



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

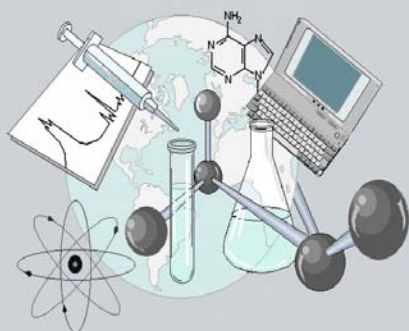
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Composição química e quantificação de ácidos graxos com ênfase ao ácido linoléico conjugado (CLA) em leite e derivados

Tese apresentada por **Julliana Izabelle Simionato** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

CEE



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, AGOSTO/2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E QUANTIFICAÇÃO
DE ÁCIDOS GRAXOS COM ÊNFASE AO
ÁCIDO LINOLÉICO CONJUGADO (CLA) EM
LEITE E DERIVADOS**

JULLIANA IZABELLE SIMIONATO

Tese para obtenção do grau de Doutor
Orientador: Prof. Dr. Nilson Evelázio de Souza

**MARINGÁ
2008**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

S589c Simionato, Julliana Izabelle
Composição química e quantificação de ácidos graxos com ênfase ao ácido linoléico conjugado (CLA) em leite e derivados / Julliana Izabelle Simionato.
-- Maringá : [s.n.], 2008.
115 f. : il. color., figs.

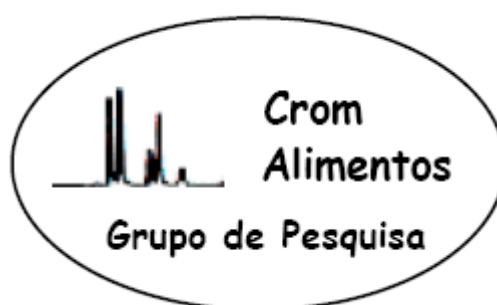
Orientador : Prof. Dr. Nilson Evelázio de Souza.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Química, 2008.

1. Ácidos graxos. 2. Ácido linoléico conjugado (CLA). 3. Derivados lácteos. 4. Leite. 5. Lipídios. 6. Química de alimentos. 7. Química analítica. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Química. II. Título.

CDD 21.ed. 547.77

LINHA DE PESQUISA

QUÍMICA DE ALIMENTOS



O MELHOR DE VOCÊ

Dê sempre o melhor
E o melhor virá...
Às vezes as pessoas são egocêntricas, ilógicas e insensatas...
Perdoe-as assim mesmo.
Se você é gentil, as pessoas podem acusá-lo de egoísta e interesseiro...
Seja gentil assim mesmo.
Se você é um vencedor, terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros...
Vença assim mesmo.
Se você é honesto e franco, as pessoas podem enganá-lo...
Seja honesto e franco assim mesmo.
O que você levou anos para construir, alguém pode destruir de uma hora para
outra...
Construa assim mesmo.
Se você tem paz e é feliz, as pessoas podem sentir inveja...
Seja feliz assim mesmo.
O bem que você faz hoje pode ser esquecido amanhã...
Faça o bem assim mesmo.
Dê ao mundo o melhor de você, mas isso pode nunca ser o bastante...
Dê o melhor de você assim mesmo.
E veja você que, no final das contas...
É entre VOCÊ e DEUS...
Nunca foi entre você e eles!

(Madre Teresa de Calcutá)

Ofereço e dedico ao meu esposo Fernando,
que aceitou a ausência, compreendeu a
distância e ainda assim foi incessantemente
presente apoiando cada etapa desta
jornada.

E aos meus pais, Ademir e Edina, pelo amor
incondicional e constante.

AGRADECIMENTOS

Ao **Deus trino**, *Pai, Filho e Espírito*, por realizar em minha vida coisas que “meus olhos não viram, meus ouvidos não ouviram”, mas que meu coração sonhou.

Ao Fernando, esposo amado, pelo amor altruísta, que aceitou a ausência e a distância, incentivou o crescimento, enxugou as lágrimas e sempre estendeu as mãos.

À minha família linda, meus pais, Ademir e Edina, meus irmãos Luciane e Marcos, e à Pedro e Rosa, que mesmo distantes apoiaram e incentivaram este processo.

Ao meu orientador, professor Nilson, que aceitou ser meu orientador no momento mais difícil, quando na ausência daquele que será sempre lembrado, Professor Dr. Jorge Nozaki (*in memoriam*), estendeu as mãos proporcionando conforto e hoje, crescimento profissional.

À melhor amiga que alguém pode ter Juliana Carla, pela constante companhia, correções e sorrisos.

À Ana Maria e Henrique, amigos irmãos, pela mão estendida em todos os momentos necessários.

Às amigas Gizilene, Marcela, Milena e Tânia, pelo apoio.

Aos colegas do Laboratório, que ainda estão ou que já venceram sua jornada, especialmente Ana Carolina, Carla, Ailey, Rubia, Ivane, Ricardo e Cris, que ensinaram, ajudaram, choraram e deram ótimas risadas comigo!

Ao colega Adonilson, pela valiosíssima ajuda com a análise fatorial.

Ao Departamento de Química, que esteve presente em cada etapa da minha formação, especialmente aos seus secretários de graduação e pós, Keite, Rodrigo, Cristina e Claudemir.

Aos professores deste departamento, que são os grandes responsáveis pelo crescimento profissional, especialmente ao Prof. Dr. Jesuí, pelos constantes ensinamentos e ao Prof. Dr. Makoto, pelo auxílio na operação do cromatógrafo.

Ao técnico Dirceu Batista de Souza pela amizade e cooperação no decorrer do trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Extensão, André, Airton e Ari pelo empréstimo de materiais e reagentes.

À Fundação Araucária, Capes e CNPq, pelo auxílio financeiro.

A todos aqueles cujos nomes não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse feito.

MUITO OBRIGADA!!!

"Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor,
mas lutamos para que o melhor fosse feito.
Não somos o que deveríamos ser,
não somos o que iremos ser,
mas, Graças à Deus,
não somos o que éramos antes."

Martin Luther King

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ESQUEMAS	xii
LISTA DE ANEXOS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1. Contexto histórico e evolutivo do leite e seus derivados.....	04
2.2. Parnorama geral da agro-indústria leiteira	08
2.3. Biossíntese e constituintes do leite de vaca	15
2.4. Ácido Linoléico Conjugado	21
2.5. Quantificação de ácidos graxos em alimentos por Cromatografia a gás	25
2.6. Modelagem Fatorial das respostas obtidas	30
3. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo Geral	32
3.2. Objetivos Específicos.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1. Amostragem.....	34
4.1.1. Leites pasteurizados, bebida láctea e queijos.....	34
4.1.2. Leites crus	34
4.2. Métodos	35
4.2.1. Análise Química.....	35

4.2.2. Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos	35
4.2.3. Identificação e quantificação dos ésteres de ácidos graxos	36
4.2.3.1. Análise cromatográfica dos ésteres de ácidos graxos	36
4.2.4. Quantificação	37
4.2.5. Análise estatística	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. Análises Químicas	39
5.2. Análise da amostra certificada	42
5.3. Quantificação dos ácidos graxos e Modelagem dos experimentos	43
5.3.1. Verificação dos fatores Estação e Idade dos animais para os leites crus	43
5.3.1.1. Análise da influência das variáveis: Estação x Idade	46
5.3.2. Verificação dos fatores Estação e Pasteurização para os leites crus	53
5.3.2.1. Análise da influência das variáveis: Estação x Pasteurização	56
5.4. Análise dos derivados	63
6. CONCLUSÕES	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
8. ANEXOS	85

LISTA DE FIGURAS

1. Microrregiões do Estado do Paraná	11
2. Crescimento da Produção de leite no Paraná (milhões de litros).....	13
3. Volume captado pelas mais importantes indústrias do Estado do Paraná.....	15
4. Estrutura do ácido linoléico e dos dois isômeros de CLA com atividade biológica, c9t11 e t10c12.	22
5. Estrutura da fase estacionária da coluna CP-Sil 88 utilizada na análise de Ácidos graxos.	26
6. Superfície representativa da quantidade dos ácidos graxos (a) láurico, (b) mirístico, (c) palmítico e (d) esteárico em função da estação do ano e idade dos animais.	46
7. Superfície representativa da quantidade do ácido oléico em função da estação do ano e idade dos animais	47
8. Superfície representativa da quantidade dos ácidos graxos (a) monoinsaturados trans e (b) rumênico (CLA) em função da estação do ano e idade dos animais	50
9. Superfície representativa da razão 18:2c9t11/18:1t em função da estação do ano e idade dos animais.....	50
10. Relação entre as razões 18:2c9t11/18:1t para os animais com diferentes medias de idade, no verão e inverno.	51
11. Superfície representativa do somatório dos ácidos graxos (a) ômega 6 (n-6) (b) ômega 3 (n-3) em função da estação do ano e idade dos animais.....	52
12. Superfície representativa da quantidade da razão dos ácidos graxos ômega 6 (n-6) e ômega 3 (n-3) em função da estação do ano e idade dos animais	52
13. Superfície representativa da quantidade media do ácido láurico em função da estação do ano e tipo de processo	56

14. Superfície representativa da quantidade media do ácido mirístico em função da estação do ano e tipo de processo.....	57
15. Superfície representativa da quantidade media do ácido palmítico em função da estação do ano e tipo de processo	57
16. Superfície representativa da quantidade media do ácido esteárico em função da estação do ano e tipo de processo	58
17. Superfície representativa da quantidade media do oleico em função da estação do ano e tipo de processo	59
18. Superfície representativa da quantidade media dos ácidos (a) linolelaídico e (b) linoléico em função da estação do ano e tipo de processo	59
19. Superfície representativa da quantidade média do ácido rumênico (CLA c9t11) em função da estação do ano e tipo de processo.	60
20. Quantidade media dos ácidos linoléico e linolelaídico no verão e no inverno para os leites crus e pasteurizados	61
21. Superfície representativa do somatório da quantidade media de ácidos graxos ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3) em função da estação do ano e tipo de processo.....	62
22. Superfície representativa da razão entre os ácidos graxos ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3) em função da estação do ano e tipo de processo	63
23. Somatório de ácidos graxos saturados para os diferentes derivados do leite de vaca	66
24. Somatório de ácidos graxos monoinsaturados para os diferentes derivados do leite de vaca	67
25. Somatório de ácidos graxos poliinsaturados para os diferentes derivados do leite de vaca	68
26. Somatório de ácidos graxos poliinsaturados ômega-6 (n-6) para os diferentes derivados do leite de vaca.....	69

27. Somatório de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (n-3) para os diferentes derivados do leite de vaca.....	70
28. Razões entre os ácidos graxos poliinsaturados ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3) para os diferentes derivados do leite de vaca	70
29. Ácido rumênico (CLA, c9t11) para os diferentes derivados do leite de vaca	61

LISTA DE TABELAS

1. Consumo per capita mundial de leite fluido – 2000 a 2006	10
2. Classificação da Produção Anual Leite por Estado no Brasil, 2006.	12
3. Composição nutricional média do leite de vaca	16
4. Composição química dos leites crus proveniente de diferentes produtores e dos leites pasteurizados e bebida láctea no verão.	40
5. Composição química dos leites crus provenientes de diferentes produtores e dos leites pasteurizados e bebida láctea no inverno.....	40
6. Composição química dos queijos produzidos no verão.	41
7. Composição química dos queijos produzidos no Inverno.	42
8. Análise da amostra certificada	42
9. Condições pré-estabelecidas de Estação do ano e Idade dos animais para o planejamento fatorial.....	43
10. Análise de variância (ANOVA) obtida pelo design fatorial de 2^3 e seu respectivo modelo para a resposta da quantidade de ácidos graxos	44
11. Condições pré-estabelecidas para quatro experimentos realizados para verificação da quantidade de cada ácido graxo pelo design fatorial 2^2 na combinação de níveis altos e baixos de Idade e Estação do Ano.....	45
12. Condições pré-estabelecidas de Estação do ano e Idade dos animais para o planejamento fatorial.....	53
13. Análise de variância (ANOVA) obtida pelo design fatorial de 2^2 e seu respectivo modelo para a resposta da quantidade de ácidos graxos	54
14. Condições pré-estabelecidas para quatro experimentos realizados para verificação da quantidade de cada ácido graxo pelo design fatorial 2^2 na combinação de níveis altos e baixos de Tipo e Estação do Ano.....	55

15. Variações ocorridas nas quantidades dos ácidos: linoléico conjugado (c9t11), linolelaídico e linoléico após a pasteurização	61
16. Quantidade em mg de CLA a cada 100g dos derivados	72

