

# Influência da nutrição animal na qualidade do leite e de produtos lácteos

---

Sérgio Raposo de Medeiros<sup>1</sup>

Marco Antônio Sundfeld da Gama<sup>2</sup>

Dante Pazzanese Lanna<sup>3</sup>

## 1. Introdução

O conceito de qualidade engloba vários aspectos e deve ser avaliado sempre com ressalvas quanto a nichos de mercado e alterações das preferências do consumidor. Com relação a produtos animais, ele acompanhou o próprio desenvolvimento científico da área e o aumento da importância da opinião dos consumidores até assumir, nos anos 90, a definição de qualidade total que, no caso do leite, deve contemplar os teores de gordura e proteína, a composição em ácidos graxos, propriedades tecnológicas, contagem de células somáticas, conteúdo microbiano e de contaminantes artificiais e naturais (Nardone e Valfré, 1999). Como veremos adiante, o terceiro milênio apresenta a perspectiva de: 1) manipular o perfil de ácidos graxos; 2) o enriquecimento ou adição de substâncias com propriedades nutracêuticas.

Geralmente, um dos fatores ligados à avaliação da qualidade costuma assumir preponderância, dependendo do interesse específico envolvido. No caso de nutrição animal, a associação mais forte com qualidade do leite é quanto aos efeitos da dieta nas proporções de seus componentes principais: gordura, proteína, lactose e sais minerais. Proporções mais ou menos definidas destes componentes são esperadas pelo mercado consumidor e, portanto, são importantes na definição de qualidade do leite. Destes componentes, recaem sobre a gordura e a proteína nossas maiores atenções. A importância da gordura pode ser verificada pela existência no mercado de tipos de leite com diferentes graduações para o seu teor. A proteína, por sua vez, é determinante para o rendimento da produção de vários produtos lácteos. A tendência atual tem sido de demanda crescente de leite e produtos lácteos (queijos, iogurtes etc.) com baixos teores de gordura. Há, portanto, um favorecimento da valorização da proteína em detrimento da gordura. No futuro, nada garante que essa tendência não seja invertida e a descoberta da ação positiva à saúde de

---

<sup>1</sup> Pesquisador da Embrapa Pantanal, Doutorando do LNCA/Esalq/USP e Bolsista da Fapesp.

<sup>2</sup> Doutorando do LNCA/Esalq/USP e Bolsista da Fapesp.

<sup>3</sup> Coordenador do LNCA/Esalq/USP.

certos ácidos graxos pode ser uma das responsáveis por isso. Portanto, ter um maior controle sobre a composição do leite é altamente desejável. Como a composição do leite afeta as exigências nutricionais dos animais, podemos, além de produzir leite com a composição mais afinada com o mercado, também melhor adaptá-lo aos recursos de dado sistema de produção. Por fim, podemos usar a nutrição para aumentar compostos naturalmente presentes no leite que tenham apelo de mercado, especialmente aqueles que sejam reconhecidos como tendo ações benéficas à saúde humana. Essa alternativa expande a alteração da qualidade do leite para algo além do normalmente esperado e tem como objetivo colocá-lo no patamar de alimento funcional (ou nutracêutico). Esta categoria de alimento promete não só nutrir, como prevenir ou combater doenças e melhorar a saúde do consumidor. Neste caso, há possibilidade de grande valorização do produto.

A nutrição também tem efeito indireto na qualidade do leite, dentre outras formas, pela sua influência na resistência dos animais às doenças e, assim, deixando-os menos sujeitos às infecções. Conseqüentemente, boas práticas de nutrição levam à obtenção de um leite com menor contagem de células somáticas e com menores possibilidades de conter resíduos de antibióticos.

O objetivo deste texto é apresentar o conhecimento atual da nutrição de vacas em lactação afetando a composição do leite e tentar mostrar as potencialidades de manipulação desta composição em benefício do produtor de leite ao consumidor. Em especial, estaremos enfocando o ácido linoléico conjugado, um ácido graxo presente no leite que, de certa forma, tem efeitos que envolvem tudo o que já foi discutido até aqui.

## 2. Nutrição e composição do leite

Gordura, proteína, lactose, sólidos totais e nitrogênio uréico do leite (MUN) são os componentes do leite rotineiramente analisados, mas apenas gordura e MUN têm variações mais significativas. Os teores de proteína e lactose variam muito pouco, basicamente por estarem sujeitos à regulação endócrina e, principalmente no caso da lactose, por ser o principal agente osmótico envolvido na secreção do leite. A proteína, por exemplo, normalmente se altera em 0,1-0,2 unidades percentuais (Hinders, 1997), enquanto a lactose é ainda mais difícil de ser alterada (Kennely et al., 1999).

A gordura, apesar de poder variar até três unidades percentuais (Sutton, 1989), tem como faixa mais usual, em vacas holandesas, valores de 2,2 e 4,0% (Block, 2000). Valores de gordura elevados estão, em geral, ligados à baixa produção. Já situações que levam à depressão da gordura do leite (DGL) ocorrem basicamente por: (1) erros grosseiros de formulação, monitoramento precário dos alimentos e do manejo de alimentação ou (2) existência de alimentos contendo substâncias inibidoras da lipogênese na Glândula Mamária, como o C18:2 t10, c12, o ácido estercúlico e o ácido metilmalônico (Griinari et al., 1997 a). Neste último caso, por serem substâncias específicas, acabam não

tendo nenhuma relação com a composição bromatológica do alimento em termos de formulação convencional (i.e. nível de ADF, proteína degradável etc.). A baixa relação entre composição da dieta e composição do leite é bastante conhecida. Lyatuu & Eastridge (1999) examinaram 25% dos animais de 12 rebanhos de vacas holandesas em Ohio para composição do leite, PUN (nitrogênio uréico do plasma) e MUN, demonstrando o grande desafio que é controlar a composição do leite por meio da composição da dieta. Os teores de proteína do leite foram explicados em 58% de sua variação pela interação da ingestão de NDF e de carboidratos não-estruturais. Os valores para as ingestões e teores de PB, NDF, ácidos graxos e de carboidratos não-estruturais não conseguiram explicar mais que 36% e 32% da variação, esses valores sendo, respectivamente, para ingestão e teor de PB.

Os efeitos da nutrição na composição leite não são mediados somente por interações entre o alimento e a fisiologia digestiva dos animais. Por exemplo, Cant et al. (1999) mostram que a noção de que a relação proteína : gordura : lactose do leite refletiria a relação sangüínea de aminoácidos : ácidos graxos : glucose surgiu de ensaios de curta duração com infusão destes na artéria exterior ilíaca, mas, outros estudos, com esta mesma técnica, mostram que um desequilíbrio entre aminoácidos causa alteração na relação gordura : lactose e não, como seria mais fácil acreditar, nas relações com proteína. Isto se deve a um controle interno da própria glândula mamária, que é capaz de induzir alterações em termos de disponibilidade de nutrientes. A explicação para o aumento da relação citada acima seria um maior fluxo sangüíneo para a glândula mamária para compensar o desequilíbrio de aminoácidos, com conseqüente maior disponibilidade de gordura e/ou precursores de gordura, o que explicaria o aumento de gordura em resposta ao desequilíbrio na nutrição protéica (Tabela 1).

Tabela 1. Produção e composição do leite de metade do úbere infundido com diferentes nutrientes na artéria ilíaca externa por dez horas.

| Tratamento                      | Leite (g/h)       | Proteína (%)       | Gordura (%)        | Lactose (%) |
|---------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|-------------|
| Salina                          | 568 <sup>a</sup>  | 3,09 <sup>a</sup>  | 4,07 <sup>a</sup>  | 4,64        |
| 15 g/h Aa caseína               | 645 <sup>b</sup>  | 3,20 <sup>ab</sup> | 3,72 <sup>ab</sup> | 4,62        |
| 15 g/h Todos Aa menos histidina | 619 <sup>ab</sup> | 3,21 <sup>ab</sup> | 3,90 <sup>a</sup>  | 4,62        |
| 30 g/h Aa caseína               | 601 <sup>ab</sup> | 3,30 <sup>a</sup>  | 3,37 <sup>b</sup>  | 4,70        |
| 15 g/h Todos Aa menos histidina | 578 <sup>a</sup>  | 3,14 <sup>a</sup>  | 3,98 <sup>a</sup>  | 4,73        |

Médias na mesma coluna com diferentes letras são significativamente diferentes (P < 0,10). Adaptado de Cant et al. (1999).

