



## **EFEITO DA PASTEURIZAÇÃO SOB O TEOR DE ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA) EM LEITE BOVINO**

*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:** O termo ácido linoléico conjugado (CLA) refere-se a uma mistura de isômeros do ácido linoléico. Destes, dois tem destaque mundial. O isômero 18:2t10c12 apontado como um potente inibidor da síntese de gordura no leite e o isômero 18:2c9t11 com propriedades antitumorais comprovadas. No entanto faltam dados sobre a pasteurização utilizada na conservação do leite, que demonstrem como esta pode afetar a composição de ácidos graxos neste alimento. Este trabalho objetivou, quantificar os ácidos graxos presentes em leite cru e após o mesmo passar pelo processo de pasteurização, através da técnica de cromatografia em fase gasosa. As amostras foram coletadas em laticínio do noroeste paranaense, sendo as de leite cru retiradas do tanque de estocagem, e as de leite pasteurizado, da saída do pasteurizador, ambas foram armazenadas em freezer a temperatura de -18°C, para posterior análises Foi utilizada para a extração de lipídios, a técnica de Folch Lees e Stanley. Os lipídios foram esterificados através da técnica de Bannon *et al.*. 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. Houve diferenças significativas ( $p < 0,500$ ) de 18:2c9t11 nas amostras, estando no leite cru sua maior quantidade ( $14,91 \pm 0,17$  mg/g), havendo redução de 58,28% deste isômero após pasteurização. Demonstrando que a pasteurização na conservação do leite, afeta o teor de CLA dos mesmos.

**PALAVRAS CHAVE:** Ácidos graxos, ácido linoléico conjugado, leite, pasteurização.

### **1 INTRODUÇÃO**

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)

Como o CLA é um produto da biohidrogenação incompleta, alimentos de origem de ruminantes, são as principais fontes na dieta humana. No entanto faltam dados sobre os processos térmicos utilizados para conservação de leite e seus derivados, a respeito de estes afetarem as suas propriedades nutricionais e organolépticas (Pereda *et al.*, 2008.).

Também, não foram encontrados relatos semelhantes que demonstrem como a pasteurização pode afetar a composição e quantidade de ácidos graxos em leite e seus derivados

Por isto neste trabalho, procurou-se, quantificar os ácidos graxos em especial o CLA presentes em leite cru e após este mesmo leite passar pelo processo de pasteurização, de forma que o leitor possa ao final, conhecer em média, a origem e 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. O mesmo recebe diariamente uma carreta de leite cru refrigerado tipo c contendo 26.000l. 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*). A esta carreta 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.

Deste tanque foram coletadas cinco amostras de 250 mL cada, em frascos previamente esterilizados. Foram coletadas amostras em quatro semanas consecutivas do mês de janeiro de 2009 (verão). Após recolhimento, os frascos foram imediatamente resfriados e congelados, sendo transportados em recipientes térmicos.

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.

Deste tanque são coletadas cinco amostras de 250 mL cada, em frascos previamente esterilizados. Após recolhimento, os frascos foram imediatamente resfriados e congelados, sendo transportados em recipientes térmicos.

A determinação 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)

Os ácidos graxos em mg g<sup>-1</sup> de lipídios totais, foram quantificados em relação ao padrão interno, tricosanoato de metila (23:0) da Sigma. Antes da pesagem da amostra foi adicionado ao recipiente de esterificação, 1,00mL de solução do padrão interno (1 mg mL<sup>-1</sup>), após a adição do padrão interno, o solvente foi evaporado sob fluxo de N<sub>2</sub>.