LISTA DE ESQUEMAS

1. Conversão dos componentes da dieta a componentes do leite.	17
2. Produção de CLA em ruminantes. O quadro da esquerda se refere aos processos que ocorrem no rúmen; o quadro da direita, aos ocorridos na glândula mamária ou tecido adiposo. Adaptado de Bauman (2001).	23

LISTA DE ANEXOS

1: Valores de comprimento equivalente de cadeia (ECL), calculados a partir do tempo de retenção corrigido de ésteres metílicos, e respectivos coeficientes angular, linear e de correlação, para análise de regressão linear dos valores de ECL	85
2: Fator de Correção Experimental (FCE), Teórico (FCT) e Fator de Erro (FE) para o Cromatógrafo à gás Varian CP-3380.	86
3: Artigo de Investigação do material de referência Leite em pó, NIST 8435.	87
4: Cromatograma representativo para os leites.	100
5: Ácidos Graxos em mg/g de lipídios totais para o leite cru proveniente de diferentes fornecedores no período do Verão	101
6: Ácidos Graxos em mg/g de lipídios totais para o leite cru proveniente de diferentes fornecedores no período do Inverno.....	103
7: Ácidos Graxos em mg/g de lipídios totais para o leite pasteurizado tipo “B” e “C” no período do Verão.....	105
8: Ácidos Graxos em mg/g de lipídios totais para o leite pasteurizado tipo “B” e “C” no período do Inverno.....	106

9: Cromatograma representativo para a bebida láctea.	107
10: Cromatograma representativo para o queijo mussarela.....	108
11: Cromatograma representativo para o queijo provolone.	109
12: Cromatograma representativo para o queijo minas frescal.	110
13: Cromatograma representativo para a ricota.	111
14: Ácidos Graxos em mg/g de lipídios totais para os derivados de leite no período do Verão.....	112
15: Ácidos Graxos em mg/g de lipídios totais para os derivados de leite no período do Inverno	113

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar a composição química e quantificar os ácidos graxos presentes em amostras de leite e derivados, com ênfase ao ácido linoléico conjugado (CLA). A técnica utilizada foi a cromatografia gasosa, com detector por ionização em chama. Foram analisadas amostras de: leites antes de passarem por tratamento térmico (crus) (n=81), após o tratamento térmico (pasteurizado integrais) (n=36), de queijos tipo mussarela (n=9), provolone (n=9), ricota (n=9) e minas frescal (n=9), e de bebidas lácteas (n=9). As amostras foram coletadas nos meses de Janeiro e Julho de 2007 (verão e inverno, respectivamente). Foi utilizado material de referência certificado NIST RM-8435 (National Institute of Standards and Technology - leite em pó) para verificação da exatidão do método utilizado para derivatização dos ácidos graxos. A recuperação foi considerada quantitativa para os ácidos graxos analisados, e assim, o método utilizado neste trabalho pode ser aplicado em amostras comerciais para quantificação de ácidos graxos. A análise estatística (Teste Tukey), foi realizada com o *software* Statistica, versão 7.0 e o planejamento fatorial, pelo programa Design Expert. A razão entre a quantidade de CLA e os ácidos graxos trans monoinsaturados, cujo principal isômero é o ácido vacênico, foi analisada. Esta razão mostrou uma máxima conversão a CLA ocorre em leite de animais mais velhos, no verão. Este resultado leva ao entendimento de que a influência da redução da temperatura ambiente sobre a biohidrogenação foi menos acentuada do que sobre a atividade da enzima Δ^9 dessaturase. As quantidades de ácido esteárico encontradas, mostram que esta substância é produzida em maior quantidade no verão, independentemente da idade dos animais, enquanto que no inverno diminui significativamente apenas para animais mais velhos. Isto sugere que a biohidrogenação em animais mais novos foi menos influenciada pela redução da temperatura do que para animais mais velhos. Assim, os resultados indicam que a redução da temperatura ambiente pode estar afetando animais novos e velhos de formas diferentes. Animais mais novos parecem ter a atividade da enzima Δ^9 desaturase mais reduzidas com a diminuição da temperatura. Animais mais velhos parecem ter a biohidrogenação reduzida. Tal qual para a quantidade de CLA, animais mais velhos no verão produziram uma menor razão n-6/n-3. Desta forma, os leites produzidos por animais mais velhos no verão apresentaram as melhores características em termos de composição em ácidos graxos. Foi verificada a influência da pasteurização e estação do ano na quantidade dos ácidos graxos octadecadienóicos, linoléico (LA), linolelaídico (LD) e linoléico Conjugado (CLA, c9t11). A estação do ano influenciou mais sobre a quantidade de CLA do que pelo processo de pasteurização. A pasteurização aumentou a quantidade de CLA tanto no verão quanto no inverno. Entretanto, no verão o aumento foi maior do que no frio. Houve aumento na quantidade do ácido graxo trans linolelaídico, em ambas as estações. Ao contrário, ocorreu uma diminuição na quantidade média do ácido linoléico. Existem indícios de que o ácido linoléico esteja se convertendo em linolelaídico e em ácido linoléico conjugado, durante o processo de pasteurização. Além disso, após o tratamento térmico as razões n-6/n-3 diminuíram significativamente. Assim, infere-se que o processo de pasteurização influi positivamente na composição em ácidos graxos do leite. A análise realizada com os derivados lácteos indicou que a quantidade de CLA na amostragem realizada no período do inverno foi superior àquela realizada no verão para os queijos mussarela, provolone e para a bebida láctea. Os resultados para Ricota e Minas frescal foram contrários a estes, e diferiram significativamente em relação aos outros derivados. Verificou-se uma falta de homogeneidade nos resultados obtidos para os derivados lácteos nos diferentes períodos do ano, tanto em relação à composição química quanto à quantidade dos ácidos graxos, Isso pode indicar falta de procedimentos padrões no estágio de fabricação, que dificultaria uma possível normatização das embalagens, onde seriam interessantes informações a respeito da presença de CLA. Além disso, essa heterogeneidade pode trazer também informações errôneas aos consumidores. As análises mostraram que em relação à quantidade de ácidos graxos saturados, informação obrigatória nos rótulos dos alimentos, a variação foi muito grande.

Palavras-chave: Ácidos graxos, CLA, derivados lácteos.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the proximate composition and quantification of fatty acids in dairy products, emphasizing conjugated linoleic acid (CLA). The technique used was gas chromatography equipped with a flame ionization detector. The samples used were: milk before heat treatment (raw milk) (n=81), milk after heat treatment (pasteurized milk) (n=36), mozzarella cheese (n=9), provolone cheese (provolone) (n=9), ricotta cheese (n=9) and fresh cheese (n=9), and lactic beverages (n=9). The samples were collected in January and July, 2007 (summer and winter, respectively in the Southern Hemisphere). Material certified by the National Institute of Standards and Technology was used. NIST RM-8435 – powder milk was used to verify the used derivatization method accuracy of the fatty acids. The recuperation has been considered quantitative to the fatty acids analyzed, and thus, the used method can be applied in commercial samples to fatty acids quantification. The statistic analyses (Tukey test) have been achieved with Statistics Software 7.0, and the factorial design with Design Expert Software. The ratio between the CLA amount, and the monounsaturated trans fatty acids, which the principal isomer is vacenic acid has been analyzed. That ratio showed the highest CLA conversion in mature animal's milk, in the summer. That result leads to understanding that the decrease room temperature has influence over the biohydrogenation at less than in Δ^9 desaturase activity. The results showed that the stearic acid amounts is more produced in the summer, independent of the animal's age, but in the winter it decreases significantly just to older animals. The study suggests that the biohydrogenation in older animals due to a temperature decrease was greater than in the younger animals. The results also indicate that the temperature decrease can affect the older and the younger animals in different ways. The Δ^9 desaturase activity in younger animals seems to decrease more with the decrease in temperature. The older animals biohydrogenation seems to decrease with the decrease in temperature. As CLA amounts, older animals, in the summer, have produced a lower n-6/n-3 ratio. Thus, the milk produced in the summer, from older animals, have showed the best characteristic in terms of fatty acids composition. The pasteurization and yearly season's influence was verified in the linoleic, linolelaidic and linoleic conjugated fatty acids amounts. The yearly season's influence was bigger than the pasteurization influence. However, in the summer, the increase was higher than in the winter. The linolelaidic acid increased in both seasons. On the other hand, the linoleic acid amounts decreased. The linoleic acid can be being converted in linolelaidic and linoleic conjugated acid forms, during the pasteurization process. In addition, after heat treatment, the n-6/n-3 ratio decreased significantly. We can therefore infer that the heat treatment had a positive influence in the milk fatty acids composition. The dairy product analysis showed that amounts of CLA in the winter were higher than in summer for the mozzarella cheese, provolone cheese and to the lactic beverage. The results for the ricotta and fresh cheese were opposite and significantly different in relation to the other dairy products. The inhomogeneous results were verified to the dairy products composition and fatty acids quantification, in both seasons. This can be indicative of a lack of standard procedures in fabrication stage. Thus, it would difficult the imposition of standards in the packages, which would be interesting information about CLA. Moreover, the inhomogeneous results can bring wrong information to the consumer. The results have showed a big variation in the saturated fatty acids (SFA) amount, and this information is mandatory in the labels.

Key-words: Fatty acids, Conjugated linoleic acid (CLA) and dairy products.

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o setor leiteiro destaca-se como um dos sistemas agroindustriais com maiores perspectivas de crescimento, tamanha sua importância econômica e social para o país, uma vez que é praticado em todo território nacional. Dos estados brasileiros, o Paraná ocupa a terceira colocação na produção de leite de vaca e o terceiro lugar na classificação em termos de produção. A Região Centro Ocidental Paranaense (microrregiões de Campo Mourão e Goioerê), embora não seja a maior produtora do estado, encontra-se em uma região que se destaca na produção de produtos alimentícios, sendo que investimentos em tecnologia podem aumentá-la sem a necessidade de inclusão de área ou aumento do rebanho.

O consumo de leite no Brasil é grande quando comparado a outros países, porém ainda está bem distante da recomendação do Ministério da Saúde. Isso talvez ocorra porque dietas baseadas em produtos lácteos, as quais contêm altos níveis de ácidos graxos saturados, sempre foram associadas a uma variedade de doenças nos homens, especialmente as cardiovasculares. Entretanto, estudos recentes têm apontado para componentes saudáveis presentes na gordura do leite.

A gordura é um dos componentes mais abundantes do leite, e também o mais variável. Sua concentração e composição sofrem mais influência do que as demais frações pela nutrição e condições ambientais. É composta principalmente por triacilgliceróis que compõem aproximadamente 98% do total da gordura do leite.

O ácido linoléico conjugado (do inglês CLA) é um dos ácidos graxos presentes na gordura do leite de ruminantes. Os isômeros do CLA têm diferentes efeitos fisiológicos, sendo já comprovada a atividade biológica de dois dos seus isômeros, o 18:2 t10c12 e o 18:2 c9t11. O primeiro 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, respectivamente. O outro tem propriedades

antitumorais comprovadas, como agente redutor da incidência do câncer de mama.

Os isômeros do CLA e suas interações necessitam ser mais estudados, assim como encorajadas as pesquisas sobre seus possíveis efeitos na saúde. Além disso, a utilização dos isômeros do CLA em uma variedade de alimentos funcionais mostra uma possibilidade que não deve ser ignorada.

Todavia, além dos estudos mostrando a ação dos diferentes isômeros do CLA, são necessários também estudos das quantidades dos seus isômeros presentes em diferentes matrizes alimentícias. Um desafio tem sido a quantificação desses isômeros em produtos lácteos e seus derivados. Uma vez conhecida a quantidade média dessas substâncias nestes produtos, pode-se estabelecer um parâmetro seguro de ingestão das mesmas, que seja benéfico quanto à ingestão de CLA e também dos ácidos graxos saturados.

Uma forma de analisar ácidos graxos em alimentos é utilizar a cromatografia gasosa. Para tal, faz-se necessária a derivatização clássica, ou seja, a conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos, e o uso de padrões internos de concentração conhecida para que cada substância possa ser quantificada.

Muitas pesquisas têm sido realizadas nos últimos anos sobre a interferência da alimentação dos animais na composição química e produção do leite, assim como o efeito dos processos térmicos utilizados para conservação de leite e seus derivados nas propriedades nutricionais e organolépticas. Entretanto, não existem dados até o momento da influência da idade dos animais em combinação com fatores ambientais de temperatura, assim como do processo de pasteurização, que afetam a composição em ácidos graxos do leite e de seus derivados.

Neste trabalho, ferramentas estatísticas de modelagens computacionais ajudaram a estudar a relação entre a quantidade de ácidos graxos presentes em leites de vacas com idades médias de 4 e 6 anos, em função de temperaturas ambientes altas e baixas. A modelagem fatorial ajudou também a relacionar a influência do processo de pasteurização sobre a quantidade dos ácidos graxos nas duas estações do ano.