Há ainda um outro complicador para prever a composição do leite pela dieta: fatores não-nutricionais podem interferir na composição de leite. Entre esses fatores não-nutricionais que alteram a composição do leite, podemos citar: genética (Raça), ambiente (inclui estação do ano), idade (ou número de lactação), estágio da lactação e sanidade.

## 2.1 Alteração do teor de gordura do leite

A gordura do leite é o componente mais sensível a alterações por manipulação da dieta dos animais (Kennely et al., 1999). Há situações que levam à queda acentuada da gordura, fenômeno conhecido como síndrome do leite com baixa gordura ou depressão na gordura do leite (DGL). O abaixamento do teor de gordura pode ser, ou não, um grande problema econômico para o produtor. Quedas no preço do leite podem, eventualmente, ser compensadas pela menor exigência energética de animais produzindo leite com menos gordura. Isso é um fato no Brasil, em que o pagamento do leite visa, quase que exclusivamente o volume (ou peso) do leite produzido, apesar de existirem propostas para pagamento baseado nos teores dos sólidos. Entretanto, como a DGL, na maioria das vezes, é causada por problemas nutricionais, estando ligada à acidose subclínica e, dessa forma, há problemas de sanidade (diarréias, laminite, deslocamento de abomaso), a síndrome da DGL é, normalmente, um indicador de problema na exploração leiteira, levando prejuízos ao produtor. Faz-se necessário, portanto, conhecer os fatores causadores da DGL, e buscar formas de manipulá-los sem que haja prejuízo da função ruminal e da saúde do animal como um todo.

## 2.2 Fatores nutricionais que causam a depressão na gordura do leite (DGL)

A formulação da dieta e o manejo alimentar da propriedade podem resultar em variáveis níveis de depressão na gordura do leite (Sutton, 1989; Van Soest, 1994). Os principais fatores seriam: relação concentrado : volumoso; efetividade da fibra; ionóforos e gorduras ativas no rúmen (especialmente gorduras poliinsaturadas). Tipicamente, a DGL ocorre poucos dias após mudanças na dieta e pode levar à redução de 50% ou mais do teor de gordura do leite, podendo não haver nenhum prejuízo para volume ou alterações nos outros constituintes.

O uso de dietas com elevado teor de concentrado (especialmente se rico em carboidratos prontamente fermentescíveis) e a falta de fibra efetiva resultam em abaixamento do pH do rúmen, seja pela elevada taxa de fermentação e elevada produção dos AGV, seja pelo menor estímulo à ruminação. Nesta situação há uma maior produção de ácido propiônico, que, para muitos, seria o intermediário causador da DGL, por meio de incremento da secreção de insulina. O ácido propiônico (C3), e seu efeito insulinêmico, foi implicado também como ação dos ionóforos em seu efeito na DGL. Já as gorduras ativas no rúmen se encaixariam na hipótese da ação inibitória direta sobre a síntese de gordura.

É importante ressaltar que os fatores que induzem a DGL não são mutuamente excludentes. Assim, podemos ter uma dieta com baixa relação volumoso : concentrado, níveis insuficientes de fibra efetiva, com inclusão de ionóforos e de gorduras ativas no rúmen que, teoricamente, seria altamente predisponente a problemas de DGL (e outros problemas). Poderíamos ter, ainda, qualquer combinação entre eles e, portanto, variáveis graus de DGL. Christie

(1981) ainda cita a magnitude do efeito da DGL como sendo variável em função do estágio de lactação e da condição física do animal. Com relação ao manejo da alimentação, o aumento de frequência de fornecimento, o uso de ração total e a garantia de bom espaço de cocho para os animais (70-80 cm lineares/cab.) ajudam a evitar a DGL. O estresse térmico contribui direta e indiretamente para a DGL. A discussão sobre as teorias para explicar a DGL ajudará no entendimento da importância dos efeitos de cada um dos fatores predisponentes.

## 2.3 Teorias para explicar a DGL

Ao longo do tempo, foram propostas algumas teorias para explicar a depressão do teor da gordura do leite. A primeira hipótese para a DGL (Boussingault, 1845, citado por Van Soest, 1994) simplesmente a explicava pela falta de gordura na dieta. Esse pesquisador usou uma dieta baseada em beterraba, portanto com baixo teor de fibra efetiva. Naquela época, sem ter conhecimento de que os açúcares dietéticos podem (e geralmente são) precursores de gordura (ainda que de maneira indireta em ruminantes), o autor acabou concluindo errado.

A baixa produção de acetato (C2) foi a segunda tentativa de explicar, teoricamente, a DGL. Os postulantes desta teoria assumiram, erradamente, que a proporção molar representava bem as quantidades efetivas de AGVs produzidos, e isso não necessariamente acontece. No caso da DGL, por exemplo, a menor proporção molar de C2 é fruto de uma maior proporção de propiônico (C3) e, na verdade, a produção total de C2 entre a vaca com valor normal de teor de gordura era a mesma que a da vaca com DGL.

A hipótese mais disseminada para explicar a DGL é a teoria glucogênica-insulínica, em que o aumento de insulina circulante resultaria em redução de precursores para a síntese de gordura na glândula mamária. Ela foi proposta inicialmente por McClymont & Vallance (1962). Segundo esta teoria, haveria um aumento da relação molar C3 : C2, que resultaria em estímulo para elevar o teor de insulina (pela maior concentração de glucose proveniente da gluconeogênese a partir do C3 e/ou da glucose absorvida no trato posterior). Por ação da insulina, haveria uma diminuição da lipólise ou aumento da lipogênese no tecido adiposo, reduzindo a disponibilidade de precursores (C2 e C4) para a síntese de gordura na glândula mamária (que não é responsiva à insulina). Trabalhos recentes têm demonstrado uma redução modesta do teor de gordura do leite por ação da insulina, sendo que esta se dá principalmente por uma inibição da lipólise, uma vez que a análise do perfil de gordura do leite revelou uma redução na proporção dos ácidos graxos de cadeia longa (Lemosquet et al., 1997, e Hutaud et al., 1998). Os ácidos graxos de cadeia longa são, na sua maioria, provenientes da mobilização das reservas corporais.

Entretanto, diversos estudos não observaram DGL quando os níveis de insulina circulante foram cronicamente elevados (quatro a cinco vezes acima dos níveis normais) pela infusão de insulina, mantendo-se a glicemia dentro dos níveis normais por infusões controladas de glucose (Mcguire, 1995, Griinari et

al., 1997). Estes resultados colocaram em dúvida a validade da teoria insulino-glicogênica. Ganhou força, então, uma antiga hipótese de que a DGL seria causada por inibição direta da síntese de gordura na glândula mamária por ação de alguma substância produzida no rúmen sob condições de incompleta bioidrogenação dos ácidos graxos poliinsaturados presentes na dieta. Durante o processo de bioidrogenação de lipídios insaturados, ácidos graxos com ligações duplas do tipo "trans" são formados por ação de isomerases produzidas pelos microorganismos, e estudos iniciais demonstraram que ácidos graxos monoinsaturados contendo tais ligações (C18 :1 trans) estavam envolvidas na DGL (Davis & Brown, 1970; Pennington & Davis, 1975; Astrup et al., 1976; Selner & Schultz, 1980). Posteriormente, Wonsil et al. (1994) confirmaram a correlação entre DGL e trans 18 : 1 pela medição da quantidade de trans 18 : 1 que escapava do rúmen em animais recebendo dietas contendo lipídios insaturados.