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

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com nível de 5% de significância utilizando o programa Statistica 7.0 (StatSoft, USA, 2005). Os valores médios foram comparados pelo Teste de Tukey.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 26 ácidos graxos foram identificados (Figura 01) e quantificados nas amostras analisadas

Destes obteve-se como ácidos graxos majoritários, os ácidos Mirístico (14:0), Palmítico (16:0), Esteárico (18:0) e oléico (18:1n-9). Do total de ácidos graxos nas amostras 65% são saturados, 32% monoinsaturados e 3% poliinsaturados

Comparando a somatória de ácidos graxos saturados (AGS) das amostras, tem-se uma falça impressão de aumento da mesma após o processo de pasteurização (571,45<sup>a</sup> ± 14,87mg/g de lipídios contra 596,87<sup>b</sup> ± 1,01mg/g de lipídios), isto se deve a maneira de estocagem do leite cru, que é em tanque isotérmico vertical. Como este tipo de tanque contem apenas um agitador vertical, o mesmo não é suficiente para realizar uma agitação ideal, deixando com que se forme uma película de gordura na superfície do tanque, fazendo com que haja assim uma variação de AGS no leite cru, o que pode ser observado pelo desvio padrão do mesmo. O mesmo acontece para a somatória de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI), (276,46<sup>a</sup> ± 5,23mg/g de lipídios contra 285,38<sup>b</sup> ± 2,24mg/g de lipídios).

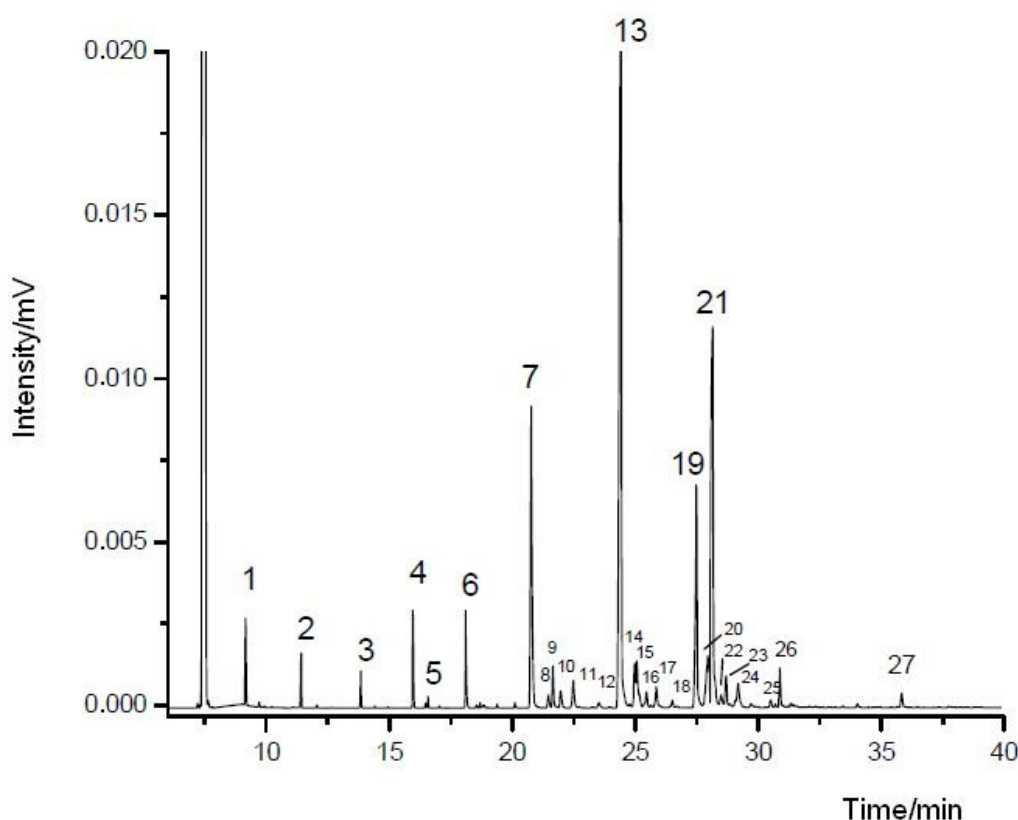
Já quando este leite passa pelo processo de pasteurização, o mesmo é bem misturado e fica mantido em tanque isotérmico horizontal, que possui três agitadores em seu interior, não deixando assim que se forme este tipo de película, fazendo com que não haja grande variação de AGS e AGMI para estas amostra

