente principal 2 (CP2) os ácidos graxos com 15 e 17 átomos de carbono (iso e anteíso) e o C16:0 iso apresentaram valores baixos e negativos, levando-os a ocupar o quadrante B e, em maior número o quadrante C. Deste grupo de ácidos graxos apenas os com 17 átomos de carbono (C17:0 iso e C17:0 anteíso) não se agruparam fortemente, muito embora ocupem o mesmo quadrante (C) que a maioria. Os demais se localizaram muito próximos um dos outros, indicando assim, a origem microbiana comum (VAN SOEST, 1994).



*i* - iso; *ai* - anteíso

**Figura 1. Representação gráfica da relação entre os ácidos graxos no leite de búfalas empregando a análise dos componentes principais.**

O teor no leite do ácido graxo monoinsaturado C14:1c9, por não ser detectado na digesta, é o indicador indireto da atividade da enzima  $\Delta^9$ -dessorase presente na glândula mamária mais utilizado (FIEVEZ *et al.*, 2003). Outros ácidos graxos monoinsaturados, como o C16:1c9, C18:1c9 e o poliinsaturado C18:2c9t11 também têm sido utilizados como indicadores indiretos desta atividade. Os ácidos graxos C14:1c9 e C16:1c9 apresentaram CP1 positivo (quadrante C), com baixos valores negativos no CP2, levando-os a ocupar quadrantes opostos a seus precursores, C14:0 e C16:0 (quadrantes B e A), respectivamente. O C17:1 encontra-se agrupado com o C14:1c9 e C16:1c9. Dessa forma, os dados aqui apresentados corroboram a afirmativa de FIEVEZ *et al.* (2003), que mencionaram que o C17:1 possui também origem endógena, via ação da enzima  $\Delta^9$ -dessorase na glândula mamária.

O agrupamento entre o C16:0 iso, C15:0, C15:0 iso e o C15:0 anteíso demonstra forte relacionamento entre si (quadrante C), causado provavelmente pela origem comum (síntese microbiana ruminal). Observa-se também que os ácidos graxos de cadeia ímpar (Quadrantes B e C) e os ácidos graxos acima de 18 átomos de carbono (Quadrante D) possuem correlação negativa. Embora o C18:1c9 e o C18:3 estejam no mesmo quadrante que a maioria dos ácidos graxos de cadeia ímpar (C), localizam-se distantes espacialmente, implicando, assim, no fato de que dietas que provoquem elevação no teor de ácidos graxos com mais de 18 átomos de carbono no leite, reduzam o teor de ácidos graxos de cadeia ímpar, pois estas dietas, em geral, são ricas em ácidos graxos poliinsaturados que podem afetar negativamente a população microbiana do rúmen (PALMQUIST e MATTOS, 2006).

Embora não tão pronunciada quanto aos valores encontrados por FIEVEZ *et al.* (2003), a correlação negativa entre os ácidos graxos com 18 átomos de carbono e dos ácidos graxos monoinsaturados pode ser resultado da inibição parcial da atividade da

enzima  $\Delta^9$ -dessorase pelos ácidos graxos de cadeia longa, que pode ser provocada, de acordo com CHILLIARD *et al.* (2000), pela ingestão de ácidos graxos poliinsaturados, visto que o resíduo de cervejaria é rico nestes ácidos graxos (FERNANDES, 2004).

No CP1, o CLA (C18:2c9t11) apresentou valor negativo, no entanto, próximo a zero. O C18:1t11 (ácido vacênico) teve o mesmo comportamento, com valores negativos mais distantes de zero. No CP2, tanto o CLA como o ácido vacênico apresentaram valores negativos, no entanto, o CLA apresentou valor mais negativo, em função disso, ambos ocuparam o mesmo quadrante (D), porém dispersos. A correlação entre estes ácidos graxos, obtida neste trabalho, foi positiva (0,58), porém menor que a encontrada por FIEVEZ *et al.* (2003) que foi de 0,80. A possível causa dessa menor correlação entre estes dois ácidos graxos no leite pode ter sido a elevada ingestão de ácido linoléico, via resíduo de cervejaria, cujo teor médio observado foi de 48% de ácido linoléico (FERNANDES, 2004) que pode ter provocado aumento do escape do CLA produzido pelas bactérias do rúmen (rota 2, Figura 2). Isto elevaria sua absorção, com conseqüente elevação de seu teor no leite, determinando menor contribuição da via endógena na produção de CLA, corroborando os dados de KAY *et al.* (2004). Pode também ter ocorrido aumento na produção de C18:1t11 no rúmen (rota 1, Figura 2) com conseqüente aumento da síntese endógena de CLA.