Griinari et al. (1997) especulavam ser necessárias duas condições para a produção de ácidos graxos trans-18 : 1 no rúmen: 1) Presença do substrato no rúmen, que seriam os ácidos graxos insaturados, e 2) Uma alteração no processo de fermentação ruminal que levasse à bioidrogenação incompleta destes ácidos graxos. Griinari et al. (1998) observaram ainda que o grau de DGL variou em relação à proporção dos diferentes isômeros trans de ácidos octadecadienóicos que existam na gordura do leite. Na dieta onde houve maior DGL (baixa fibra e fornecimento de lipídios insaturados), a análise do perfil da gordura do leite revelou um aumento significativo no teor dos ácidos graxos com ligações duplas do tipo "trans" na posição 10 da cadeia carbônica, indicando que não somente o tipo de ligação, mas também a posição em que ela se encontra na molécula, seriam determinantes para a ocorrência de DGL. Kelly et al. (1998) estudando outras situações dietéticas que causam DGL, compararam a suplementação com óleos de amendoim, girassol e linho. Todos resultaram em DGL em relação ao pré-tratamento, mas não houve diferenças entre as várias fontes de óleo (média de 2,2% de gordura). Essas diminuições foram claramente marcadas pelo aumento no isômero trans-10, consistente com os resultados obtidos por Griinari et al. (1997). Experimentos recentes têm estudado o efeito da infusão abomasal, ou da administração oral, de uma mistura de ácidos graxos contendo os chamados ácidos linolêicos conjugados (CLA), os quais são uma série de isômeros do ácido linolêico.

Chouinard et al. (1998) obtiveram uma dramática redução no teor de gordura do leite (Figura 1) de vacas em lactação pela infusão abomasal (0, 50, 100 e 150 g/d) de uma mistura comercial de ácidos graxos contendo aproximadamente 60% de CLA, com predominância dos isômeros cis9, tras11 e trans10, cis12.

A DGL foi maximizada já com a menor dose, ficando o leite com 1,4% de gordura (Controle: 2,81%).

De forma geral, parece que a redução na síntese "de novo" de ácidos graxos na glândula mamária por ação direta dos ácidos graxos trans-10 explica grande parte da DGL, embora outra parte deste efeito possa ser explicada pela redução no aporte de ácidos graxos pré-formados oriundos da mobilização das

reservas lipídicas (efeito da insulina). Embora estes mecanismos possam ser didaticamente separados, em situações práticas onde são verificadas DGL é provável que ambos os efeitos atuem em conjunto.

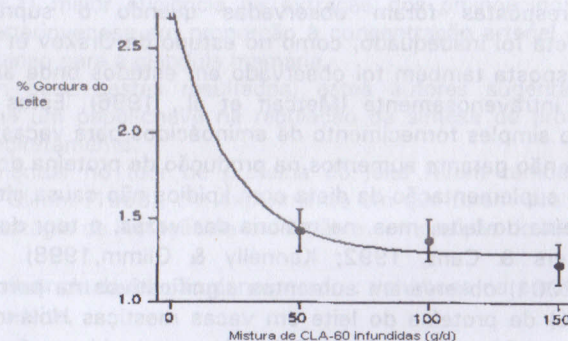


Figura 1. Efeito da infusão abomasal de CLA na porcentagem de gordura do leite.

Fonte: Chouinard et al. (1998).

## 2.4 Alteração no teor de proteína do leite

A proteína do leite é importante tanto no aspecto econômico, como nutricional (Mackle & Bauman, 1998). Neste sentido, grandes esforços têm sido feitos para tentar manipular a secreção de proteína do leite por meio da nutrição. Entretanto, ao contrário da gordura, este componente do leite tem se mostrado muito menos sensível à manipulação da dieta. Kennely et al. (1999) argumentam que a falta de conhecimento de como a proteína da dieta influencia sua secreção no leite é o grande gargalo para formular dietas biologicamente eficientes e, dessa forma, econômicas.

De acordo com Mackle & Bauman (1998), o suprimento e composição de aminoácidos disponíveis para a glândula mamária são determinados pela quantidade e composição de aminoácidos absorvidos no trato digestivo e pela utilização de aminoácidos pelos tecidos do corpo. Entretanto, estes autores destacam que poucos trabalhos têm como foco as exigências de aminoácidos do intestino e a relação destas exigências com o que de fato será transferido para a corrente sanguínea e, também, a regulação da utilização pós-absortiva destes aminoácidos pela vaca. Em contraste, muitas pesquisas têm estudado o efeito do suprimento de aminoácidos (AA) livres ou de caseína sobre a secreção de proteína do leite.

Rulquin et al. (1995) revisaram 121 estudos e examinaram os efeitos do suprimento pós-ruminal de metionina e lisina sobre a produção e concentração da proteína do leite. Somente modestos aumentos foram observados (29 g/d e 0,11%, respectivamente). Outros estudos têm avaliado a produção de proteína do leite em resposta à infusão pós-ruminal de caseína. Respostas médias de +

91g/d (0-250 g/d) foram observadas em 36 estudos (Mackle & Bauman, 1998). Estes autores demonstraram ainda uma ausência de correlação entre o aumento de produção de proteína e as diferentes doses de caseína infundidas. Além disso, maiores respostas foram observadas quando o suprimento de aminoácidos da dieta foi inadequado, como no estudo de Orskov et al. (1977). Este padrão de resposta também foi observado em estudos onde aminoácidos foram infundidos intravenosamente (Metcalf et al., 1996). Estes resultados demonstram que o simples fornecimento de aminoácidos para vacas recebendo adequada nutrição não garante aumentos na produção de proteína do leite.

Em geral, a suplementação da dieta com lipídios não causa alterações na produção de proteína do leite, mas, na maioria das vezes, o teor de proteína é reduzido (De Peters & Cant, 1992; Kennelly & Glimm, 1998). Entretanto, Medeiros et al. (2001) observaram aumentos significativos na percentagem e produção (+ 13%) de proteína do leite em vacas mestiças Holandês x Zebu suplementadas com 150 g/dia de CLA-60 (gordura protegida na forma de sais de cálcio contendo 60% de CLA) por um longo período em condições de pastejo, indicando um possível papel do CLA na regulação da secreção de proteína do leite.

Resultados recentes (Griinari et al., 1997; Mackle et al., 1998) indicam que o sistema endócrino exerce um efeito regulatório sobre a produção de proteína do leite. Nestes experimentos, os animais foram submetidos a uma concentração de insulina plasmática quatro a cinco vezes superior à concentração normal, mantendo-se a glicemia dentro dos valores normais por infusão contínua de glicose. O tratamento com insulina promoveu aumentos significativos no teor e na produção de proteína do leite de vacas Holandesas recebendo dieta adequada em proteína e energia (Tabela 2).

Tabela 2. Ingestão de MS, produção de leite, teor de proteína do leite e produção de proteína em vacas recebendo infusão intravenosa de insulina (I), com ou sem infusão abomasal de caseína (C) + aminoácidos de cadeia ramificada (AA).

| Variável                     | Tratamentos |        |          |            | Efeito da insulina (P) <sup>1</sup> |
|------------------------------|-------------|--------|----------|------------|-------------------------------------|
|                              | Água        | C + AA | Água + I | C + AA + I |                                     |
| IMS (kg/d)                   | 26,2        | 27,6   | 25,1     | 25,2       | 0,08                                |
| Produção de leite (kg/dia)   | 26,5        | 27,5   | 28,3     | 29,8       | 0,05                                |
| % Proteína                   | 3,29        | 3,31   | 3,52     | 3,66       | 0,01                                |
| Produção de proteína (g/dia) | 867         | 895    | 995      | 1.080      | 0,001                               |

<sup>1</sup> Somente são apresentadas as probabilidades para os efeitos da insulina, pois os efeitos da infusão abomasal de C + AA e sua interação com a insulina não foram significativos (P > 0,1).

Fonte: Mackle et al. (1998).

