



## QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA) EM IOGURTE

*Oscar de Oliveira Santos Júnior<sup>1</sup>, Paula Fernandes Montanher<sup>2</sup>, Jesuí Vergílio  
Visentainer<sup>3</sup>, Makoto Matsushita<sup>4</sup>, Nilson Evelazio de Souza<sup>5</sup>*

**RESUMO:** Nenhum alimento isolado apresenta demonstração científica de causar câncer ou proteger contra a sua ocorrência. No entanto, recomendações nutricionais visando reduzir os efeitos da dieta sobre a ocorrência de câncer incluem elevada ingestão de frutas e vegetais, moderação no consumo de gorduras, atividade física regular e ingestão de produtos lácteos. Atualmente, existem evidências científicas de que vários nutrientes do leite e produtos lácteos sejam potencialmente benéficos na prevenção do câncer, tais como o cálcio, a vitamina D e esfingolipídios. Além destes nutrientes, alguns componentes da gordura do leite apresentam características anticarcinogênicas, tais como o ácido linoléico conjugado (CLA) e ácido butírico. Este trabalho, objetivou quantificar os ácidos graxos, em especial o ácido linoléico conjugado presentes em iogurte, através da técnica de cromatografia em fase gasosa. As amostras foram coletadas em laticínio do noroeste paranaense logo após o envase e armazenadas em freezer a temperatura de -18°C, para posterior análises. A análise cromatográfica foi conduzida utilizando um cromatógrafo a gás Varian, modelo CP 3380, equipado com detector de ionização de chama. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os ácidos graxos saturados (AGS) foram os mais abundantes, sendo majoritários os ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0) e mirístico (14:0), respectivamente. Em se tratando do teor de CLA, foi detectado o isômero 18:2c9t11 nas amostras em quantidade de 5,41±0,18 mg/g. Demonstrando que este derivado lácteo pode ser utilizado em dietas como fonte de CLA.

**PALAVRAS-CHAVE:** CLA, iogurte, lipídios.

### 1 INTRODUÇÃO

Nenhum nutriente isolado ou alimento apresenta demonstração científica de causar câncer ou proteger contra a sua ocorrência. No entanto, as atuais recomendações nutricionais visando reduzir os efeitos da dieta sobre a ocorrência de câncer incluem elevada ingestão de frutas e vegetais, moderação no consumo de gorduras, manutenção do peso corpóreo, atividade física regular e ingestão de produtos lácteos com teor reduzido de gordura. Atualmente, existem evidências científicas de que vários nutrientes do leite e produtos lácteos sejam potencialmente benéficos na prevenção do câncer, tais como o cálcio, a vitamina D e esfingolipídios. Estudos com animais demonstraram que dietas ricas em cálcio podem estar associadas com a redução do risco de câncer do cólon, mama e pâncreas. Este papel protetor pode justificar-se pela capacidade de o mineral ligar-se a substâncias irritantes do cólon (tais como os ácidos biliares), tornando-as menos tóxicas ao epitélio do intestino. Além destes nutrientes, alguns componentes da gordura do leite apresentam características anticarcinogênicas, tais como o ácido linoléico conjugado (CLA) e ácido butírico (Fuente, Luna e Juarez, 2006)

O termo ácido linoléico conjugado (CLA), refere-se a uma mistura de isômeros do ácido linoléico (ácido cis-9, cis-12 octadecadienóico), que foram descobertos por cientistas da Universidade de Wisconsin em Madison (USA) no final da década de 70. Destes isômeros, dois tem ganhado destaque mundial nas pesquisas com alimentos O isômero 18:2t10c12 tem sido apontado como um potente inibidor da síntese de gordura no leite e também responsável pela redistribuição da gordura do músculo, sendo capaz de diminuir a massa gorda e aumentar a massa magra, reciprocamente O isômero 18:2c9t11 tem propriedades antitumorais comprovadas, como agente redutor da incidência do câncer de mama (Ou *et al.*, 2007)

Por isto neste trabalho, procurou-se, quantificar os ácidos graxos em especial o CLA presentes em iogurte de forma que o leitor possa ao final, conhecer em média a quantidade dos ácidos graxos que está ingerindo através de sua alimentação.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A coleta das amostras foi realizada em laticínio do noroeste do Paraná. A matéria prima é oriunda sempre da cidade de Lobato-PR, onde os animais são na grande maioria da raça Gir (*Bos indicus*), e são alimentados no sistema de pastagem com estrela africana (*Cynodon nlenfuensis var. nlenfuensis*). Quando a carreta de leite chega no estabelecimento é então conectada uma tubulação de inox que com auxílio de bomba positiva, bombeia o leite por sistema fechado até o tanque isotérmico vertical de estocagem com capacidade de 30.000l, munido de agitador.