Segundo FIEVEZ *et al.* (2003) o teor de CLA no leite depende mais do aporte de ácido vacênico na glândula mamária do que da atividade da  $\Delta^9$ -dessorase, ou seja, quanto mais C18:1t11 chega à glândula mamária maior será a produção de CLA no leite, obviamente, até o limite de saturação da atividade desta enzima. No entanto, é importante lembrar que segundo KAY *et al.* (2004), sob determinadas dietas, o teor de CLA no leite varia mais em função do teor de ácido linoléico na dieta do que do aporte de ácido vacênico na glândula mamária.

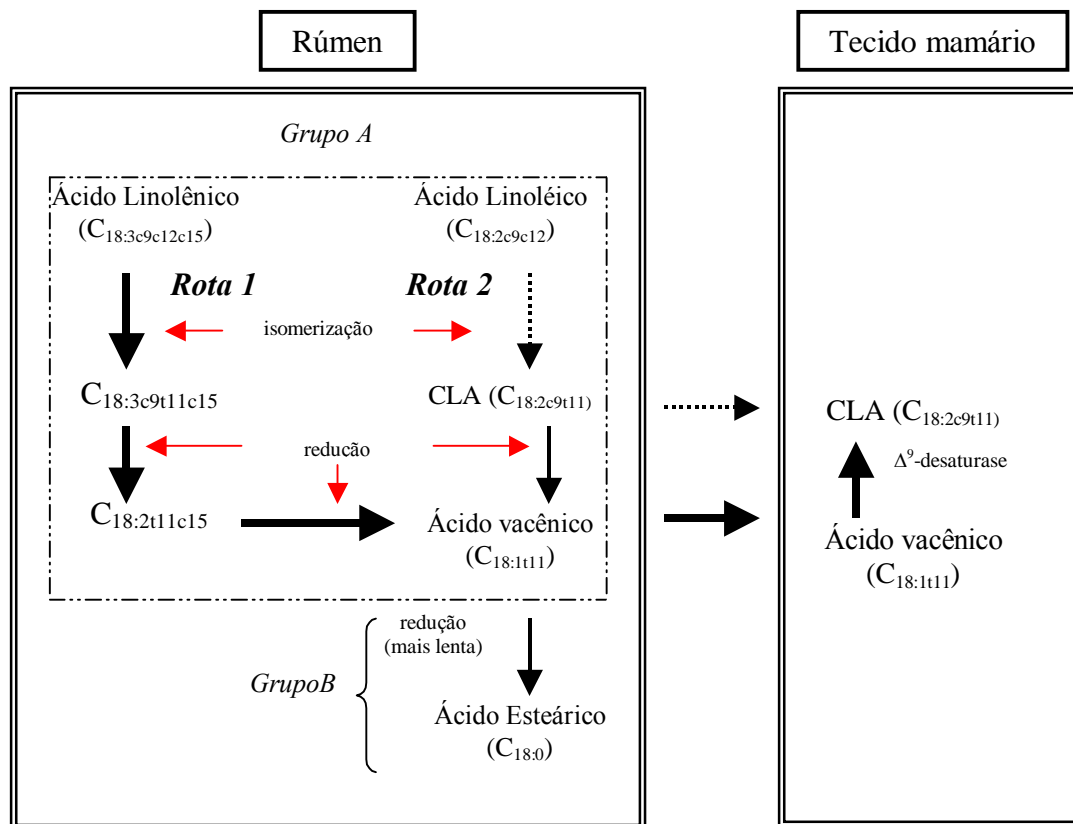


Figura 2. Representação da biohidrogenação ruminal dos ácidos linoléico e linolênico e produção de CLA no rúmen (Rota 2) e no tecido mamário (Fonte: BAUMAN, 2002; KAY *et al*, 2004; FERNANDES, 2004)

## CONCLUSÕES

Os ácidos graxos determinados no leite de búfalas possuem as mesmas características de correlações observadas no leite de bovinos, de acordo com a literatura. Dessa forma, a elevação nos teores ácidos graxos poliinsaturados na dieta afeta negativamente a microbiota ruminal.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHILLIARD Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, R. M. *et al*. Ruminant milk plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. *Annales Zootechnia*, Les Ulis, v. 49, p. 182-205, 2000.