Mackle e Bauman (1998) ressaltam ainda que, embora a concentração arterial de aminoácidos essenciais (AAE) tenha sido menor no tratamento com insulina, os aumentos na secreção de proteína em resposta à insulina foram devidos à: 1) maior eficiência na extração dos aminoácidos (medida como a diferença arteriovenosa em proporção à concentração arterial de AAE e 2) maior fluxo sanguíneo para a glândula mamária.

Com base nestes resultados, estes autores sugeriram que a insulina desempenha um papel-chave na regulação da síntese de proteína do leite, seja direta ou indiretamente.

Aumentos no teor de proteína do leite foram também observados por Kennelly & Glimm (1998), em experimento em que foram avaliados os efeitos da dieta e do estágio de lactação na produção e composição do leite (Tabela 3).

Tabela 3. Influência da relação concentrado : volumoso na produção e composição do leite.

|                            | Início de lactação |                   | Final de lactação |                   |
|----------------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
|                            | 50:50              | 75:25             | 50:50             | 75:25             |
| Produção de leite (kg/dia) | 32,9               | 30,5              | 21,9              | 24,3              |
| Leite (4% gordura)         | 27,1               | 23,1              | 22,2              | 20,6              |
| Gordura (%)                | 2,84               | 2,37              | 4,21 <sup>a</sup> | 2,91 <sup>b</sup> |
| Proteína (%)               | 3,08 <sup>a</sup>  | 3,34 <sup>b</sup> | 3,37              | 3,49              |
| Lactose (%)                | 4,79               | 4,69              | 4,59              | 4,71              |
| Relação proteína/gordura   | 1,09 <sup>a</sup>  | 1,45 <sup>b</sup> | 0,81 <sup>a</sup> | 1,22 <sup>b</sup> |

Médias na mesma linha, dentro do estágio de lactação, com diferentes letras, são significativamente diferentes (P < 0,05).

Os resultados acima mostram que a dieta com teor elevado de concentrados reduziu o teor de gordura do leite, independentemente do estágio de lactação. O teor de proteína foi maior nas dietas com gordura deprimida (i.e. 75% de concentrado), mas apenas no início da lactação a diferença foi estatisticamente significativa. Neste caso, entretanto, a produção de leite foi 2,4 kg/dia menor que a do tratamento 50:50. Demonstra-se, mais uma vez, como a manipulação dietética da composição do leite é inconsistente, com as alterações em gordura, proteína e produção de leite ocorrendo não necessariamente de forma coordenada.

Block (2000) chama a atenção para o fato de que aumentos na proteína total podem ocorrer devido às práticas nutricionais que aumentam o teor de nitrogênio não-protéico (NNP) e, neste caso, não trazem nenhum benefício em rendimento industrial que dependeria basicamente do aumento de caseína. Como essas práticas nutricionais que aumentam NNP no leite são basicamente excesso de ingestão de proteína na dieta e/ou a inadequação desta com o nível energético, normalmente valores normais de NNP no leite são obtidos com dietas bem elaboradas. A preocupação para adequar bem esses aspectos da nutrição protéica é reforçada pelo fato de que níveis elevados de uréia no plasma estão associados com índices reprodutivos mais baixos (Buttler et al., 1996).

### 3. O ácido linoléico conjugado (CLA) e a composição do leite

O ácido linoléico conjugado (CLA) não é, na verdade, uma molécula única, mas um conjunto de isômeros de posição e geométricos do ácido linoléico. O que lhes dá a característica de conjugado é uma configuração molecular rara na natureza, que é a ausência do C metilênico entre as duas duplas ligações. Assim, as duplas-ligações são separadas apenas por uma ligação saturada entre carbonos, conforme pode ser observado na Figura 2.

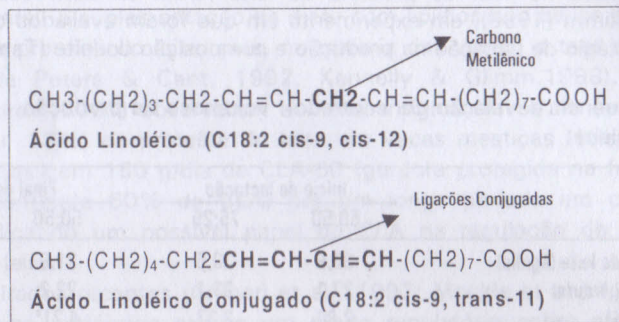


Figura 2. Fórmulas moleculares do ácido linoléico e do ácido linoléico conjugado.

Há 56 possíveis isômeros geométricos e de posição do CLA (Yurawecz et al., 2001). Um Isômero de CLA é um potente anticarcinogênico natural (IP et al., 1991; IP et al., 1994;) enquanto outro é um agente repartidor de nutrientes muito efetivo (Mcguire et al., 1997; Park et al., 1997; Dunshea et al., 1998). Estudos usando diferentes modelos animais relacionaram o CLA a vários outros efeitos positivos que poderiam favorecer a saúde humana, como veremos em maiores detalhes no item 4.

Os efeitos do CLA (C 18:2 trans-10, cis-12) em gado de leite são apresentados abaixo:

- ♦ Reduz a síntese *de novo* de ácidos graxos na glândula mamária
- ♦ A redução na síntese de ácidos graxos faz com que ocorra diminuição no teor da gordura do leite; entretanto, este efeito é dependente do estágio de lactação. Tem-se observado que a resposta a essa molécula em animais em início de lactação é praticamente inexistente. Isso ocorre em função do animal estar em balanço negativo e, assim, mobilizando muitos ácidos graxos de cadeia longa, o que faz com que a redução da síntese *de novo* praticamente não afete o teor de gordura do leite.
- ♦ Com a redução da produção de gordura do leite, o animal tem reduzidas suas exigências de energia líquida por unidade de leite produzido, o que poderia resultar em uma redução no consumo de MS. Entretanto, nos

poucos experimentos em que o CLA foi fornecido às vacas por um longo período, não foi observada redução na ingestão de alimentos, conforme mostram os dados de IMS de Giesey et al. (1999) e as estimativas de consumo de Medeiros et al. (no prelo), mas sim uma maior produção de leite.

- ♦ Nos dois experimentos citados acima, houve aumento no teor e produção de proteína total do leite. Foi confirmado que o aumento de proteína de Medeiros et al. (2000) não foi devido ao aumento da porcentagem de MUN no leite dos animais tratados com CLA, indicando que o aumento no teor de proteína deve ter se dado por aumento de proteína verdadeira (Fernandes et al., 2000).

#### 3.1 Modo de ação do ácido linoléico conjugado (CLA)

O modo de ação do CLA se dá por uma inibição da síntese "de novo" de ácidos graxos na glândula mamária, uma vez que a análise do perfil de gordura do leite mostrou uma redução na concentração de ácidos graxos de cadeias curta e média, os quais são oriundos desta via metabólica (Lor & Herbein, 1998; Bauman & Griinari, 1999). Posteriormente, Baumgard et al. (2000) demonstrou claramente que o isômero trans-10, cis-12 de CLA é o responsável pela inibição da síntese de gordura na glândula mamária. Este composto também é responsável pelo crescimento magro de rato (Park et al., 1999).

A atividade das principais enzimas na regulação da lipogênese na glândula mamária, acetil-CoA carboxilase (ACC) e sintetase de ácido graxo (FAS) em cultura de tecidos de biópsias da glândula mamária, foi avaliada por Piperova et al. (2000). Esses autores, usando dietas que maximizavam a concentração de ácidos graxos (15,6% da gordura do leite), encontraram reduções de atividade de 61% e 44% para ACC e FAS nos tecidos de animais com depressão na gordura do leite, cujo principal causador, muito provavelmente, foi o CLA. A abundância do mRNA da ACC teve redução de 78% para o tratamento com CLA (A abundância da FAS não foi medida). Isso indica que a menor atividade pode ser devido à redução da quantidade da enzima, mas não esclarece se há uma menor transcrição ou na maior degradação dos mRNA.