Do tanque isotérmico vertical que estava estocado inicialmente, o leite cru segue bombeado por sistema fechado em tubulação de inox até o pasteurizador a placas do tipo HTST (alta temperatura, curto tempo), munido de controlador de temperatura digital, onde é aquecido á 75°C/15s e resfriado imediatamente a 5°C sofrendo assim o processo de pasteurização, seguindo para outro balão de estocagem horizontal com capacidade de 30.000l, isotérmico e munido com agitador.

Do balão horizontal de estocagem de leite pasteurizado, o mesmo segue por sistema fechado de tubulação de inox até tanque de preparo, onde é adicionado sob agitação constante o açúcar e mistura de estabilizantes segundo formulação da unidade. Deste tanque a mistura é novamente pasteurizada (85°C/10min) e destinada as fermenteiras onde chega a temperatura de 42°C. É adicionada então, a mistura iniciadora liofilizada YO MIX da Danisco, e mantido o tanque hermeticamente fechado e mistura sob repouso até que a mesma atinja o pH de 4,7, onde é então resfriada sob leve agitação até temperatura de 20°C. A esta mistura é adicionado o preparado de frutas do sabor desejado, e envasada em máquina do tipo Brascop.

Após o envase realizado no mês de janeiro de 2009 foram coletadas cinco amostras de 500 mL cada, em frascos previamente esterilizados, a coleta ocorreu em quatro semanas consecutivas. Após recolhimento, os frascos foram imediatamente resfriados e congelados, sendo transportados em recipientes térmicos.

A extração de lipídios totais foi realizada de acordo com o método de Folch, Lees e Stanley, (1957) com clorofórmio, metanol e água (2:1: 1).

Os lipídios foram submetidos à preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, conforme procedimento descrito por Bannon *et al.*, (1982) com modificações.

Foram adicionados 5,0 mL de solução de Metóxido de sódio 0,25 mol L<sup>-1</sup> em metanol –éter etílico (1:1), em um tubo de tampa rosqueável contendo aproximadamente 150 mg de lipídios, agitando vigorosamente por aproximadamente 3 minutos. À mistura, foram adicionados 3,0 mL de iso-octano e 15 mL de solução saturada de cloreto de sódio. O tubo foi novamente agitado vigorosamente e deixado em repouso para separação das fases, e o sobrenadante foi coletado em frascos “ependorf” identificados, para posterior análise cromatográfica.

O método original propõe um rápido aquecimento sob refluxo após adição do reagente transesterificante, mas este não foi realizado para evitar isomerizações dos dienos conjugados do ácido linoléico conforme proposto por Simionato et al., (2010).

A análise cromatográfica foi conduzida utilizando um cromatógrafo a gás Varian, modelo CP 3380, equipado com detector de ionização de chama, injetor do tipo split/splitless e coluna capilar de sílica fundida CP-Select CB-FAME (100 % cianopropil ligado, dimensões: 100 m, 0,25 mm i.d. e 0,39 µm de fase estacionária). Os parâmetros de operação estabelecidos após verificação da melhor condição de resolução foram: temperaturas do injetor e do detector de 235°C. A temperatura da coluna foi programada a 65°C por 4 minutos, seguido por uma primeira rampa de 16°C/min até atingir 185°C, permanecendo assim por 12 minutos. Uma segunda rampa foi programada, de 20°C/min até 235°C, permanecendo nesta temperatura por 14 minutos. O tempo total da análise foi de 40 minutos

As vazões dos gases (White Martins), foram de 1,4 mL.min<sup>-1</sup> para o gás de arraste (H<sub>2</sub>); 30 mL.min<sup>-1</sup> para o gás auxiliar (N<sub>2</sub>) e 30 e 300 mL.min<sup>-1</sup> para o H<sub>2</sub> e para o ar sintético da chama, respectivamente. A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/80.

As injeções foram realizadas em triplicatas e os volumes de injeção foram de 2 µL. As áreas dos picos dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram determinadas através do software Workstation versão 5.0 (Varian).

A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada por comparação ao tempo de retenção dos constituintes da amostra com uma mistura constituída de 37 padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (189-19 Sigma, EUA). e por comparação com tempos de retenção de ésteres metílicos de padrões contendo os isômeros geométricos 18:2c9t11 e 18:2t10c12 do ácido linoléico (O-5626, Sigma, EUA)

A concentração dos ácidos graxos foram calculadas de acordo com Joseph e Ackman (1992).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi encontrado um teor de lipídios no iogurte de 2,41±0,03 mg/100g de amostra. Valor este inferior a média encontrado em leite integral que é de 3 mg/100g de amostra (Brasil 2002), isto se deve a adição de estabilizantes para ajudar a aumentar a viscosidade do iogurte, podendo assim diminuir a quantidade de leite na formulação fazendo com isto, com que se reduza a quantidade de lipídios totais do produto final comparados aos leites crus e pasteurizados. O teor de lipídios deste produto pode variar dependendo do tipo de iogurte (desnatado, parcialmente e integral).