Além disso, procurou-se ainda quantificar os ácidos graxos presentes em cinco diferentes derivados lácteos amplamente consumidos no Brasil (queijos e bebida láctea), 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. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Contexto histórico e evolutivo do leite e seus derivados

Existem evidências da utilização do leite desde os primórdios da história. Arqueólogos encontraram sinais da existência de ordenha de vacas para obtenção de leite há 9000 anos atrás (Roque, Shumacher e Paiva, 2003). Os primeiros registros que mencionam o leite aparecem nos escritos dos Sumérios (4000 a.C.), posteriormente nos registros dos babilônicos (2000 a.C.) e também em documentos dos reinos védicos (Pereda, 2005).

O leite, no início apenas um subproduto da atividade agropastoril, passou a desempenhar papel de importância crescente na vida comunitária. Rebanhos de ovelhas e de cabras, provavelmente os primeiros animais a serem domesticados, surgiram no Oriente Médio, a partir de 8000 a.C., mas não como fenômeno isolado. As fêmeas do camelo e do dromedário, no Saara, a rena, no Alasca, e a vaca, na Ásia Central, serviram como fontes de leite. Em decorrência de sua relevância alimentar, não tardou em ganhar importância religiosa (Pereda, 2005).

O primeiro registro histórico e concreto da utilização do leite como alimento é uma peça encontrada em Tell Ubaid, atual Iraque, datada de 3100 a.C., conhecida como Friso dos ordenhadores. Nela, podem ser constatadas não só a ordenha, mas também a filtragem do leite. Também os egípcios, a partir de 1000 a.C., deixaram registros de utilização do leite com conotações religiosas (Ctena e Piroli, 1999).

O historiador grego Heródoto, em torno de 500 a.C., relata a existência de um pão preparado com grãos de lótus misturados com leite e água que, quando comido quente, era leve e de fácil digestão, e a utilização, por Tártaros, de grande quantidade de leite de éguas, que seria consumido com gafanhotos, secos e moídos. Entre os Etruscos, por volta de 400 a.C., as cabras e os carneiros eram usados como fonte de leite, carne e lã. Do leite, esse povo fazia diferentes tipos de queijo. Há também indicações (tumba dos relevos de Cerveteri) de que esse povo já utilizava o ralador de queijo (Ctena e Piroli, 1999).

O médico grego Hipócrates (400 a.C.), considerado o pai da Medicina, recomendava uma dieta de leite de vaca contra envenenamentos. Misturado com

água, vinho, mel ou outros ingredientes, era utilizado para curar afecções inflamatórias. Também é dessa época a primeira menção negativa ao leite, descrevendo, com relativa precisão, um quadro de diarreia, por questão higiênica ou até de intolerância à lactose (Amouretti, 1998).

Na mitologia greco-romana, o leite é fator de união entre o divino e o humano, entre o mortal e o eterno e, além disso, o gerador de vida no céu e na Terra. Conta-se que Zeus, em um de seus envolvimento com mortais, no caso Alcmena, gerou Hércules – herói famoso principalmente por sua força. Tendo se afeiçoado a seu filho, quis que ele fosse imortal. Para isso, levou-o sorrateiramente para ser amamentado por sua esposa, Hera, enquanto ela dormia. O pequeno Hércules sugou o seio com tamanho ímpeto que este continuou jorrando, mesmo depois do fim da amamentação. Do leite derramado no céu, surgiu a Via Láctea e, daquele vertido sobre a terra, surgiu a flor-de-lis (Tetra-Pak, 2005).

Entre os cristãos, nos primeiros tempos do cristianismo, o leite era servido em rituais de batismo como símbolo de purificação, regenerada pelo sacramento. A imagem de Maria amamentando o Menino Jesus é uma constante em pinturas entre os séculos 10 e 16. Em diversas delas, Maria oferece o seio, cercada de anjos, em um clima etéreo, próprio dos milagres (Tetra-Pak, 2005).

No Alcorão, a exemplo da Bíblia, o leite goza de grande respeito. É citado como uma bebida do Paraíso, e para os muçulmanos sonhar com ele é sinal de conhecimento e sabedoria (Tetra-Pak, 2005).

Apesar de poder ser tomado ao natural, o leite é um alimento frágil. Iogurte, ricotas e queijos eram formas de prolongar sua longevidade. A partir do século XIX, o grande desenvolvimento urbano que se processou foi acompanhado de uma formidável industrialização. O leite condensado, por exemplo, surgiu na França em 1828 como uma forma de conservação do produto. O método consistia em aquecê-lo a uma temperatura de 120° C num recipiente fechado, submetido à pressão (Rocha, 2007).

A invenção dos processos de refrigeração e, finalmente da geladeira doméstica, pelo alemão Karl Van Linde, numa variação do processo criado pelo americano John Gorrie, validou o leite in natura por mais tempo. Os processos de pasteurização ampliaram sua durabilidade. Mas, neste caso, ainda se dependia

da refrigeração. Em meados do século XX foi criada a ultrapasteurização, conhecida pela sigla UHT (Ultra High Temperature). O sueco Ruben Rausing notou que era possível manter o leite íntegro se conservado em embalagens hermeticamente fechadas, livres de microorganismos. Nascia o leite de caixinha, o longa-vida (Rocha, 2007).

Nos dias de hoje, a agroindústria leiteira ganhou espaço. O Consumo de leite e derivados como queijos e iogurtes, vem crescendo dia a dia. As indústrias leiteiras representam, por exemplo, um dos mais importantes sistemas agroindustriais em países como o Brasil, tamanha sua importância econômica e social para o país, sendo praticada em todo território nacional.

A estrutura do mercado de produtos lácteos no Brasil é bastante complexa, em virtude do elevado número de agentes econômicos que atuam no sistema e da multiplicidade de canais de comercialização. O potencial produtivo do setor e suas vantagens em relação a outros países produtores e tradicionalmente exportadores é muito grande. Hoje, no Brasil, uma série de derivados lácteos são produzidos de acordo com normas da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

O Leite Pasteurizado é o leite fluido elaborado a partir do Leite Cru Refrigerado na propriedade rural, que apresente as especificações de produção, de coleta e de qualidade dessa matéria-prima contidas em Regulamento Técnico próprio e que tenha sido transportado a granel até o estabelecimento processador. O Leite Pasteurizado deve ser classificado quanto ao teor de gordura como integral, padronizado a 3% m/m (três por cento massa/massa), semidesnatado ou desnatado, e, quando destinado ao consumo humano direto na forma fluida, submetido a tratamento térmico na faixa de temperatura de 72 a 75°C (setenta e dois a setenta e cinco graus Celsius) durante 15 a 20s (quinze a vinte segundos), em equipamento de pasteurização a placas, dotado de painel de controle com termo-registrador e termo-regulador automáticos, válvula automática de desvio de fluxo, termômetros e torneiras de prova, seguindo-se resfriamento imediato em aparelhagem a placas até temperatura igual ou inferior a 4°C (quatro graus Celsius) e envase em circuito fechado no menor prazo possível, sob condições que minimizem contaminações (Brasil, 1997a).

Segundo Perry (2004), a mussarela é uma variedade de queijo de origem italiana e, assim como o queijo prato, diferencia-se de outros queijos por ser um

queijo filado. Originalmente, era produzido apenas a partir de leite de búfala, mas por ser muito utilizado na culinária mundial, também é produzido a partir do leite de vaca, sendo preparado a partir da adição de fermentos lácteos, sendo posteriormente a massa cozida a uma temperatura que não deve ultrapassar os 40°C. É considerado um queijo semi-gordo, sendo amplamente consumido no Brasil (Brasil, 1997c).

O provolone é um queijo semi-gordo e semi-duro, originário de diversos países, sendo consumidos em boa parte do mundo. Sua massa é semelhante à da mussarela, sendo posteriormente submetido à processos de defumação. É um queijo compacto e duro, de cor amarela e aroma agradável. Costuma ser comercializado em forma de cilindro. Tem longa duração, à volta de um ano. Os queijos semi-duros são queijos com período médio de maturação, apresentando assim um maior teor de umidade, em relação aos queijos duros, textura tenra e sabor mais suave.

O queijo minas frescal é um queijo brasileiro, obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas. A temperatura do processo é de 30°C. Suas características básicas são: Alta umidade, classifica-se como semi-gordo, deve ser consumido fresco (Brasil, 1997b).

A ricota é um queijo de origem italiana de massa mole, fresco e baixo teor de gordura. Sua produção, ao contrário da maioria dos queijos, é feita não a partir de leite, mas a partir do soro de queijo, o que lhe confere a característica especial de um alto teor de soro-proteínas (alfa-lactoglobulina, beta-lactoalbumina), em geral, mais nutritivas que as proteínas dos queijos normais (cuja principal proteína na composição é a caseína). É preparado a partir da adição de ácido cítrico, a uma temperatura de aproximadamente 95°C. Pela legislação brasileira, é permitido adicionar parte de leite ao soro para aumentar o rendimento da fabricação.

Entende-se por Bebida Láctea Pasteurizada, o produto lácteo resultante da mistura do leite (in natura, pasteurizado, esterilizado, UHT, reconstituído, concentrado, em pó, integral, semidesnatado ou parcialmente desnatado e desnatado) e soro de leite (líquido, concentrado e em pó) adicionado ou não de produto(s) ou substância(s) alimentícia(s), gordura vegetal, leite(s) fermentado(s),

fermentos lácteos selecionados e outros produtos lácteos. A base Láctea representa pelo menos 51% (cinquenta e um por cento) massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto. É submetida à Pasteurização Lenta (62 a 65° C por 30 minutos) ou Pasteurização de curta duração (72 a 75°C durante 15 a 20 segundos), em aparelhagem própria, resfriada entre 2 e 5°C (dois e cinco graus Celsius) e, em seguida, envasada. Normalmente, neste tipo de bebida, observa-se uma redução da gordura saturada e colesterol, comparada ao leite integral. Basicamente, a diferença entre iogurte e bebida láctea é a consistência e uma redução do valor nutritivo do segundo, quando comparado ao primeiro produto. A bebida láctea é mais líquida, enquanto o iogurte é mais consistente.

2.2. Parâmetros Gerais da Agro-Indústria Leiteira

No Brasil, dentre os sistemas agro-industriais mais importantes encontra-se o setor leiteiro. Sua importância econômica e social para o país é tamanha, que é praticada em todo território nacional.

Fatores como a política de abertura comercial, o Mercosul, o plano de estabilização econômica, a desregulamentação do mercado, a nova estrutura de produção e comercialização, o fortalecimento da representação dos produtores, a maior competição no setor industrial e também o crescente poder de discernimento do consumidor, tem provocado um processo de mudança acelerada e profunda no agronegócio de leite (Vilela, Leite e Resende, 2002).

As conseqüências destas mudanças para a produção de leite e as perspectivas do setor têm merecido atenção. Vilela, Leite e Resende (2002) apontam como fruto destas mudanças, a maior especialização do setor produtivo, o aumento da produtividade pela incorporação de novas tecnologias de produção, a redução do número de produtores, a melhoria da qualidade do produto, o aumento de escala de produção e a redução da sazonalidade.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, FAO (2007), 84,1% do total de leite produzido mundialmente é de vaca, seguido pelo de outras espécies como cabra, ovelha e camelo. O Continente Americano responde por 28,5% da produção mundial de leite de vaca, perdendo apenas para o continente Europeu, que retém 38,1% desta produção.

O Brasil ocupou em 2006, a sexta posição na classificação mundial dos principais países produtores de leite de vaca, produzindo 25,4 milhões de litros de leite. Os Estados Unidos da América, primeiro lugar nesta classificação, produziram 82,5 milhões de litros, seguido pela Índia, com 39,8 milhões de litros de leite.

No Brasil, um levantamento dos 100 maiores produtores de leite realizado em 2002, apontou que entre as raças utilizadas, a holandesa predomina seguida pela Girolanda e mestiços Girolanda/Holandesa (de Carvalho *et al.*, 2002).

Embora o Brasil seja o sexto maior produtor de leite de vaca do mundo, em termos de produtividade alcança apenas a vigésima primeira posição mundial. Com um rebanho de cerca de 20 mil cabeças de vacas ordenhadas, sua produtividade média é de apenas 1,2 mil litros/vaca/ano. Este valor representa uma quantia 7,5 vezes menor que a verificada nos Estados Unidos, topo da classificação de produtividade mundial com 9,0 mil litros/vaca/ano (FAO, 2007).