Xu et al. (2001) reportaram dados que mostram a inibição da transcrição de genes lipogênicos através de ácidos graxos poliinsaturados a um bloqueamento da indução da SREBP-1 (sterol regulatory element binding protein-1), com dados mostrando que esse efeito seria na degradação do mRNA desta proteína reguladora. O trabalho foi feito com o ácido araquidônico (C 20:4 n-6) e o EPA (C 20:5 n-3), mas pode envolver outros ácidos graxos poliinsaturados, incluindo o CLA. Tsuboyama et al. (2000) determinaram grande efeito do CLA na abundância do RNAm da SREBP-1 em camundongos, reduzindo-a quase à metade.

#### 4. Alteração do perfil de ácidos graxos por meio da nutrição

É possível, pela dieta, alterar o perfil de ácidos graxos do leite (Sauer, 1998; Kennely, 1996). Para aumentar a relação de ácidos graxos insaturados : saturados no leite, teríamos que conseguir proteger eficientemente os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) da biohidrogenação ruminal. Com relação à proteção, a saponificação dos ácidos graxos com sais de cálcio tem sido a maneira mais comum de proteção e funciona bastante satisfatoriamente com óleo de palma, com menos de 1% de dissociação em pH 6,5, e chegando a menos de 10% em pH 5,5 *in vitro*, baseado no pKa das fontes e calculada pela equação de Hendersom-Haselbach (Sukhija & Palmquist, 1990). Neste mesmo trabalho, o sal de cálcio produzido com óleo de soja apresentou valores de 80% de dissociação, resultado este em função do menor pKa dos ácidos graxos insaturados. Pela determinação da concentração de cálcio no fluido ruminal, esse comportamento foi confirmado por esses autores. Portanto, devemos considerar essa diferença quando quisermos usar esse tipo de proteção. Uma maneira de tentar fazer os ácidos graxos serem menos expostos à biohidrogenação no rúmen, seria por intermédio da própria proteção pela planta (ou parte da planta) que os contém (Chilliard et al., 2000). Uma relação que ajuda no enriquecimento de AGPI é que há uma redução na taxa de biohidrogenação com o aumento na concentração de ácidos graxos na dieta (Beam et al., 2000).

A alteração do perfil em ácidos graxos do leite, todavia, não é tão direta assim. Há duas ocorrências interessantes na própria absorção intestinal. Uma delas é a que faz com que os ácidos graxos saturados sejam preferencialmente resintetizados a triglicérides, em oposição aos poliinsaturados que seriam preferencialmente incorporados em fosfolipídios da membrana do intestino. Isso seria parte de um mecanismo para conservar os poliinsaturados para funções específicas. É necessário, portanto, sobrecarregar esse mecanismo de segregação para obter o enriquecimento do perfil de ácidos graxos insaturados (Christie, 1981). Por outro lado, apesar do ácido esteárico ser o preferencialmente absorvido, há nos enterócitos atividade da esteroil Co-A desaturase, e portanto há alguma conversão deste a ácido oléico (18:1 c9) antes da esterificação e o empacotamento em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) e quilomícrons (Clegg et al., 2001). A atividade da dessaturase parece ser ainda maior na glândula mamária (ver item 4.1). Essas dessaturases, junto com a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), a ausência de elongases e a esterificação preferencial de AGCC e oléico na posição sn-3 do glicerol, são estratégias dos ruminantes para baixar o ponto de fusão e garantir uma melhor fluidez dos lipídios do leite, uma vez que ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) são preferencialmente absorvidos (Chilliard et al., 2000). A alteração no perfil de ácidos graxos altera importantes características físicas do leite. O aumento dos poliinsaturados, apesar de,

supostamente, trazer benefícios em termos nutricionais ao consumidor, por outro lado pode trazer uma maior suscetibilidade do leite em ser oxidado e, portanto, perder qualidade em termos de sabor e tempo de prateleira. De fato, Timmons et al. (2001) obtiveram resultados que comprovam isso e mostra que o teor de cobre do leite pode facilitar a oxidação. Isso ilustra como é difícil fazer alterações que sejam vantajosas em todos os aspectos.

#### 4.1 Ácido linoléico conjugado (CLA) e o leite como nutracêutico

Um dos mercados mais promissores do agronegócio é o de alimentos funcionais, também chamados de "nutracêuticos". Tais alimentos caracterizam-se por, além de nutrir, possuírem substâncias que ajudariam a manter ou recuperar a saúde do consumidor. Além dos efeitos principais do CLA, antineoplasias, principalmente por meio do c9,t11, e antiobesidade, por conta do t10,c12, há referência a vários outros efeitos benéficos à saúde: menor aterogênese, redução do teor de colesterol, prevenção e tratamento da *diabetes mellitus* não-dependente da insulina e efeitos imunestimulatórios (Sébédo et al., 1999, Williams et al., 2000). Para a maioria destes efeitos, há estudos com modelos animais e culturas de tecidos, mas também dados epidemiológicos e os primeiros resultados em humanos parecem comprovar os efeitos benéficos do CLA. Algo que parece claro é que, nos casos relacionados acima, há efeito de ambos os isômeros citados, havendo evidências científicas de que ações tão diversas só podem ser explicadas por ações destes dois isômeros principais, eventualmente outros e das interações entre eles e outros compostos (Ip et al., 2001, Pariza et al., 2001).

Há, portanto, a idéia de "enriquecer" o leite com CLA, para conferir a ele a desejada qualidade de "nutracêutico". Além disso, o uso do CLA em dietas para vacas em lactação permite alterar a composição do leite, com redução de gordura e aumento de proteína (Medeiros et al., 2000), o que é percebido pelo consumidor como uma composição mais saudável, sem contar ser mais afinada com a preocupação com a estética e a obesidade.

O CLA é principalmente encontrado em tecidos animais e em teores mais elevados naqueles com intensa fermentação no trato gastrointestinal. Isso se explica porque a produção do CLA ocorrer em boa parte, por meio da biohidrogenação parcial do ácido linoléico. Assim, alimentos de origem de ruminantes são aqueles com os maiores teores de CLA, com o leite sendo a principal fonte. A maior parte do CLA da gordura do leite é c9,t11 (>80% do CLA), proveniente, principalmente, da ação da Delta 9-desaturase da glândula mamária sobre o C18:1 t-11 (ácido vacênico), conforme demonstrado por Corl et al. (2000). Devido a essa prevalência natural em produtos de ruminantes, Kramer et al. (1998) propuseram denominar esse isômero (c9,t11) ácido rumênico.

Teores médios de CLA no leite ficam entre 2 mg a mais de 20 mg/g de gordura. Essa grande diferença reflete-se pelas diferentes quantidades de ácido linoléico e linolênico das dietas e dos vários fatores que podem afetar a biohidrogenação dos AG (AG) poliinsaturados no rúmen. A grande variação

indica, também, que há boas possibilidades de manipulação do teor de CLA no leite, apesar de a grande variação individual entre os animais constituir um desafio a ser superado para obtermos aumentos consistentes em todo o rebanho.

No Brasil, Medeiros et al., (2001) determinaram os teores médios de ácido rumênico em vacas lactantes (Holandês x Gir) em pastejo suplementadas com concentrados em duas épocas (águas x seca). Foram obtidos valores desde 1,7 mg/g gordura a 19,5 mg/g gordura. Os dados podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Valores de ácido rumênico (CLA c9,t11) obtidos no leite do Estado de São Paulo em sistemas de produção a pasto e concentrados de duas raças (Holandesa e Gir) e duas épocas (águas e seca).

| Raça      | Ácido rumênico; CLA 18:2 c9,t11(mg/g gordura) |                         |                        |
|-----------|---|-------------------------|------------------------|
|           | Geral   | Verão                   | Inverno                |
| Holandesa | 8,3 ± 4,6                                     | 11,9 ± 3,6 <sup>a</sup> | 4,8 ± 3,6 <sup>b</sup> |
| Gir       | 8,8 ± 3,1                                     | 9,6 ± 3,6               | 8,0 ± 2,2 <sup>A</sup> |

Médias com letras maiúsculas diferem dentro da coluna.

Médias com letras minúsculas diferem na linha.