Em se tratando da somatória de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI), houve uma diminuição esperada dos mesmos de 28,6% após o processo de pasteurização do leite, passando de 36,92 ± 0,20 para 26,36 ± 0,42 demonstrando que o aquecimento denigre a estrutura do mesmo. Provavelmente pelo leite ter pH ácido favorece com o aquecimento, o ataque do oxigênio a dupla ligação, formando compostos voláteis como álcoois e cetonas, diminuindo assim a quantidade destes ácidos graxos poliinsaturado no alimento. Dos AGPI, o que sofreu maior variação é o ácido linoléico conjugado (CLA). Este passou de 14,91 ± 0,17mg/g em leite cru para 6,22 ± 0,20mg/g após o mesmo leite passar pelo

processo de pasteurização redução de 58,28%. Este valor de CLA para leite cru é superior ao encontrado por Simionato (2008) no período de verão (7 a 11 mg/g), isto pode ter ocorrido, pois animais alimentados com pastagem tem maior biohidrogenação ruminal do que animais alimentados com ração concentrada, fazendo assim com que os que alimentem-se de pastagem tenham maior concentração de CLA em seu leite

Em se tratando da concentração de CLA para leite após sofrer processo de pasteurização este está próximo do encontrado por Simionato (2008) em queijo do tipo mussarela no período de verão ( $6,68 \pm 0,39\text{mg/g}$ ), podemos fazer esta comparação pois para a fabricação deste tipo de queijo o leite passa pelo processo de pasteurização também a temperatura de  $75^\circ\text{C}/15\text{segundos}$ .

Em se tratando da razão n-6/n-3 as amostras ficaram com  $6,85 \pm 0,23$  para leite cru;  $5,52 \pm 0,09$  após este leite passar pelo processo de pasteurização Todas as amostras estão 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. Esta diminuição da razão para leite após pasteurização se deve a redução de CLA, reduzindo assim a quantidade de n-6.



**Figura 1:** (1) . Cromatograma representativo para as amostras de leite analisadas (1) 4:0, (2) 6:0, (3) 8:0; (4) 10:0, (5) 11:0, (6) 12:0, (7) 14:0, (8) 14:1n-11, (9) 14:1n-9, (10) 14:1n-7, (11) 15:0, (12) 15:1n-7, (13) 16:0, (14) 16:1n-11, (15) 16:1n-9, (16) 16:1n-7, (17) 17:0, (18) 17:1n-7, (19) 18:0, (20) 18:1t, (21) 18:1n-9, (22) 18:1n-7, (23) 18:2n-6t, (24) 18:2n-6, (25) 18:3n-3, (26) 18:2c9t11, (27) 23:0 (padrão interno)

#### 4 CONCLUSÃO

O processo de pasteurização diminui drasticamente o teor de CLA em leite, mostrando ao se utilizar a técnica de suplementação da ração animal para o aumento do teor de CLA em leite, deve-se buscar uma prevenção para a perda de CLA após pasteurização, pois todo leite tem que ser pasteurizado para ser consumido.

## 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.
- 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.
- 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.
- Pereda, J.A., Jaramillo, D.P., Quevedo, J.M., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A.J. (2008). Characterization of volatile compounds in ultra-high-pressure homogenized milk. ***International Dairy Journal***, 18: 826–834.
- Simionato, J.L. (2008). **Composição química e quantificação de ácidos graxos com ênfase ao ácido linoléico conjugado (CLA) em leite e derivados**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá.
- 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.
- StatSoft. *Statistica 7.0 (2005).software*. Tucksa, USA.