O consumo de leite fluido no Brasil, atingiu em 2006, o valor médio de 71 litros/habitante/ano. O consumo per capita mundial de leite fluído pode ser verificado na tabela 1.

Tabela 1: Consumo *per capita* mundial de leite fluido - 2000 a 2006

País	L / pessoa / ano						
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006
<i>AMÉRICA DO NORTE</i>	227,5	226,5	224,1	223,5	222,1	221,7	219,7
Canadá	93,1	92,1	90,4	87,2	86,9	86,4	84,5
Estados Unidos	95,2	94,2	93,9	94,3	93,8	93,2	92,4
México	39,2	40,2	39,8	42,0	41,4	42,1	42,8
<i>AMÉRICA DO SUL</i>	133,6	131,7	120,2	121,0	115,2	118,9	120,9
Argentina	61,3	62,0	51,9	52,9	46,0	48,1	50,1
Brasil	72,3	69,7	68,3	68,1	69,2	70,8	70,8
<i>UNIÃO EUROPÉIA*</i>	80,0	80,2	75,8	76,0	75,2	73,7	73,3
<i>EUROPA ORIENTAL</i>	153,0	156,0	154,4	163,6	171,8	165,7	171,2
Romênia	153,0	156,0	154,4	163,6	171,8	165,7	171,2
EX – URSS	159,8	162,8	167,5	164,7	197,6	178,7	176,1
Rússia	96,5	96,8	98,8	92,3	89,6	86,8	86,8
Ucrânia	63,3	66,0	68,7	72,4	108,0	91,9	89,3
<i>ÁFRICA</i>	18,2	21,5	21,1	21,8	21,5	21,2	20,8
Egito	18,2	21,5	21,1	21,8	21,5	21,2	20,8
<i>ÁSIA</i>	90,4	90,6	125,6	131,1	127,7	129,7	131,4
China	3,0	3,5	4,4	5,9	7,9	9,9	12,0
Coréia do Sul	n.d.	n.d.	34,7	37,9	33,1	32,1	31,8
Índia	32,9	32,7	32,4	32,4	33,3	35,6	36,2
Japão	39,2	38,9	39,4	39,6	38,9	37,7	37,3
Taiwan	15,3	15,5	14,7	15,3	14,5	14,4	14,1
<i>OCEANIA</i>	194,5	191,1	191,4	191,5	191,5	192,9	191,9
Austrália	103,9	99,2	100,6	100,4	101,4	103,7	103,6
Nova Zelândia	90,6	91,9	90,8	91,1	90,1	89,2	88,3

* União Européia é composta por 25 países

Fonte: Embrapa Gado de Leite, 2008

Em relação ao consumo per capita mundial de queijos, a América do Sul consumiu no ano de 2006, uma média de 11,6 Kg/habitante/ano, valor este menor apenas que o do consumo de queijos na América do Norte, com 6,8 Kg/habitante/ano e da União Européia, com 13,5 Kg/habitante/ano. No total de queijos consumido na América do Sul, a média de consumo *per capita* na Argentina foi de 9,0 Kg, enquanto que no Brasil apenas de 2,6 Kg.

Embora no Brasil, o consumo de leite seja grande, comparativamente a outros países, ainda está bem distante da recomendação do Ministério da Saúde, que estabelece três porções diárias, equivalentes a 220 Kg/pessoa/ano. Estima-se hoje, que os brasileiros consumam aproximadamente 136 Kg leite/pessoa/ano (Láctea Brasil, 2008).

Dos estados brasileiros, o Paraná ocupa hoje a segunda colocação na produção de leite de vaca, com uma produção de 2,7 milhões de litros. O maior produtor nacional, neste mesmo ano, foi o Estado de Minas Gerais, com uma

produção de 7,1 milhões de litros. O estado do Rio Grande do Sul hoje é o terceiro maior produtor nacional, com 2,6 milhões de litros.

O Paraná é tradicionalmente um Estado produtor de leite. O gosto pela bovinocultura de leite veio como herança da população europeia que se firmou no Estado, consolidado pela estrutura fundiária, onde a prevalência de pequenas propriedades é marcante (Santos *et al.*, 2008). O Paraná é um dos estados mais progressistas do Brasil, participando com aproximadamente 22% da produção nacional de grãos, destacando-se na classificação dos exportadores e registrando um PIB de R\$ 83,5 bilhões. O Estado é dividido em 10 microrregiões, conforme Figura 1.



Figura 1: Microrregiões do Estado do Paraná

Fonte: www.o-parana.com

Por apresentar um perfil progressista, o estado do Paraná tem se destacado na atividade leiteira, estando presente em todos os seus 399 municípios. Apresenta assim, grande importância econômica e social. Estudos apontam para a existência de 100 mil produtores de leite, de pequeno, médio ou grande porte, que encontram nesta atividade, o único empreendimento gerador de renda e cumprem o objetivo de saldar, pelo menos, as despesas domésticas que também têm vencimentos mensais (Vilela, Leite e Resende, 2002).

Segundo os números de 2006 (IBGE, 2006), a produtividade média nacional de 1,2 mil L/vaca/ano, é considerada muito baixa quando comparada com os principais países produtores. Entretanto, no Estado do Paraná, a

produtividade média, no mesmo ano, foi de 1,9 mil L/vaca/ano, nitidamente superior à média nacional.

Tabela 2: Classificação da Produção Anual Leite por Estado no Brasil, 2006.

Estados	Produção de Leite (milhões de litros)	Produtividade (Litros/vaca)
1º Minas Gerais	7.094	1.476
2º Paraná	2.704	1.955
3º Rio Grande do Sul	2.625	2.119
4º Goiás	2.614	1.140
5º São Paulo	1.744	1.092
6º Santa Catarina	1.710	2.180
7º Bahia	906	535
8º Rondônia	691	595
9º Pará	637	673
10º Mato Grosso	630	1.361
11º Mato Grosso do Sul	584	1.125
12º Rio de Janeiro	490	973
13º Espírito Santo	468	1.185
14º Pernambuco	434	1.117
15º Ceará	380	798
16º Maranhão	341	653
17º Alagoas	243	1.234
18º Tocantins	235	932
19º Rio Grande do Norte	228	1.441
20º Sergipe	217	465
21º Paraíba	155	764
22º Acre	98	605
23º Piauí	80	395
24º Amazonas	45	565
25º Distrito Federal	38	1.573
26º Roraima	6	309
27º Amapá	4	583
BRASIL	25.398	1.213

Fonte: Embrapa Gado de Leite, 2008.

Em dez anos, de 1996 a 2006, enquanto a produção de leite, no Brasil, passou de 18,5 milhões de litros para 25,4 milhões, crescimento de 37,3%, a produção do Paraná passou de 1,514 milhões de litros para 2,7 milhões, crescimento de 78%.

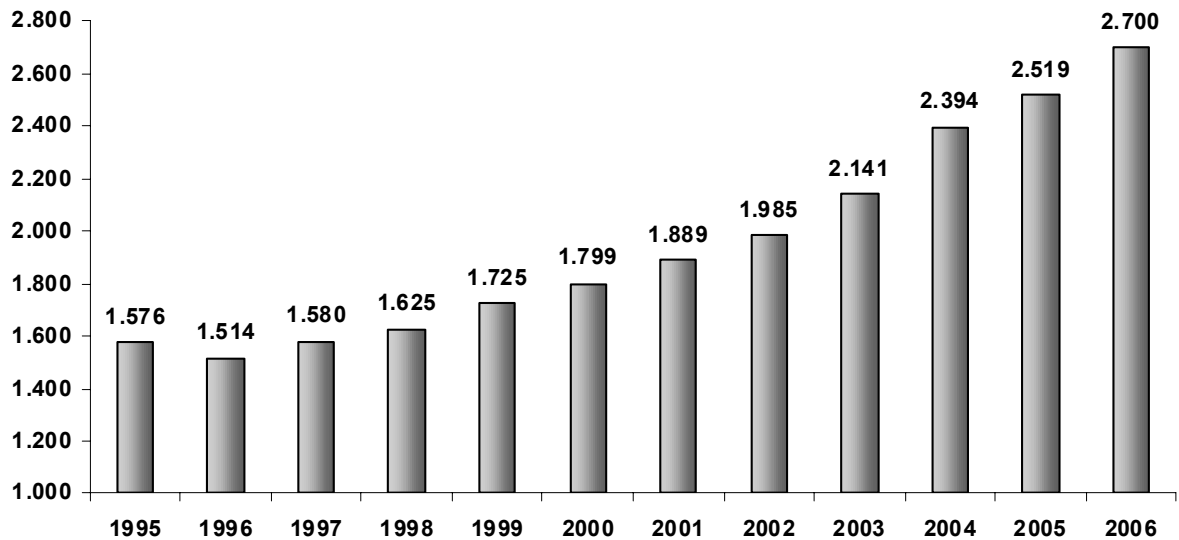


Figura 2: Crescimento da Produção de leite no Paraná (milhões de litros).
Fonte: Embrapa Gado de Leite, 2008.

Segundo dados da Embrapa Gado de Leite (2008), a região oeste do Paraná, que comporta 50 municípios agrupados em três microrregiões (Cascavel, Foz do Iguaçu e Toledo), é a primeira em produção de leite no Estado, atingindo no ano de 2006 a marca dos 707 milhões de litros, com uma produtividade média de 1,049 mil litros/vaca.

Na seqüência encontra-se a região Sudoeste com 37 municípios agrupados em três microrregiões (Capanema, Francisco Beltrão e Pato Branco), com uma produção de 514 milhões de litros e produtividade de 2,152 mil litros/vaca.

A região Centro Oriental, que comporta 14 municípios agrupados em três microrregiões (Jaguariaíva, Ponta Grossa, Telêmaco Borba), é a terceira em produção no Estado, com 381 milhões de litros, porém a maior em termos de produtividade, alcançando a média de 3,461 mil litros/vaca, valor este aproximadamente três vezes maior que a média nacional. A alta produtividade deve-se a características como alta tecnologia e genética apurada. Estes fatores fazem com que o leite produzido nesta

região, seja disputado pelas maiores empresas lácteas do país para elaboração de produtos com alto valor agregado.

Na seqüência, a região Norte Central Paranaense, que engloba 79 municípios agrupados em 8 microrregiões (Astorga, Apucarana, Faxinal, Floraí, Ivaiporã, Londrina, Maringá e Porecatu), produziu em 2006 a quantia de 239 milhões de litros, com uma produtividade de 1,405 mil litros/vaca.

A região Noroeste Paranaense, com 61 municípios agrupados em 3 microrregiões (Cianorte, Paranavaí e Umuarama) é a quinta na classificação Paranaense de Produção de leite, atingindo em 2006 a produção de 222 milhões de litro e uma produtividade de 1,258 mil litros/vaca. Esta região é vizinha à outra que vem ganhando destaque na produção de Leite no Paraná, a Região Centro Ocidental, que engloba 25 municípios agrupados em duas microrregiões (Campo Mourão e Goioerê).

A Região Centro Ocidental Paranaense não atingiu no ano de 2006 a marca de 100 milhões de litros de leite produzidos, mas encontra-se em uma região que se destaca na produção de produtos alimentícios. Embora tal região detenha baixa produtividade no Estado, poucos investimentos em seleção e alimentação dos animais, podem trazer uma grande oportunidade de aumentar a produção, podendo esta duplicar ou triplicar, sem a necessidade de inclusão de área ou aumento do rebanho.

Dados do Conseleite (2007) mostram que, em 2007, de todo volume captado pelas mais importantes indústrias do Estado, 35,72% foram comercializadas na forma de longa vida, ou seja, configurando-se esta finalidade como o processo industrial a que mais o leite paranaense se destina.

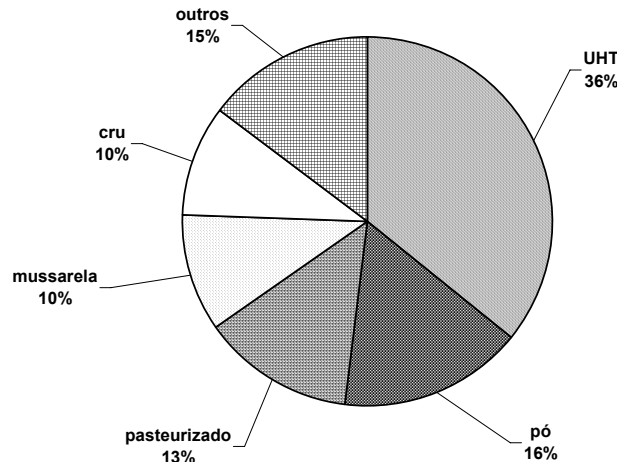


Figura 3: Volume captado pelas mais importantes indústrias do Estado do Paraná. Fonte: Conseleite (2007).