CIAGRO. <http://ciiagro.iac.sp.gov.br>. Acesso em: 20 jan. 2004

CHOUINARD, P.Y.; CORNEAU, L.; BARBANO, D. M. Conjugated linoleic acids alter milk fatty acid composition and inhibit milk fat secretion in dairy cows. *Journal of Nutrition*, Bethesda, v.129, n. 8, p.1579-1584, 1999.

CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol ester. *Journal of Lipid Research*, Bethesda, v. 23, p. 1072. 1982.

CHRISTIE, W. W.. *Lipid analysis*. 2.ed. Oxford: Elsevier. 1982a. 207 p.

DADO, R. G.; MERTENS, D. R.; SHOOK, G. E. Metabolizable energy and absorbed protein requirements for milk component production. *Journal of Dairy Science*, Savoy, v. 76, n. 6, p. 1575-1588, 1993.

FERNANDES, S. A. de A. **Levantamento exploratório da produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite de búfalas em cinco fazendas do Estado de São**

- Paulo. 2004. 84 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- FIEVEZ V. et al. Use of principal components analysis to investigate the origin of heptadecenoic acid and conjugated linoleic acids in milk. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 86, n.1, p 1017-1053, 2003.
- HARA, A.; RADIM, N. S. Lipid extraction of tissues with low toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 90, p. 420-426, 1978.
- HOPKINS W. G. **Introduction to plant physiology**. New York: John Willey. 1995. 464 p.
- IP, C. et al. Retention of conjugated linoleic acid in the mammary gland is associated with tumor inhibition during the post-initiation phase of carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v.18, p.755-759, 1997.
- KAY, J. K. et al. Endogenous synthesis of *cis-9, trans-11* conjugated linoleic acid in dairy cows fed fresh pasture. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, n. 2, p. 369-378, 2004.
- KENNELLY, J. J. The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. **Animal Feed Science Technology**, Amsterdam, v. 60, p. 137-152, 1996.
- LOCK, A. L.; GARNSWORTHY, P. C. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and D<sup>9</sup>-desaturase activity in dairy cows. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v.79, p.47-59, 2003.
- MARQUES, J. M.; MARQUES, M. A. M. Os componentes principais no descarte de variáveis em um modelo de regressão múltipla. **Revista FAE**, v. 8, n. 1, p. 93-101, 2005.
- MOITA NETO, J. M; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.
- PALMQUIST, D. L.; BEAULIEU, A. D.; BARBANO, D. M. Feed and animal factors influencing milk fat composition. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.76, n. 6, p. 1753-1771, 1993.
- PALMQUIST, D. L.; MATTOS, W. R. S. Metabolismo de lipídeos. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A V.; OLIVEIRA, S. G. (Eds). **Nutrição de Ruminantes**. Jaboticabal: FUNEP, 2006. p. 286-310.
- SANTOS, F. L. et al. Efeito da suplementação de lipídeos na ração sobre a produção de ácido linoléico conjugado (CLA) sobre a composição de gordura no leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, n. 6, p. 1931-1938, 2001.
- SAS INSTITUTE. SAS Online. Doc/Version eight. 1997.
- <http://www.smoo.ciagri.usp.br/sasdoc/sas.html/welcome.htm>. Acesso em: 27 fev. 2004.
- SUTTON, J.D. Altering milk composition by feeding. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.72, n.10, p. 2801-2814, 1989.
- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 724 p.
- ZOCCAL, R. O leite de que o Brasil precisa. <http://www.cnpqgl.embrapa.br>. Acesso em: 08 nov. 2006.