Em se tratando dos ácidos graxos, foram identificados 26 e destes obteve-se como ácidos graxos majoritários, os ácidos Mirístico (14:0), Palmítico (16:0), Esteárico (18:0) e oléico (18:1n-9).

Para as somatória de ácidos graxos do iogurte obteve-se para os saturados (AGS) o valor de 356,37±0,41mg/g de lipídios, para monoinsaturados (AGMI) 167,82 ±0,68mg/g de lipídios e polinsaturados (AGPI) 20,50±0,27 mg/g de lipídios. Já a razão n-6/n-3 ficou em 8,49±0,15 valor dentro do recomendado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (FAO, 2007) que sugere a razão da ingestão entre Ômega-6 e Ômega-3 entre 5 e 10.

Os derivados lácteos, assim como o leite, sempre foram apontados como vilões à saúde cardiovascular, devido à alta quantidade de AGS. Porém dados da Pesquisa Contínua sobre Ingestão de Alimento por Indivíduos de 1994-1996 e 1998, dos EUA e confirmados pelo Guia Dietético 2005 dos EUA revelam que a ingestão de alimentos lácteos está associada com melhora nas ingestões de nutrientes essenciais (como cálcio, magnésio, potássio, zinco, ferro, vitamina A, riboflavina e folato) sem efeitos adversos na ingestão de gordura ou colesterol e ajudando a reduzir os riscos de doenças cardíacas

coronarianas, direta ou indiretamente. Além disso, a gordura dos alimentos lácteos contém componentes, como o ácido linoléico conjugado (CLA), e esfingolipídios, que têm demonstrado efeitos benéficos à saúde. Por exemplo, evidências científicas emergentes indicam que o CLA e seu precursor, o ácido vacênico (um ácido graxo trans de ocorrência natural), na gordura do leite podem proteger contra o desenvolvimento e a progressão da aterosclerose. Em países como a Alemanha, estudos indicam que, para surtir efeitos anticarcinogênicos, a ingestão diária de CLA deve ser de 360 mg para mulheres e 440 mg para homens, sendo destes, 2/3 provenientes de leite e produtos lácteos e 1/4 provenientes de carne e produtos cárneos (Sieber *et al.*, 2004).

Nas amostras de iogurte foi quantificado um teor de CLA de  $5,41 \pm 0,18$  mg/g de lipídios correspondente ao isômero 18:2c9t11. Valor este referente a 26,41mg deste isômero em 200ml de iogurte, desta forma, fazendo uma relação com os valores recomendados por Sieber *et al.*, 2004, precisaria ser consumido um valor de 9 copos de iogurte diariamente por mulheres e 11 copos do mesmo para os homens para suprir a necessidade diária de CLA.

#### 4 CONCLUSÃO

Em se tratando de consumo de leite e derivados recomenda-se o consumo de iogurte, pois tem menor teor de saturados em relação as amostras de leite, é rico em cálcio, sua proteína é de fácil digestão, pois já foi desnaturada no processo de aquecimento da mistura, tem menos lactose que o leite, já que a mesma foi consumida em grande parte pelos microrganismos durante a fermentação, podendo assim ser consumido por que tem alergia a lactose e também boa quantidade de CLA.

#### REFERÊNCIAS

Bannon, C.D., Breen, G.J., Craske, J.D., Hai, N.T., Harper, N.L., O'Rourke, K.L. (1982). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. **Journal of Chromatography**, 247: 71-89.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Divisão de Normas Técnicas. (2002). **Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal**. Aprovado pelo Decreto nº 30.691, de 29-03-52, alterado pelos Decretos nº 1.255 de 25-06-62, 1.236 de 02-09-94, nº 1.812 de 08-02-96 e nº 2.244 de 04-06-97. Brasília, DF.

FAO. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, 2007. Acesso em: 14/02/2010. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/601/default.aspx>.

Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**. 226(1): 497-509.

Fuente, M.A. de la; Luna, P.; Juarez, M. (2006). Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. **Trends in Analytical Chemistry**, 25(9): 917-926..

Joseph, J. D.; Ackman, R. G.; J. (1992). **AOAC Int.**, 75, 488.

Ou, L., Ip, C., Lisafeld, B., Ip. M.M. (2007). Conjugated linoleic acid induces apoptosis of murine mammary tumor cells via Bcl-2 loss. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 356: 1044–1049.

Sieber, R; Collomba, M.; Aeschlimann, A.; Jelen, P.; Eyer, H.(2004) Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products—a review. **International Dairy Journal**, 14: 1–15.

Simionato JI., Garcia JC, Santos GT, et al. Validation of the Determination of Fatty Acids in Milk by Gas Chromatography. **J Braz Chem Soc** 2010; 21: 520-524.

**Anais Eletrônico**

VII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar  
CESUMAR – Centro Universitário de Maringá  
Editora CESUMAR  
Maringá – Paraná - Brasil