O segundo produto mais comercializado foi o leite em pó (16,16%), seguido pelo leite pasteurizado (13,48%), queijo mussarela (10,13%), leite cru (9,88%) e demais produtos (14,63%).

2.3. Biossíntese e Constituintes do Leite de Vaca

A biossíntese do leite de vaca ocorre na glândula mamária, sob controle hormonal, a partir de nutrientes fornecidos pelo sangue e epitélio glandular. Estes nutrientes são provenientes diretamente da dieta ou são produtos modificados nos tecidos dos animais antes de alcançar a glândula mamária (Frandsom, Wilke e Fails, 2003; Behmer, 1991).

Provavelmente, o leite possui em torno de 100.000 constituintes distintos, embora a maioria deles não tenha ainda sido identificada. A tabela 3 mostra a composição do leite de vaca. Vários componentes não apresentados na tabela estão presentes no leite fluido, como aminoácidos e outros compostos nitrogenados não protéicos, colesterol livre e combinado, elementos minerais adicionais e várias vitaminas.

Tabela 3: Composição nutricional média do leite de vaca

Composição	Percentual
Água	87,0
Lactose	4,90
Caseína	2,90
Alfa-lactoalbumina	0,52
Beta-lactoglobulina	0,20
Lípidios neutros	3,70
Fosfolípidios	0,10
Cálcio	0,12
Fósforo	0,10
Sódio	0,05
Potássio	0,15
Cloro	0,11
Ácido cítrico	0,20

Fonte: Maynard *et al.*, 1984.

A Glândula mamária corresponde a uma glândula sudorípara modificada que secreta leite para nutrição da prole. Nos ruminantes, as glândulas individuais estão tão intimamente associadas e justapostas que a estrutura resultante é chamada no conjunto de úbere.

O úbere da vaca apresenta quatro glândulas mamárias individuais chamadas de quartos mamários. Os quartos mamários são unidades glandulares completamente independentes. O úbere tem revestimento piloso e o teto é completamente sem pelo. O peso do úbere é variável, e no caso da vaca em lactação é de 14 a 32 kg, porém, a capacidade de produção não está totalmente relacionada com o tamanho (Schmidt, 1974; Gurtler, Ketz e Schroder, 1984; Cunningham, 1999).

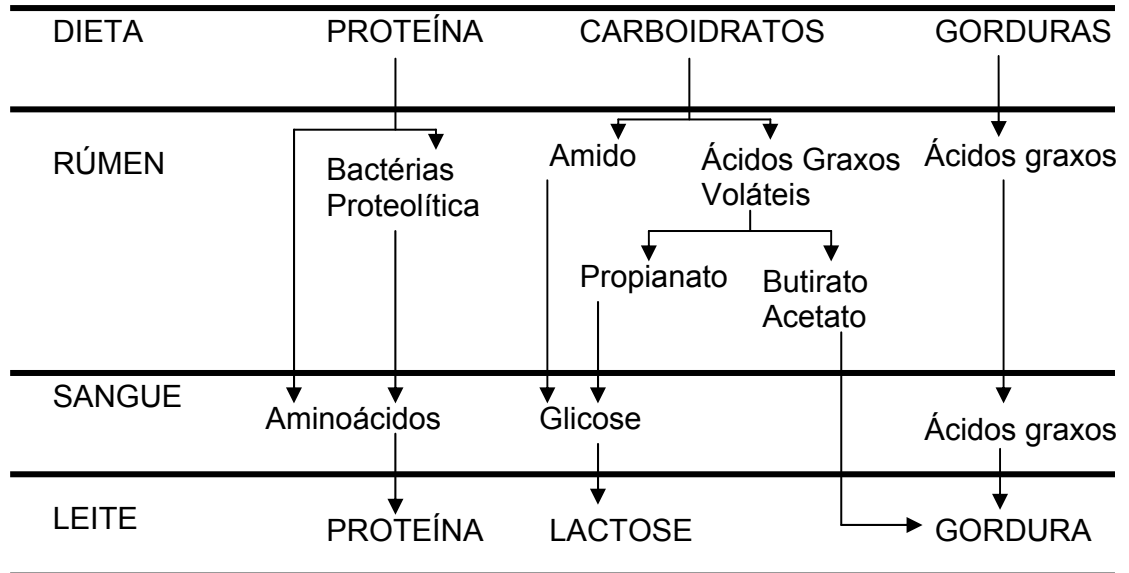
As duas metades do úbere (direita e esquerda) recebem suprimento sangüíneo das artérias ipsilaterais existentes (artéria pudenda externa direita e esquerda). Um intenso fluxo sangüíneo é a condição para uma alta produção secretora das Glândulas Mamárias (Schmidt, 1974).

Para produzir 1 litro de leite é necessário circular pelo úbere 500 litros de sangue. Quando a vaca está produzindo 60 litros de leite por dia, significa que pelo menos 30.000 litros de sangue estão circulando através da glândula mamária (Gurtler, Ketz e Schroder, 1984).

Certos componentes do leite, incluindo lactose, caseína e alguns ácidos graxos, são inquestionavelmente produtos sintéticos das glândulas mamárias, enquanto que outros, como os minerais e as vitaminas, transitam diretamente da

corrente sanguínea (Maynard *et al.*, 1984; Cunningham, 1999; Frandsom, Wilke e Fails, 2003). Um esquema geral dos passos envolvidos na conversão dos componentes da dieta em componentes do leite é mostrado no esquema 1.

Esquema 1: Conversão dos componentes da dieta a componentes do leite.



Fonte: Adaptado de Shimidt, 1974.

O esquema 1 mostra que, parte da proteína do leite tem origem nos aminoácidos absorvidos no intestino e transportados ao sangue, que por sua vez, provém da quebra das proteínas da dieta do animal por bactérias proteolíticas ruminais. As principais proteínas do leite são as caseínas (α , β , e κ -caseína). Elas têm origem da união dos aminoácidos originados do sangue pelas células secretoras da glândula mamária (Schimidt, 1984; Maynard *et al.*, 1984).

Já no soro do leite, as principais proteínas encontradas são as alfa-lactoalbumina e beta-lactoglobulinas (produzidas na glândula mamária), a albumina sérica (produzida pelo fígado) e as imunoglobulinas (produzidas pelos linfócitos). A beta-lactoglobulina representa aproximadamente 50% do total das proteínas do soro do leite. É a principal proteína do soro nos ruminantes e suínos. Não é encontrada no leite de muitas outras espécies, incluindo o leite humano. A função da beta-lactoglobulina não é conhecida, podendo ser responsável pela ligação de ácidos graxos ou lipídios com a proteína. Geralmente é encontrada no leite de espécies que transportam altos níveis de imunoglobulinas durante a formação do colostro. Entretanto, a relação específica entre a presença de beta-

lactoglobulina e o transporte de imunoglobulina permanece desconhecida. As alfa-lactoalbuminas representam aproximadamente 25% do total das proteínas do soro do leite, (Schmidt, 1984; Cunningham, 1999; Frandsom, Wilke e Fails, 2003).

As proteínas secundárias do soro do leite são as soroalbuminas, imunoglobulinas e lactoferrinas. A soroalbumina é proveniente do soro sanguíneo, não sendo sintetizada pela glândula mamária. É presumível que entre no leite por via paracelular, ou por ligação com outros componentes como as imunoglobulinas. Aumentos da concentração de soroalbumina no leite ocorrem especialmente durante a mastite e durante a involução da glândula mamária. A função da soroalbumina no leite é desconhecida. Ela pode se ligar a ácidos graxos, assim como a outras pequenas moléculas.

As imunoglobulinas se apresentam em concentração muito alta no colostro, mas em muito baixas concentrações no leite. Imunoglobulina é parte da imunidade passiva transportada para o neonato via colostro em muitas espécies, como bovinos, suínos, eqüinos, mas não em humanos. Elas são partes do sistema imune mamário.

As lactoferrinas são proteínas ligadas ao ferro, e apresentam propriedades antimicrobianas. O leite bovino tem relativamente baixas concentrações de lactoferrina durante a lactação, mas ocorrem aumentos durante mastite ou involução da glândula mamária. A lactoferrina também pode ser um imunomodulador. No leite humano apresenta altas concentrações, sendo a principal proteína do soro nesta espécie. A lactoferrina é o principal fator de resistência não específica a doenças na glândula mamária.

A renina ou quimosina é uma enzima proteolítica secretada pelas células epiteliais gástricas de mamíferos jovens. Ela altera a característica do leite ingerido do estado líquido para o estado semi-sólido (coagulação). Sua função é formar o coalho e retardar a presença do leite no estômago para que se inicie a digestão protéica e haja melhor aproveitamento (Schmidt, 1984; Maynard *et al.*, 1984).

A fermentação dos carboidratos da dieta no rúmen, resulta na formação de ácidos graxos voláteis, especialmente acetato, propionato e butirato. Apenas pequena quantidade de glicose é capaz de passar pelo rúmen e ser absorvida no

intestino dos ruminantes. Aproximadamente 45 a 60% da glicose é sintetizada a partir do propionato e de aminoácidos glicolíticos, como a alanina, aspartato e asparagina, pela gliconeogênese (Schimidt, 1984).

A gordura do leite se apresenta na forma de glóbulos envolvidos por uma membrana fosfolipídica correspondendo a uma mistura de lipídios, principalmente por triacilgliceróis que compõem aproximadamente 98% do total da gordura do leite, seguido por diacilgliceróis (0,25-0,48%), monoacilgliceróis (0,02-0,4%), glicolipídios (0,006%) e ácidos graxos livres (0,1-0,4%), fosfolipídios e esteróis (Seçkin *et al.*, 2005).

A gordura presente no leite e produtos lácteos é uma das mais complexas existentes, tendo propriedades nutricionais e físicas únicas. Esta gordura pode conter acima de 400 diferentes ácidos graxos, sendo cerca de 30 os principais. Estes diferem quanto ao comprimento da cadeia carbônica, que pode variar de 4 a 24 átomos de carbono. As cadeias possuem diferentes posições das insaturações, configuração posicional, geométrica e grupos funcionais.

O leite de vaca, individualmente, tende a ser de composição constante para a maioria dos componentes, mas existem flutuações periódicas notadamente de gordura, e aparecem mudanças características no decurso da lactação (Cobuci *et al.*, 2000). Com o declínio normal em rendimento, a porcentagem de gordura eleva-se, e a de lactose declina ligeiramente, e para a manutenção das relações osmóticas, seu declínio é compensado por um aumento em cloretos. Estas mesmas mudanças tendem a ocorrer quando o rendimento está sujeito a uma queda anormal em consequência de doença ou outros fatores perturbadores, como a nutrição e condições ambientais (Maynard, 1984).

Sabe-se que condições climáticas exercem influência na produção de leite. O frio vindo repentinamente diminui a produção tanto do leite como em gordura. Com o frio constante, as vacas produzirão mais ou menos o normal se forem bem alimentadas, apenas a gordura será um pouco reduzida. Em situações de calor intenso os animais diminuem a ingestão de alimento o que também prejudica a produção de leite (Shimidt, 1974).

Uma alimentação balanceada contribui para uma produção de leite mais nutritivo, porém, estudos indicam que aumentando a composição da gordura na alimentação não ocorre um aumento na gordura do leite, ou seja, o excesso não é

aproveitado. Por isso a importância de uma alimentação equilibrada (Collomb *et al.*, 2004; González e Campos, 2003).

Os ácidos graxos, o glicerol e outros intermediários são sintetizados no citosol e a biossíntese de triglicerídeos ocorre no retículo endoplasmático das células epiteliais mamárias. A maioria dos lipídios está na forma de triacilglicerol (3 ácidos graxos +1 Glicerol) que têm origem no fígado e atingem a glândula mamária, ou são sintetizados na própria glândula mamária. As glândulas mamárias dos ruminantes necessitam do acetato sangüíneo e do beta_hidroxi-butirato, que são ácidos graxos livres originados na digestão, como fontes de Carbono para a síntese de ácidos graxos.

Há três principais fontes de ácidos graxos. A primeira e mais importante em ruminantes é a síntese a partir do acetato e β -hidroxi-butirato transportados desde o rúmen. O acetato via malonil-CoA, contribui para todos os ácidos de cadeia curta e em parte para os ácidos de até 16 átomos de Carbono em ruminantes. A segunda fonte são os triglicerídeos presentes nos quilomícrons circulantes e lipoproteínas de baixa densidade. Esses ácidos graxos com mais de 14 carbonos de comprimento são originários tanto da dieta como da microbiota do rúmen e são principalmente ácidos palmítico (16:0) e esteárico (18:0), oléico (18:1n-9) e linoléico (18:2n-6). Mais da metade dos Ácidos graxos no leite da vaca deriva diretamente do sangue. A terceira fonte é a acetil-CoA citoplasmática da glicólise e do ciclo do ácido cítrico.