Não houve diferença entre as médias para raça, mas houve efeito para interação para raça e época pois, enquanto as vacas Gir não reduziram significativamente o teor de ácido rumênico, as vacas Holandesas diminuíram em 60% o teor ( $P < 0,01$ ). Essa diferença está de acordo com as menores produções de leite das vacas zebuínas e conseqüente menor necessidade de alimentação suplementar no inverno, consumindo esses animais mais forragem fresca em relação às vacas Holandesas que acabam ingerindo, relativamente, mais forragem conservada e concentrados. O aumento de CLA com o aumento de ingestão de forragem fresca está bem documentado (Jahreis et al., 1997; Dhiman et al., 1999; Sundquist et al., 2001). O teor médio encontrado é bem mais elevado do que as médias americanas (Chin et al. 1992, Bealieu & Drackley, 2001) que fica entre 4-5 mg de CLA/g gordura, o que equivaleria a 3,5-4,5 mg de ácido rumênico/g gordura.

A suplementação de vacas lactantes com CLA altera o perfil dos AG para uma relação AG de cadeia curta: AG cadeia longa mais saudável. A síntese de novo resulta na formação de ácidos graxos de cadeias curta e média (<16C), dentre os quais estão os ácidos mirístico (C<sub>14</sub>) e palmítico (C<sub>16</sub>), relacionados com uma maior incidência de aterosclerose (Williams, 2000). Portanto, a redução da quantidade de gordura do leite pela ação do CLA trans10, cis12 é acompanhada de uma mudança favorável no perfil desta gordura, conferindo ao produto maior qualidade nutricional.

Alternativamente ao aumento por meio da suplementação, haveria estratégias que favoreceriam a produção endógena de CLA: aumentar a ingestão de AG poliinsaturados com 18 carbonos; inibir a bioidrogenação

ruminal e aumentar a atividade da desaturase na glândula mamária (Griinari, 2001). No caso de suplementação com misturas comerciais de CLA, a proporção entre os principais isômeros deve ser alterada com maiores proporções de t10,c12, em relação a estratégia do animal como "biorreator" de CLA. Independentemente da forma usada para o enriquecimento do CLA, isto é, suplementação ao animal ou produção endógena, persiste a vantagem de ser um processo mais natural do que, por exemplo, a incorporação de óleo ao leite como no caso dos leites ricos em AG omega-3. A possibilidade de valorização do leite com o enriquecimento em CLA é uma realidade comercial. Diversas empresas têm programas ativos de pesquisa e desenvolvimento na área. Há, todavia, necessidade de maiores comprovações de efeitos diretos em humanos.

Áreas onde precisamos avançar seriam: 1) Qual a ingestão diária de CLA que traz maior benefício? 2) Qual a proporção ideal entre os isômeros em função da finalidade do consumidor (prevenção do câncer, menor deposição de gordura)?; 3) Qual o efeito dos novos perfis de ácidos graxos do leite enriquecido em fatores físico-químicos relevantes para produção de lácteos e determinantes de qualidade organolépticas? e 4) Qual a viabilidade de manipulação da microflora ruminal para auxiliar no aumento da produção do CLA?

## 5. Efeito de vitaminas e microminerais na saúde da glândula mamária

A versão mais recente das exigências para bovinos de leite do NRC americano (NRC, 2001) trouxe um grande aumento para certas vitaminas. De fato, quando respostas imunológicas foram utilizadas para verificar o efeito das vitaminas, as exigências se mostraram bem superiores do que quando utilizadas medidas de produção ou reprodução (Weiss, 1998). No entanto, no caso da Vitamina A, o aumento proposto na última versão do NRC (1989) teve como base os dados de biodisponibilidade da vitamina A pré-formada (fornecida nos suplementos), que se mostrou 50% menor (em dietas com alto teor de concentrados) do que a de β-caroteno (única fonte de Vit.A utilizada nos experimentos iniciais, os quais serviram como base para as recomendações anteriores). Além disso, experimentos têm demonstrado aumentos significativos na produção de leite (Oldham et al., 1991) e na função imunológica (Michal et al., 1994) quando vacas no período periparto foram suplementadas com quantidades de Vit.A cerca de três vezes superior ao sugerido na última versão do NRC (1989).

A vitamina E apresenta uma ligação estreita com a resposta imunológica dos animais, com reduções na incidência e prevalência de infecções intramamárias sendo observadas em estudos onde esta vitamina foi suplementada com cerca de 1.000 UI/d para vacas secas e 500 UI/d para vacas em lactação (Smith et al., 1984; Weiss et al., 1997). Para essa vitamina, foram propostos aumentos de 45% e 400% em relação à edição anterior para vacas em lactação e secas, respectivamente.

Alguns microminerais também parecem estar envolvidos com a resposta imunológica. O selênio (Se), por exemplo, apresenta uma ação semelhante à da vitamina E, ou seja, atua como antioxidante, protegendo as membranas celulares da ação oxidante dos radicais livres. O efeito positivo da Vit.E sobre a função imunológica é, portanto, potencializado em dietas contendo níveis adequados de selênio (Weiss, 1997). O cobre, além da função de antioxidante, teria uma ação moduladora do sistema imunológico. O zinco, que participa do mesmo sistema antioxidante que participa o cobre, auxilia na integridade da pele, a primeira camada de defesa contra infecções. A Tabela 5 indica níveis que otimizariam a resposta imunológica em vacas leiteiras. Destes, apenas o Se não foi aumentado, sendo que o aumento para os outros dois foi maior que 57%.

Tabela 5. Níveis de micronutrientes recomendados para otimização da resposta imunológica em vacas leiteiras pelo *National Mastitis Council* dos EUA e valor de exigências que seria indicado pelo NRC para Bovinos de Leite, 2001.

| Nutriente    | Quantidade vaca/dia            | Quantidade vaca/dia                           |
|--------------|--------------------------------|---|
|              |                                | NRC, 2001<br>(Vaca = 650 kg; 40 kg leite/dia) |
| Selênio (Se) | 6 mg                           | 6 mg  |
| Cobre (Cu)   | 200-500 mg                     | 313 mg  |
| Zinco (Zn)   | 900-1.200 mg                   | 1.261 mg                                      |
| Vitamina A   | 100.000-150.000 UI             | 71.500 UI                                     |
| Vitamina E   | 400-800 UI (vacas em lactação) | 520 UI (vacas em lactação)                    |
|              | 1.000 UI (vacas secas)         | 1040 UI (vacas secas)                         |

Fonte: *National Mastitis Council Newsletter* (1997), citado em Fonseca e Santos (2000) e NRC (2001).

De forma geral, os valores sugeridos pelo *National Mastitis Council* são mais elevados do que o NRC (2001), mas percebe-se que os aumentos sugeridos nesta última versão são reflexo dos últimos resultados da pesquisa e aproximam-se desta recomendação. O resultado final seria um leite com menor contagem de células somáticas e menor probabilidade de resíduo de antibióticos (pela menor necessidade de uso).

## 6. Considerações finais

O controle da composição leite pela nutrição já é uma realidade. Diversas oportunidades existem para manipular uma série de componentes do leite por meio de diferentes mecanismos.

Para alguns componentes do leite, alterar a composição é algo limitado e incerto. A recente descoberta pelo nosso laboratório de uma forma de alterar a

composição protéica do leite utilizando o CLA demonstra as oportunidades que podem ser encontradas nesta área. A identificação de um composto como o CLA é bastante interessante, não só pelas importantes modificações que ele causa, mas também pela oportunidade de entender o processo de regulação celular da síntese de gordura. A biologia molecular deverá ser uma ferramenta muito importante para o avanço do conhecimento na área de nutrição.

O ideal seria desenvolvermos modelos que permitissem ao nutricionista compor rações para que os animais produzam exatamente o que o mercado deseja. Para tal, temos que entender os efeitos da nutrição e dos controles fisiológicos do animal.