Outros componentes presentes no leite são os minerais primários Ca^{2+} , P, K^+ , Cl^- , Na^+ e Mg^{2+} . Assim como as concentrações de lactose, as de Na^+ e K^+ são normalmente constantes no leite, independente de fatores externos, sendo que estes componentes, juntamente com o cloreto, mantêm o equilíbrio osmótico do leite.

Finalmente, as vitaminas não podem ser sintetizadas pela Glândula Mamária. Elas são sintetizadas pelas bactérias do rúmen, convertidas de precursores no fígado, no intestino delgado e na pele ou derivadas diretamente das fontes alimentares.

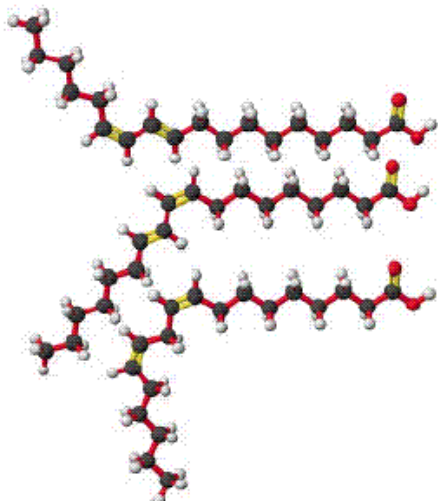
2.4. Ácido Linoléico Conjugado

Um aspecto único na gordura do leite, é a ocorrência de um tipo específico de gordura trans, o ácido vacênico (18:1n-7t).

Os ácidos graxos trans (AGT) são ácidos graxos insaturados contendo uma ou mais duplas ligações na configuração trans (Allinger *et al.*, 1978). A maioria dos AGT é formada durante a hidrogenação de óleos vegetais. Grandes quantidades de AGT como o elaídico (18:1n-9t) têm sido associado com o aumento de risco de doenças cardiovasculares. Estudos em Homens mostram que dietas com AGT estão negativamente relacionadas com a concentração de Lipoproteínas de alta densidade (HDL), enquanto estão positivamente relacionadas com a concentração de lipoproteínas de baixa densidade (LDL).

Apesar da grande polêmica atual envolvendo alimentos que contém gorduras do tipo trans, a gordura trans formada por ruminantes tem uma composição diferente de ácidos graxos do que a gordura trans formada a partir da hidrogenação de óleos. A gordura trans formada pelos ruminantes atua de forma diferente em termos de efeitos na saúde humana. Dados do Nurse's Health Study revelaram que a gordura trans derivada de gordura vegetal aumenta o risco de doenças cardíacas coronárias, enquanto que a gordura trans de origem animal não somente não aumenta o risco, como também é capaz de diminuí-lo (Talpur, Bhanger e Khuhawar, 2006).

A gordura trans presente no leite, o ácido vacênico, é precursora de ácidos graxos específicos de ruminantes, como os ácidos linoléicos conjugados. O ácido linoléico conjugado (do inglês CLA) representa uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoléico (18:2), com duplas ligações conjugadas. Os diferentes isômeros de CLA têm diferentes efeitos fisiológicos, sendo já comprovada a atividade biológica de dois dos seus isômeros, o 18:2 c9t11 e o 18:2 t10c12 (Seçkin *et al.*, 2005; Sieber *et al.*, 2004; Fuente, Luna e Juarez, 2006).



CLA t10c12

CLA c9t11

Ácido linoléico (c9c12)

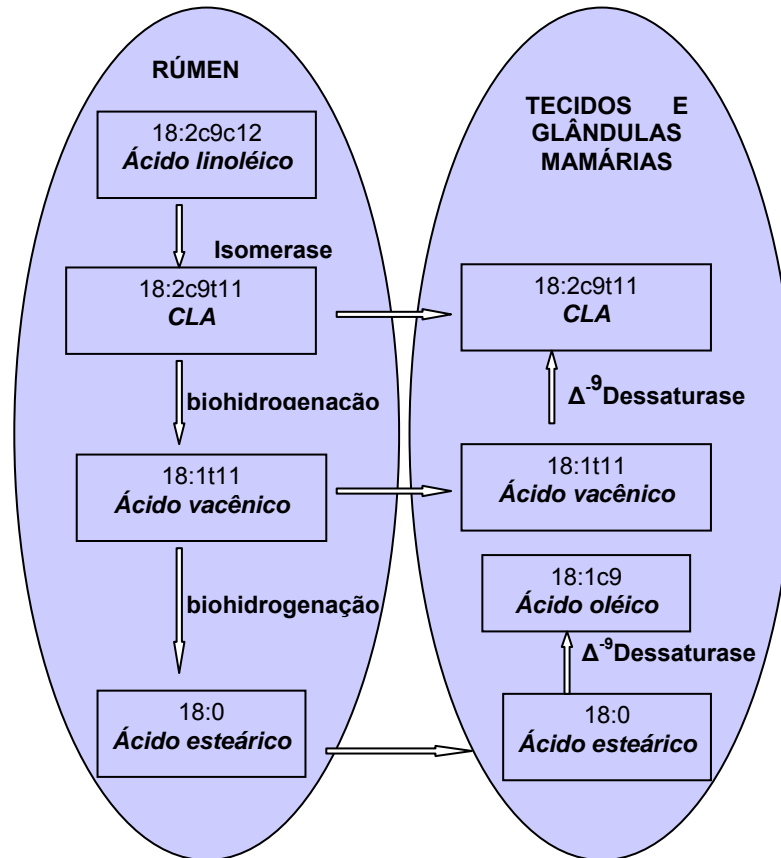
Figura 4: Estrutura do ácido linoléico e dos dois isômeros de CLA com atividade biológica, c9t11 e t10c12.

O isômero t10c12 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 (Fuente, Luna e Juarez, 2006; Mourão *et al.*, 2005; Roach *et al.*, 2002). O isômero c9t11 tem propriedades antitumorais comprovadas, como agente redutor da incidência do câncer de mama (Parodi, 1994; Sieber *et al.*, 2004; Ou *et al.*, 2007).

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. Na América do Norte, Ritzenthaler, recomenda a ingestão de 620 e 441 mg para homens e mulheres, respectivamente (Sieber *et al.*, 2004).

Os CLA's podem ser produzidos sinteticamente e no organismo dos animais, sendo que no organismo ele pode ser formado de duas maneiras: a) Pela biohidrogenação incompleta dos ácidos graxos da dieta; b) Endogenamente, através da dessaturação do ácido graxo *trans* vacênico (18:1n-7t) por uma enzima presente na glândula mamária e tecido adiposo, enzima esta denominada de esteroil-CoA dessaturase ou Δ^9 -dessaturase. No entanto, como o 18:1n-7t é produzido principalmente através da bio-hidrogenação ruminal, este processo é o grande responsável por serem as maiores fontes de CLA os produtos derivados

de ruminantes (Buccione *et al.*, 2006, Martin *et al.*, 2007). O processo de formação do CLA em ruminantes pode ser visualizado no esquema 2.



Esquema 2: Produção de CLA em ruminantes. O quadro da esquerda se refere aos processos que ocorrem no rúmen; o quadro da direita, aos ocorridos na glândula mamária ou tecido adiposo. Adaptado de Bauman (2001).

Os CLAs, como mistura ou isômeros individuais, possuem diferentes efeitos metabólicos e de sinalização celular em uma variedade de tecidos e células *in vivo* e *in vitro*, que poderia explicar os seus benefícios na saúde relatados aos animais e ao homem (Fite *et al.*, 2007; Purushotham *et al.*, 2007; Wahle, Heys e Rotondo, 2004; Bhattacharya *et al.*, 2006). Alguns estudos com humanos de suplementação de CLA com cápsulas têm rendido melhores resultados comparados aos estudos em que foi obtido CLA a partir unicamente da dieta. Isso porque, geralmente, as cápsulas são compostas por misturas equimolares dos isômeros c9t11 e t10c12, enquanto que o CLA proveniente da dieta possui predominantemente o isômero c9t11 e baixíssimos níveis de t10c12.

Sabe-se também que os dois principais isômeros de CLA podem suscitar efeitos similares ou opostos dependendo do número de variáveis, incluindo o tipo de células, tipo de tecido, determinações in vivo ou in vitro, diferentes espécies de mamíferos e de diferentes concentrações administradas. Isto aumenta a complexidade de tentar avaliar os benefícios para a saúde dos diferentes CLAs (Wahle, Heys e Rotondo, 2004; Bhattacharya *et al.*, 2006).

Entretanto, alguns eventos adversos têm sido descritos como associados ao t10c12. Estudos mostrando influências nocivas do isômero t10c12 em sistemas de mamíferos, dizem que o mesmo é um especial motivo de preocupação, até uma explicação lógica pode ser encontrada para tal fato. Entretanto, seria uma banalização levar em consideração apenas o pequeno e recente número de estudos e ignorar o fato de riqueza de informações mostrando os benefícios dos isômeros de CLA para a saúde. Também é interessante notar que nenhum desses efeitos prejudiciais na saúde têm sido notificados para as mais comumente empregadas misturas dos dois principais isômeros de CLA (50:50) ou o para o isômero mais abundante c9t11 (Bhattacharya *et al.*, 2006).

Obviamente, os isômeros de CLAs e suas interações necessitam ser ainda mais estudados, e essas observações com ácidos graxos no que diz respeito à seus possíveis efeitos sobre a saúde devem ser encorajadores. Além disso, a utilização dos isômeros de CLA em uma variedade de alimentos funcionais é uma possibilidade que não deve ser ignorada.

Não só estudos mostrando a ação dos diferentes isômeros de CLA são necessários, como também aqueles onde se determinam quantidades dos seus diferentes isômeros presentes em diferentes matrizes alimentícias. Um desafio tem sido a quantificação desses isômeros em produtos lácteos e seus derivados. Uma vez conhecida a quantidade média dessas substâncias nestes produtos, pode-se estabelecer um parâmetro seguro de ingestão das mesmas, que seja benéfico quanto à ingestão de CLA e também dos ácidos graxos saturados.

Uma forma de analisar ácidos graxos em alimentos é utilizar a cromatografia a gás (CG). Para tal, faz-se necessária a derivatização clássica, ou seja, a conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos. Esse processo permite que os ácidos graxos tornem-se menos polares e mais voláteis.

2.5. Quantificação de ácidos graxos em alimentos por cromatografia a gás

Nas últimas décadas, a comunidade científica tem esclarecido as funções dos lipídios no metabolismo humano, propiciando desta forma, um maior entendimento de suas relações para o desenvolvimento da saúde e também das doenças. Na contra mão desse avanço, o mundo tem acompanhado com alarde, o crescente número de pessoas com problemas de saúde associados à má alimentação, como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares.

Os ácidos graxos, além de serem a maior fonte de energia por grama, possuem ainda a característica de não sofrer alteração em sua estrutura durante a digestão. Portanto, aquilo que o homem ingerir em termos de composição de ácidos graxos será automaticamente refletido em seu organismo.

Desta forma, a redução de ácidos graxos saturados na dieta, e mais recentemente, a diminuição da ingestão de ácidos graxos *trans* de origem vegetal, têm sido enfatizados. Além disso, recomenda-se a ingestão de ácidos graxos como os da família ômega-3, que são essenciais ao organismo, além daqueles que trazem benefícios à saúde, como os CLAs,

O avanço no estudo da Química de Alimentos está totalmente relacionado ao surgimento e aprimoramento da cromatografia em fase gasosa (CG). Esta técnica tem sido desde a sua origem, no início da década de 1950, indispensável para o estudo de misturas complexas de ácidos graxos (Ackman, 2002).

Com a introdução, no final da década de 1970, de suportes para colunas cromatográficas constituídos de sílica fundida, e subsequentemente com o intenso desenvolvimento de fases estacionárias líquidas, a utilização de colunas capilares tornou-se cada vez mais comum (Barry, 1995). Associado a isto, o aumento de pratos teóricos promovido pelo desenvolvimento de colunas capilares maiores, possibilitaram a separação de misturas complexas, permitindo a aplicação da técnica analítica em análises de rotina em laboratórios de cromatografia (Ackman, 1972).

Estes avanços tiveram um grande impacto no estudo dos ácidos graxos, contribuindo, entre outros aspectos, para a investigação mais detalhada sobre a existência de isômeros posicionais e geométricos com funções biológicas distintas, que antes não haviam sido separados ou identificados.

A CG é a técnica que mais tem sido aplicada ao estudo dos ácidos graxos, devido principalmente ao desenvolvimento de fases estacionárias que possibilitam a separação dos diversos isômeros posicionais e geométricos existentes na mistura.