## 7. Referências bibliográficas

- ASTRUP, H.N.; VIK-MO, L.; EKERN, A. E BAKKE, F. Feeding protected and unprotected oils to dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.59, p.426-430, 1976.
- BAUMAN, D.E.; GRIINARI, M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat. In: *Mammary Biology Conference*. Tours, France, 1999.
- BAUMGARD, L.H.; CORL, B.A.; DWYER, D.A.; SAEBO, A.; BAUMAN, D.E. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v.278(1), p.179, 2000.
- BEALIEU, A.D. & DRACKLEY, J.K. Milk and meat samples obtained in Illinois contain variable amounts of CLA. *J. Anim. Sci.*, v.84, Suppl.1, Abstr, p.1103, 2001.
- BEAM, T.M.; T.C. JENKINS.; P.J. MOATE; R.A. KOHN; D.L. PALMQUIST. Effects of amount and source of fat on the rates of biohydrogenation of fatty acids in ruminal contents. *J. Dairy Sci.*, v.83, p.2564-2573, 2000.
- BLOCK, E. Nutrição de Vacas Leiteiras e Composição do Leite. In: *II Simp. Intern. sobre Qual. do Leite*, p.85-88, Curitiba-PR, 2000.
- BUTTLER, W.R.; CALAMAN, J.J.; BEAM, S.W. Plasma and MUN in relation to pregnancy rate in lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.74, p.858-865, 1996.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; MANSBRIDGE, M.; DOREAU, M. Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated and of conjugated fatty acids. *Ann. Zootech.*, v.49, p. 181-205, 2000.
- CHIN, S.F.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; HA, Y.L.; PARIZA, M.W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. *J. Food Comp. Anal.*, v.5, p.185-197, 1992.
- CHOURNAD, P.Y.; CORNEAU, L.; BAUMAN, D.E.; METZGER, L.E.; BARBANO, D.M. Milk yield and composition during abomasal infusion of CLA. *J. Dairy Sci.*, v.81 (Suppl.1), p.1385, 1998.

- CHRISTIE, W.W. The effects of diet and other factor on the lipid composition fo ruminant tissue and milk. *In: Lipid Metabolism in Ruminant Animals*. Ed. W.W. Christie. Pergamon Press, Oxford, England,.425p, 1981.
- CLEGG, R.A.; BARBER, M.C.; POOLEY, L.; ERNENS, I.; LARONDELLE, Y.; TRAVERS, M.T. Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. *Livestock Production Science*, v. 70, p.3-14, 2001.
- CORL, B.A.; BAUMGARD, L.H.; BAUMAN, D.E. Role of delta-9-desaturase in the synthesis of the anticarcinogenic isomer of CLA and other milk fatty acids. *In: Proc. Cornell Nutr. Conf. Feed Manuf.* Ithaca, NY: Cornell Nutrition Conference (62nd), p. 203-212, 2000.
- DAVIS, C.L.; BROWN, R.E. Low fat milk sindrome. *In: Digestion and metabolism in ruminants*. Phillipson, A.T. (ed.). Oriel Press, Newcastle upon Tyne. 545p. 1970.
- DE PETERS, E.J.; CANT, J.P. Nutritional factors influencing the nitrogen composition of bovine milk: a review. *J. Dairy Sci.*, v.75, p.2043-2070, 1992.
- DHIMAN, T.R.; ANAND, G.R.; SATTER, L.D.; PARIZA, M.W. CLA content of milk from cows fed different diets. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.2146-2156, 1999.
- DUNSHEA, T.R., OSTROWSKA, E.; MURILITARAM, M.; CROSS, R, BAUMAN, D.E, PARIZA, M.W. and SKARIE, C. Dietary conjugated linoleic acid decrease back fat in finisher gilts. *J. Anim. Sci.*, v.76 (Suppl.1), 1998.
- FERNANDES, M.F, MEDEIROS, S.R; OLIVEIRA, D.E.; LANNA, D.P. Efeito da suplementação de ácido linoléico conjugado sobre os teores de uréia e proteína do leite de vacas mestiças em pastejo. *VIII Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP*, v.3, Agropecuária, 2000.
- FONSECA, L.F.L; SANTOS, M.V. *Qualidade do leite e controle de mastite*. São Paulo, Lemos Editorial. 176p., 2000.
- GRIINARI, J.M., DWYER, D.A., MCGUIRE, M.A., BAUMAN, D.E., PALMQUIST, D.L., & NURMELA, K.V.V. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.1251-1261, 1998.
- GRIINARI, J.M., MCGUIRE, DWYER, D.A., M.A., BAUMAN, D.E., and PALMQUIST, D.L. Role of insulin in the regulation of milk fat synthesis in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.80, p.1076-1084, 1997b.
- GRIINARI, J.M.; CHOUINARD, P.Y.; BAUMAN, D.E. Trans fatty acid hypothesis of fat depression revised. *Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers*, Oct., p.208-216, 1997a.
- GRIINARI, M. Development of animal feeding strategies for the production of high CLA milk fat. *In: I International Conference on CLA*, Norway, 2001.
- HINDERS, J. Additional research needed to increase milk protein through the ration. *Feedstuffs*, Jan.,1997.

- IP, C. CLA and cancer research. *In: I International conference in CLA*. p.8, 2001.
- IP, C.; CHIN, S.F.; SCIMECA, J.A.; PARIZA, M.W. Mammary cancer prevention by conjugated dienoic derivative of linoleic acid. *Cancer Res.*, v. 51, p. 6118-6124, 1991.
- IP, C.; SCIMECA, J.A.; THOMPSON, H.J. Conjugated linoleic acid. *Cancer*, v.74, p.1050-1054, 1994.
- JAHREIS, G.; FRITSHE, J.; STEINHART. CLA in milk fat: high variation depending on production system. *Nutr. Research*, v.17, p.1479-1484, 1997.
- KELLY, M.L.; BERRY, J.R.; DWYER, D.A.; GRIINARI, J.M.; CHOUNARD, P.Y.; VAN AMBURGH, M.E.; BAUMAN, D.E. Dietary fatty acid sources affect conjugated linoleic acid concentrations in milk from lactating dairy cows. *J. Nutr.*, v. 128, p.881-885, 1998.
- KENNELLY, J.J. The fatty acid composition of milk fat as influenced by feeding oilseeds. *Anim. Feed Sci. Tech.*, v.60, p.137-154, 1996.
- KENNELLY, J.J.; GLIMM, D.R. The biological potential to alter the composition of milk. *Can. J. Anim. Sci.*, v.78 (Suppl.1), p. 23-56, 1998.
- KENNELLY, J.J.; GLIMM, D.R.; OZIMECK, L. Milk composition in the cow. *In: Proc. Cornell Nutr. Conference for feed manufacturers*, p. 1-21, 1999.
- KRAMER, J.K.G.; PARODI, P.W.; JENSEN, R.G.; MOSSOBA, M.M.; YURAWECZ, P.; ADLOF, R.O. Rumenic Acid: a proposed common name for the major conjugated linoleic acid isomer found in natural products. *Lipids*, v.33, p.835, 1998.
- LOOR, J.J.; HERBEIN, J.H. Exogenous conjugated linoleic acid isomers reduce bovine milk fat concentration and yield by inhibiting de novo fatty acid synthesis. *J. Nutr.*, v.128, p.2411-2419, 1998.
- LYATUU; E.T.; EASTRIDGE, M.L. Nutritional factors affecting milk production, milk composition, milk urea nitrogen and plasma urea nitrogen. Special Circular 163-99. [http://ohioline.ag.ohio-state.edu/sc163/sc163\\_11.html](http://ohioline.ag.ohio-state.edu/sc163/sc163_11.html). 1999.
- MACKLE, T. and D.E. BAUMAN. Recent developments in the regulation of milk protein production. *Proc. 60<sup>th</sup> Cornell Nutrition Conference*. p.104-112, 1998.
- MACKLE; T.R.; BRYANT, A.M.; PETCH, S.F.; HILL, J.P.; AULDIST, M.J. Nutritional influences on the composition of milk from cows of different protein phenotypes in New Zealand. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.172-180, 1998.
- MCCLYMONT & VALLANCE, S. Depression of blood glycerides and milk fat synthesis by glucose infusion. *Proc. Nutr. Soc.*, v.21, 1962.
- MCGUIRE M.A.; MCGUIRE, M.K. Conjugated linoleic acid (CLA): a ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. *In: Proceedings of American Society of Animal Science.*, 2000.