Os ácidos graxos, por CG, são analisados preferencialmente sob a forma de ésteres metílicos e a eficiência da separação é muito dependente da temperatura de análise e do comprimento da coluna (Ledoux, Laloux e Wolff, 2000). Assim, para que possa ser utilizada esta técnica, é necessário uma derivatização clássica, ou seja, a conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos. Esse processo permite que o ácido graxo torne-se menos polar e mais volátil (Fuente, Luna e Juarez, 2006). Os ésteres metílicos de ácidos graxos são os derivados mais utilizados devido à grande quantidade de procedimentos disponíveis na literatura.

Para análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos, são utilizadas geralmente colunas com 50 a 100 m de comprimento, contendo fase estacionária de elevada polaridade, como aquela constituída de cianoalquil polisiloxano (Figura 5). A separação dos ésteres metílicos de ácidos graxos pode ser realizada em três diferentes tipos de coluna, com fase estacionária apolar, polar e muito polar (Christie, 1998).

No entanto, para análise de ácidos graxos em alimentos as colunas polar e muito polar são as mais utilizadas porque, evitam a co-eluição dos ésteres metílicos de ácidos graxos poliinsaturados e permitem uma melhor separação dos isômeros cis-trans presentes nas matrizes, baseada na volatilidade desses compostos (Fuente, Luna e Juarez, 2006; Roach *et al.*, 2002).

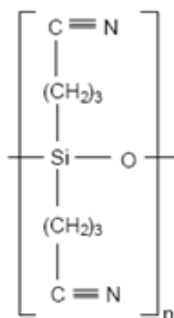


Figura 5: Estrutura da fase estacionária da coluna CP-Sil 88 utilizada na análise de Ácidos graxos (Ratnayake, 1998).

Nos últimos anos começaram a ser produzidas colunas contendo fases estacionárias de alta polaridade, sendo quimicamente ligadas. Esta tecnologia aumenta a resistência mecânica da fase estacionária e confere uma maior estabilidade térmica, resultando no aumento do tempo de vida útil da coluna, entre as quais se destaca a CP Select CB-FAME por ser 100% ligada quimicamente (Peene *et al.*, 2003).

Infelizmente, CG sozinha não é eficiente para separar alguns isômeros individualmente. Para tal, são utilizadas técnicas complementares como Cromatografia Líquida de alta eficiência com coluna de prata (CLAE/Ag⁺), ou ainda uma pré-separação usando Cromatografia em camada delgada recoberta com íons prata (CCD/Ag⁺). Essas técnicas são as ferramentas poderosas para separação de isômeros, entretanto, para controle de qualidade de laboratórios, técnicas mais simples são requeridas, uma vez que as mostradas acima consomem muito tempo e dinheiro (Golay *et al.*, 2007; Roach *et al.*, 2002).

A separação de isômeros empregando CCD/Ag⁺ associada à análise por CG foi muito empregada nas últimas décadas, permanecendo ainda em uso. Os ácidos graxos geralmente são fracionados sob a forma de ésteres metílicos e o processo baseia-se na formação de complexos entre o íon prata e as duplas ligações. Assim, quanto maior o número de duplas ligações do ácido graxo, maior será a extensão da complexação. Devido ao impedimento estérico ocasionado pela presença de insaturações *trans*, os complexos formados com estas duplas ligações apresentam menor estabilidade que os seus correspondentes *cis*. Por conseguinte, o fator de retenção dos ésteres metílicos depende principalmente da configuração geométrica das ligações etilênicas e do grau de insaturação do ácido graxo (Dobson, Christie e Nikolova-Damyanova, 1995).

Embora esta técnica seja extremamente acessível e muito eficaz na separação entre os ácidos graxos *cis*, *trans* e saturados, diversas dificuldades operacionais estão relacionadas à sua aplicação. Entre estas se destacam: a preparação e o manuseio das placas em local pouco iluminado, o risco de contaminação entre as frações *cis* e *trans*, a influência da temperatura sob a separação, o elevado tempo de análise e a necessidade de um treinamento intenso do analista (Ratnayake, 1998).

Na CLAE/Ag⁺ foi inicialmente empregado colunas de sílica gel impregnadas com nitrato de prata. Nestas colunas, o tempo de uso é grandemente limitado pela eluição dos íons Ag⁺. Para contornar este problema têm sido utilizadas pré-colunas saturadas com nitrato de prata, mas a eluição de íons Ag⁺ contamina as frações, podendo ainda danificar o sistema de detecção do equipamento. O uso destas colunas tem sido restrito, principalmente por não serem comercializadas, o que implica em seu preparo no laboratório, requerendo experiência para isto (Dobson, Christie e Nikolova-Damyanova, 1995; Cristhie, 1998).

Devido dificuldades associadas ao uso de colunas preparadas por impregnação, foram desenvolvidas colunas com trocadores catiônicos ligados a espécie Ag⁺, para serem utilizadas em Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE). A perda de íons Ag⁺ nestas colunas é limitada, uma vez que a prata encontra-se unida a resina através de ligação iônica. Em geral, a resolução destas colunas é gradualmente diminuída após três meses de uso contínuo (Neff, Adlof e El-Agaimy, 1994).

O processo de derivatização, necessário para análise de ácidos graxos por CG, pode gerar problemas associados com a preparação dos ésteres, os quais incluem: conversão incompleta dos lipídios aos ésteres metílicos de ácidos graxos; mudança na composição dos ácidos graxos durante a transesterificação; formação de artefatos que podem ser erroneamente identificados como ácidos graxos ou sobreposição com picos de ésteres metílicos de ácidos graxos na análise por CG; contaminação e subsequente dano a coluna cromatográfica resultante de traços do reagente esterificante; extração incompleta de ésteres metílicos de ácidos graxos e perda de ésteres metílicos de ácidos graxos de cadeia curta e muito voláteis (Milinsk *et al.*, 2008).

Os processos de derivatização mais utilizados para análise de ácidos graxos, podem envolver uma catálise ácida ou uma catálise básica. A metilação por catálise básica usando NaOCH₃ ou KOH em metanol, à temperatura ambiente, tem sido considerada a determinação de maior confiança para identificação de isômeros conjugados de ácidos graxos, como os do ácido linoléico, porque ela não causa isomerização e não produz artefatos. Além disso, reduz a perda de ácidos graxos de cadeia curta. Entretanto, o KOH com metanol não é capaz de reagir com ácidos graxos livres e não metila completamente os

fosfolipídios, o que tornam duvidosos os resultados de quantificação dos ácidos graxos (Fuente, Luna e Juarez, 2006).

A metilação por catálise ácida empregando BF_3 , HCl ou H_2SO_4 favorece uma extensiva isomerização de dienos conjugados e contribui para formação de artefatos alílicos metoxilados, além de atrasar a análise cromatográfica (Fuente, Luna e Juarez, 2006).

Quando é utilizada a técnica da cromatografia à gás para análise de alimentos, o detector de ionização de chama é o mais conveniente devido à quantidade mínima detectável (10^{-12}g), resposta quase universal, faixa de linearidade e resposta rápida. Apesar de responder a propriedades do soluto, este é sensível ao fluxo de massa que passa por ele. No entanto, a resposta do detector de ionização de chama é diferencial, ou seja, a magnitude do sinal é proporcional ao número de carbono ativo, logo ésteres metílicos com diferentes cadeias carbônicas apresentarão diferentes respostas no detector de ionização de chama (Collins, Braga e Bonato, 2006; Visentainer e Franco, 2006).

Na análise de lipídios por CG faz-se a identificação dos componentes da amostra através da comparação dos tempos de retenção dos compostos com aqueles obtidos através da injeção de padrões contendo as substâncias a serem analisadas. No entanto, este procedimento não é conclusivo, pois componentes diferentes podem ter o mesmo tempo de retenção. Alternativas usadas na identificação são: A) a adição de padrão (*spiking* ou fortificação), B) utilização de padrão secundário, C) métodos gráficos, D) uso de colunas com diferentes polaridades e E) índices sistemáticos de retenção. Dentre estes, o índice de retenção de Kovats é um método que se baseia no comprimento equivalente da cadeia (ECL, do inglês, *Equivalent Chain Length*) e é muito aplicado por ser um método simples, de fácil aplicação e de baixo custo (Visentainer e Franco, 2006).

Na análise por cromatografia a gás com detector de ionização de chama, o método da normalização de área é muito utilizado, porém, apresenta limitações como a necessidade de eluição e detecção de todos os componentes injetados, o que nem sempre ocorre devido à discriminação ou retenção irreversível de algum componente, bem como a consideração de que a resposta do detector é a mesma para todos os componentes, o que não acontece, pois o do detector de ionização de chama apresenta resposta diferencial.

O uso de adição de um padrão interno tem sido muito empregado na análise de ácidos graxos, pois possibilita expressar os resultados em massa. Este método é menos susceptível a erros, uma vez que o padrão interno e a amostra são injetados juntos. Através da utilização de fatores de correção é possível expressar os resultados em massa de ácidos graxos e não de ésteres metílicos de ácidos graxos (Ackman e Sipos, 1964; Visentainer e Franco, 2006).

O padrão interno a ser empregado na quantificação dos ácidos graxos deve apresentar alguns requisitos básicos como: não estar presente na amostra, ter alto grau de pureza, estabilidade, ser acessível, de baixo custo, eluir separadamente e próximo dos componentes da amostra entre outros (Eder, 1995; Brondz, 2002).

A espectrometria de massas pode substituir a cromatografia em fase gasosa como técnica de separação, dispensando o uso de padrões para identificação ou quantificação, porém, ainda é uma técnica de alto custo de aquisição e manutenção (Mendham, 2002).

2.6. Modelagem Fatorial das Respostas Obtidas

As modelagens computacionais desenvolvem modelos empíricos, ou seja, descrevem, com base em evidências experimentais, o comportamento de um processo estudado, uma vez que os modelos mecanísticos (baseados em leis) se tornam difíceis de analisar, devido ao grande número de variáveis que afetam o processo (Neto, Scarminio e Bruns, 1995).

Um dos maiores problemas químicos está em determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável de interesse. Para estudar o efeito de qualquer fator sobre uma resposta, precisa-se fazê-lo variar de nível e observar o resultado que a variação produz na resposta, então neste sentido, dentro dos planejamentos fatoriais, determina-se uma ou mais variáveis sobre outra variável de interesse e decidem-se quais são as respostas interessantes. O conhecimento prévio de literatura é o ponto principal para se escolher em foco as variáveis e as respostas.

Os resultados obtidos de um planejamento fatorial, calculados através de algoritmos em programas computacionais, indicam a porcentagem de

melhoria ou não dos processos químicos quando se eleva a concentração de um nível a outro, ou seja, os experimentos são feitos em dois níveis de concentração (um alto e um baixo).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Determinar a Composição Química e Quantificar os ácidos graxos presentes em amostras de Leite e Derivados, por cromatografia gasosa, com detecção por ionização em chama, com ênfase para a análise do Ácido Linoléico Conjugado.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Verificar a composição química em termos de umidade, cinzas, proteínas e lipídios de amostras de leites crus e pasteurizados, bebida láctea, bem como de 4 tipos de queijos, sendo eles, mussarela, minas frescal, provolone e ricota.
- ✓ Validar o método de transesterificação utilizado para análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos, através da verificação de sua aplicabilidade e confiança mediante comparação com análise de uma amostra certificada.
- ✓ Quantificar os ácidos graxos presentes nas amostras acima citadas;
- ✓ Analisar os ácidos graxos presentes nos leites crus provenientes de diferentes produtores, e traçar um perfil entre as características individuais dos animais e o produto final.
- ✓ Comparar os ácidos graxos presentes nos leites crus provenientes dos diferentes produtores, com leites que passaram pelo processo de pasteurização, visando estabelecer se esse processo interfere na quantidade de ácido linoléico conjugado.

- ✓ Verificar se a estação do ano (verão e inverno) interfere nas características químicas e quantidade de ácidos graxos presentes nas amostras de leites, bebida láctea e queijos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Amostragem

4.1.1. Leites Crus

Foram analisados os leites de 430 animais da raça Holandesa, com idades entre 3 e 7 anos, em período médio de lactação (150 dias) e com saúde excelente, de produtores de 9 fazendas da região Centro Ocidental Paranaense no Brasil. Os animais foram alimentados com concentrados e a alimentação complementada com volumosos de boa qualidade à vontade. Os volumosos da região são predominantemente compostos por gramíneas do tipo mombaça (*Panicum maximum cv. Mombaça*), tanzânia (*Panicum maximum cv. tanzânia*) e braquiária (*Brachiaria brizantha cv. Marandu*).