MCGUIRE, M.A.; GRIINAI, J.M.; DWYER, D.A.; BAUMAN, D.E. Role of insulin in the regulation of mammary synthesis of fat and protein. *J. Dairy Sci.*, v.78, n.4, 1995.

MEDEIROS, S.R.; OLIVEIRA, D.E.; AROEIRA, L.J.M.; MCGUIRE, M.; BAUMAN, D.E.; AND LANNA, D.P.D. The effect of long-term supplementation of conjugated linoleic acid (CLA) to dairy cows grazing tropical pasture. *J. Dairy Sci.*, v.83 (Suppl. 1), p.169, 2000.

MEDEIROS, S.R.; TREVISAN, L.X.; BAHIA FO., O.; CASADEI, G.B.; LANNA, D.P.D. Teores de ácidos graxos anticarcinogênicos (ácido linoléico conjugado) no leite produzido no Brasil. In: *II Congresso Internacional de Nutrição, Longevidade e Qualidade de Vida*. p.51, 2001.

METCALF; J.A.; CROMPTON, L.A.; WRAY-CAHEM, D.; LOMAX, M.A.; BEQUETTE, B.J.; MACRAE, J.C.; BLACKWELL, F.R.C.; LOBLEY, G.E.; SUTTON, J.D.; BEEVER, D.E. Responses in milk constituent secretion to intravascular administration of two mixtures of aminoacids in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.79, p.1425-1429, 1996.

MICHAL, J.J.; HEIRMAN, L.R.; WONG, B.P.; CHEW, B.P.; FRIGG, M.; VOLKER, L. Modulatory effects of dietary  $\beta$ -carotene on blood and mammary leukocyte function in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.77, p.1408-1421, 1994.

NARDONE; A.; VALFRÉ, F. Effects of changing production methods on quality of meat, milk and eggs. *Livestock Prod. Sci.*, v.59, p.165-182, 1999.

NRC. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 6<sup>th</sup> Revised Edition, National Academy Press, 1989.

NRC. *Nutrient requirements of dairy cattle*. 7<sup>th</sup> Revised Edition, National Academy Press, 2001.

OLDHAM, E.R.; EBERHART, R.J.; MULLER, L.D. Effects of supplemental vitamin A or b-carotene during the dry period and early lactation on udder health. *J. Dairy Sci.*, v.74, p.3775-3781, 1991.

ORSKOV, E.R.; GRUBB, D.A.; KAY; R.N.B. Effect of Postprandial Glucose or Protein Supplementation on Milk-Yield and Composition in Friesian Cows in Early Lactation and Negative Energy-Balance. *British Journal Of Nutrition*, v.38, p.397-405, 1977.

PARIZA, M.W.; PARK, Y.; COOK, M.E. The biologically active isomers of CLA. *Progress Lip. Res.*, v. 40, p.283-298, 2001.

PARK, Y.; ALBRIGHT, K.L.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; COOK, M.E.; PARIZA, M.W. Effect of conjugated linoleic acid on body composition in mice. *Lipids*, v.32, p.853-858, 1997.

PARK, Y.; STORKSON, J.M.; ALBRIGHT, K.J.; LIU, W.; PARIZA, M.W. Evidence that the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. *Lipids*, v. 34, p.235-241, 1999.

PARODI, P.W. Conjugated linoleic acid and other anticarcinogenic agents of bovine milk fat. *J. Dairy Sci.*, v.82, p.1339-1349, 1998.

PENNINGTON, J.A.; DAVIS, C.L. Effects Of Intraruminal And Intra-Abomasal Additions Of Cod-Liver Oil On Milk-Fat Production In Cow. *J. Dairy Sci.*, v. 58, p.49-55, 1975.

PIPEROVA, L.S.; TETER, B.B.; BRUCKENTAL, I.; SAMPUGNA, J.; MILLS, S.T.; YURAWECZ, M.P.; FRITSCH, J.; KU, K.; ERDMAN, R.A. Mammary lipogenic enzyme activity, trans fatty acids and conjugated linoleic acids are altered in lactating dairy cows fed a milk fat – depressing diet. *J. Nutr.*, v. 130, p.2568 - 2574, 2000.

RULQUIN, H.R.; VERITE, G.G.; PISULEWSKI, P.M. Dairy cow's requirements for amino acids. In: Animal Science Research and Development. Moving toward a new century. *Can. Soc. Sci.*, p.143, 1995.

BAUER, F.D.; FELLNER, V.; KINSMAN, R.; KRAMER, J.K.G.; JACKSON, H.A.; LEE, A.J.; CHEN, S. Methane output and lactation response in holstein cattle with monensin or unsaturated fat added to the diet. *J. Anim. Sci.*, v.76, p.906-914, 1998.

SEBADIO, J.L.; GNAEDIG, S.; CHARDIGNY, J.M. Recent advances in conjugated linoleic acid research. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 2(6), p.499-506, 1999.

BELNER, D.R., and SCHULTZ, L.H. Effects of feeding oleic acid or hydrogenated vegetable oils to lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v.63, p.1235-1241, 1980.

SMITH, K.L.; HARRISON, J.H.; HANCOCK, D.D.; TODHUNTER, D.A.; CONRAD, H.R. Effect of vitamin E and selenium supplementation on incidence of clinical mastitis and duration of clinical symptoms. *J. Dairy Sci.*, v.67, p.1293-1300, 1984.

BUKHIJA, P.; PALMQUIST, D.L. Dissociation of calcium soaps of long chain fatty acids in rumen fluid. *J. Dairy Sci.*, v.73, p.1784-1787, 1990.

BUTTON, J.D. Altering milk composition by feeding. *J. Dairy Sci.*, v.72, p.2801-2814, 1989.

TIMMONS, J.S.; W.P. WEISS, D.L. PALMQUIST, and W.J. HARPER. Relationships Among Dietary Roasted Soybeans, Milk Components, and Spontaneous Oxidized Flavor of Milk. *J. Dairy Sci.*, v.84, p.2440-2449, 2001.

TSUBOYAMA-KASAKA, N.; TAKAHASHI, N.; TANEMURA, K.; KIM, H.J.; TANGE, T.; OKUYAMA, H.; KASAI, N.; IKEMOTO, S.; ESAKI, O. Conjugated linoleic acid supplementation reduces adipose tissue by apoptosis and develops lipodystrophy in mice. *Diabetes*, v. 49, p. 1534-1542, 2000.

VAN SOEST, P.J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd. ed. Cornell University Press, Ithaca. 1994.

WEISS, W.P. Requeriments of fat-soluble vitamins for dairy cows: a review. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.2493-2501, 1998.

WEISS, W.P.; HOGAN, J.S.; TODHUNTER, D.A.; SMITH, K.L. Effect of vitamin E supplementation in diets with a low concentration of selenium on mammary gland health of dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v.80, p.1728-1737, 1997.

WILLIAMS, C.M. Dietary fatty acids and human health. **Annales Zootech.**, v.49, p.165-180, 2000.

WONSIL, B.J., HERBEIN, J.H., WATKINS, B.A. Dietary and ruminally derived trans-18:1 fatty acids alter bovine milk lipids. **J. Nutr.**, v.124, p.556-565, 1994.

XU, J.; TERAN-GARCIA, M.; PARK, J.H.I.; NAKAMURA, M.T.; CLARKE, S.D. Polyunsaturated fatty acids suppress hepatic sterol regulatory element-binding protein-1 expression by accelerating decay. **J. Biological Chemistry.**, v.276, p.9800-9807, 2001.

YURAWECZ, M.P.; KRAMER, J.K.G.; MOSSOBA, M.M.; ROACH, J.A.G.; SEHAT, N., FRITSCH, J.; KATAOKA, A.; KU, Y. Analytical Methodology for CLA. *I International conference in CLA*, 14p, 2001.