A cada um dos produtores, foi cedido três frascos coletores de 250 mL cada, previamente esterilizados, para que, após a ordenha dos animais, o leite cru pudesse ser coletado para posterior análise. Foram coletadas amostras em três semanas consecutivas dos meses de janeiro e julho de 2007 (verão e inverno, respectivamente). Após recolhimento, os frascos foram imediatamente resfriados e congelados, sendo transportados em recipientes térmicos.

4.1.1. Leites pasteurizados, Bebida Láctea e Queijos

A amostragem foi realizada em laticínio da Região Centro Ocidental Paranaense, o qual industrializa o leite recebido de aproximadamente 110 produtores da região, incluindo aqueles acima citados. São produzidos os leites pasteurizados integrais, além de bebida láctea que utiliza certa proporção do soro obtido no preparo dos queijos tipo mussarela, provolone, ricota e minas frescal.

Foram coletadas amostras em três semanas consecutivas dos meses de janeiro e julho de 2007 (verão e inverno, respectivamente). Depois de separadas as amostras, estas foram imediatamente congeladas para posterior análise.

4.2. Métodos

4.2.1. Análise Química

Conforme métodos da AOAC (Cunniff,1998), a umidade foi determinada por aquecimento em estufa (105°C), e o teor de cinzas por incineração em mufla (600°C). O nitrogênio total foi analisado segundo método Kjeldahl, e utilizado o fator 6,38 para conversão do percentual de nitrogênio em percentual protéico.

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).

4.2.2 Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos

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⁻¹ em metanol – dietil éter (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.

4.2.3. Identificação e Quantificação dos ésteres de ácidos graxos

4.2.3.1. Análise cromatográfica dos ésteres de ácidos graxos

Os ésteres de ácidos graxos foram analisados por um cromatógrafo a gás CP-3380 (Varian, EUA), equipado com detector de ionização em chama e coluna capilar de sílica fundida CP-7420 (100 m, 0,25 mm e 0,39 μm i.d, 100 % cianopropil ligado, Varian, EUA).

As vazões dos gases (White Martins), foram de 1,4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o gás de arraste (H_2); 30 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o gás auxiliar (N_2) e 30 e 300 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o H_2 e para o ar sintético da chama, respectivamente. A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/80.

As temperaturas do injetor e do detector foram 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 áreas dos picos foram determinadas pelo software star (Varian).

As injeções foram realizadas em triplicatas e os volumes de injeção foram de 2 μL . A identificação dos ácidos graxos foi baseada na comparação dos tempos de retenção com o de ésteres metílicos de padrões contendo os isômeros geométricos c9t11 e t10c12 do ácido linoléico (189-19 e O-5626, Sigma, EUA) e nos valores do comprimento equivalente da cadeia (ECL).

Os valores do comprimento equivalente da cadeia (ECL) para os ésteres de ácidos graxos, foram determinados conforme proposto por Visentainer e Franco (2006), e encontram-se em anexo (Anexo 1). A identificação foi baseada nos valores de ECL determinados para a padrão 189-19 (Sigma, EUA).

Os limites de detecção e quantificação foram estimados conforme recomendação da ACS (1980), considerando a razão sinal ruído igual a três e dez respectivamente, a partir de diluições sucessivas de uma solução padrão de araquidato de metila.

4.2.4. Quantificação

A quantificação dos ácidos *graxos*, em mg g^{-1} de lipídios totais, foi efetuada em relação ao padrão interno, tricosanoato de metila (23:0), Sigma. Antes da transesterificação, adicionou-se 1,00 mL da solução do padrão interno (1 mg mL^{-1}) em todas as amostras, e o solvente foi evaporado sob fluxo de N_2 .

A quantificação dos ácidos *graxos* das amostras foi realizada após a verificação da concordância entre os fatores de resposta teórico e experimental (Anexo 2).

Os cálculos da concentração dos ácidos *graxos* contidos nas amostras foram realizados conforme Visentainer e Franco (2006), pela equação:

$$C \text{ (mg/g)} = \frac{A_X \cdot M_{23:0} \cdot F_{RT}}{A_{23:0} \cdot M_A \cdot F_{CT}}$$

onde:

A_X = área dos ésteres metílicos dos ácidos *graxos*

$A_{23:0}$ = área do padrão interno;

$M_{23:0}$ = massa do padrão interno adicionado a amostra (em miligramas);

M_A = massa da amostra (em gramas);

F_{RT} = fator de resposta teórico dos ésteres metílicos de ácidos *graxos*;

F_{CT} = fator de conversão para expressar os resultados em mg de ácidos *graxos*/g de lipídios totais (LT).

Foi utilizado material de referência certificado (leite em pó) para confirmação da exatidão do método utilizado. O material de referência (RM-8435) foi obtido do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia do Canadá (NIST).

4.2.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com o *software* Statistica, versão 5.0.

Para avaliar os efeitos da estação do ano e idade dos animais na composição em ácidos graxos dos leites cru fornecidos pelos diferentes produtores, bem como avaliar o impacto do processo de pasteurização na quantidade dos ácidos graxos majoritários presentes na gordura dos leites analisados, foi realizado um planejamento fatorial para modelagem das condições experimentais. Todas as respostas foram analisadas pelo Programa Design Expert (Neto *et al.*, 2001) para seleção dos modelos fatoriais.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises Químicas

A análise de variância para a composição química dos leites crus provenientes de diferentes produtores, no verão e inverno, bem como dos leites após processo de pasteurização e industrialização, são mostradas nas tabelas 4 e 5. Não houveram diferenças significativas entre os leites crus dos diferentes produtores e os leites pasteurizados, em relação á composição química verificada tanto na amostragem de inverno quanto na do verão. Apenas a bebida láctea teve resultados significativamente diferentes quanto à umidade e teor lipídico.

Os dados obtidos para a amostragem realizada no verão, revelaram que os queijos tidos como “magros”, na realidade apresentaram percentual lipídico superior àquele verificado para o queijo mussarela, considerado semi-gordo (Tabela 6). Isso pode indicar a adição de leite integral às massas dos queijos minas frescal e ricota, para aumentar o rendimento e também a aceitabilidade do produto. Entretanto, na amostragem realizada no período do inverno (Tabela 7), o percentual lipídico do queijo mussarela aumentou significativamente em relação ao período do verão ($16,56 \pm 0,99$ e $23,53 \pm 1,48$, respectivamente). De forma semelhante, o teor de lipídios para a ricota produzida no período do inverno ($15,98 \pm 1,57$) diminuiu em relação aos percentuais encontrados para as amostras produzidas no verão ($19,26 \pm 1,46$).

Tabela 4 – Composição química dos leites crus provenientes de diferentes produtores e dos leites pasteurizados e bebida láctea no verão.

	% Umidade	% Cinzas	% Proteína	% Lipídios
LCP1	88,07 ^b ± 0,38	0,56 ^{a,b} ± 0,04	3,29 ^{a,b,c} ± 0,16	3,44 ^{a,b} ±0,29
LCP2	88,86 ^{a,b} ± 0,25	0,59 ^a ± 0,04	3,39 ^{a,b} ± 0,05	3,26 ^{a,b} ±0,17
LCP3	88,64 ^{a,b} ± 0,32	0,47 ^{a,b} ± 0,07	3,48 ^a ± 0,14	3,48 ^{a,b} ±0,28
LCP4	88,53 ^{a,b} ± 0,07	0,46 ^{a,b} ± 0,06	3,40 ^a ± 0,12	3,22 ^{a,b} ±0,38
LCP5	88,74 ^{a,b} ± 0,39	0,40 ^{a,b} ± 0,06	3,70 ^a ± 0,18	3,73 ^{a,b} ±0,21
LCP6	88,78 ^{a,b} ± 0,62	0,54 ^{a,b} ± 0,08	3,53 ^a ± 0,12	4,01 ^a ±0,13
LCP7	88,12 ^{a,b} ± 0,62	0,39 ^b ± 0,01	3,44 ^a ± 0,26	3,36 ^{a,b} ±0,41
LCP8	88,81 ^b ± 1,11	0,57 ^{a,b} ± 0,03	3,43 ^a ± 0,16	3,40 ^{a,b} ±0,35
LCP9	88,60 ^{a,b} ± 0,53	0,51 ^{a,b} ± 0,03	3,50 ^a ± 0,23	3,13 ^{a,b} ± 0,09
LC	89,12 ^{a,b} ± 0,17	0,48 ^{a,b} ± 0,03	2,88 ^{b,c} ± 0,06	3,04 ^b ± 0,10
LB	90,23 ^a ± 0,49	0,63 ^a ± 0,06	2,53 ^{c,d} ± 0,25	3,14 ^{a,b} ±0,17
BL	81,52 ^c ± 0,28	0,39 ^b ± 0,08	2,18 ^d ± 0,09	2,32 ^c ±0,24

Resultados expressos em percentagem como média±desvio padrão dos resultados das análises em triplicata de três diferentes lotes (n=9). Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. LCP=Leite cru produtor 1 a 9; LC=Leite pasteurizado Integral tipo C; LP=leite pasteurizado integral tipo B; BL=Bebida Láctea.

Tabela 5 – Composição química dos leites crus provenientes de diferentes produtores e dos leites pasteurizados e bebida láctea no inverno.

	% Umidade	% Cinzas	% Proteína	% Lipídios
LCP1	89,29 ^a ±2,58	0,66 ^a ±0,03	3,41 ^{a,b,c} ±0,16	4,09 ^a ±0,14
LCP2	88,73 ^a ±0,82	0,61 ^a ±0,02	3,67 ^{a,b} ±0,22	3,52 ^a ±0,15
LCP3	88,79 ^a ±1,05	0,63 ^a ±0,04	3,59 ^{a,b} ±0,38	3,32 ^{a,b} ±0,24
LCP4	88,01 ^a ±0,25	0,57 ^a ±0,05	4,05 ^a ±0,25	3,56 ^a ±0,43
LCP5	87,94 ^a ±0,34	0,66 ^a ±0,03	3,44 ^{a,b} ±0,10	3,58 ^a ±0,31
LCP6	88,13 ^a ±1,41	0,58 ^a ±0,02	3,59 ^{a,b} ±0,19	3,15 ^{a,b} ±0,36
LCP7	87,37 ^a ±0,73	0,70 ^a ±0,12	3,85 ^{a,b} ±0,44	3,26 ^{a,b} ±0,20
LCP8	88,63 ^a ±0,61	0,65 ^a ±0,07	3,34 ^b ±0,12	3,23 ^{a,b} ±0,41
LCP9	88,69 ^a ±0,88	0,67 ^a ±0,04	3,57 ^{a,b,c,d} ±0,41	3,07 ^{a,b} ±0,39
LC	88,20 ^a ±0,04	0,62 ^a ±0,05	3,43 ^{a,b} ±0,23	3,39 ^a ±0,23
LB	88,93 ^a ±1,38	0,44 ^b ±0,03	2,43 ^{c,d} ±0,13	3,08 ^{a,b} ±0,35
BL	81,68 ^b ±0,20	0,37 ^b ±0,04	2,27 ^d ±0,16	2,18 ^b ±0,15

Resultados expressos em percentagem como média±desvio padrão dos resultados das análises em triplicata de três diferentes lotes (n=9). Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade. LCP=Leite cru produtor 1 a 9; LC=Leite pasteurizado Integral tipo C; LB=leite pasteurizado integral tipo B; BL=Bebida Láctea.

De acordo com a portaria nº. 366 do Ministério da Agricultura (Brasil, 1997c), o queijo mussarela é classificado como de alta umidade, semi-gordo e de consistência semi-dura, devendo possuir um mínimo de 35% de gordura (extrato seco) e um máximo de 60% de umidade. As amostras do queijo mussarela analisadas (n=9) enquadraram-se dentro destes parâmetros, sendo que o percentual de gordura em extrato seco foi de aproximadamente 36% para as amostras produzidas no verão e 46% para aquelas produzidas no inverno.

Uma grande variabilidade é encontrada na literatura nacional em relação à composição de queijos do tipo ricota e minas frescal. Cruz e Gomes (2001) encontraram valores de percentual lipídico entre 13 a 23,7% para queijos minas frescal, e entre 6,7 a 25,7% para ricotas, comercializadas na região de Botucatu, SP. Machado *et al.*, (2004) analisaram queijos minas frescal artesanais produzidos na região do Serro, MG, e encontraram valores percentuais médios de $29,22 \pm 3,47\%$ para lipídios totais, $17,06 \pm 2,61\%$ para proteína total, $50,84 \pm 3,03\%$ para umidade e $3,79 \pm 0,60\%$ para cinzas. Neste trabalho, o percentual protéico e de cinzas foram menores que os verificados por estes autores.

Rocha (2004) encontrou também uma grande variabilidade de composição lipídica para ricotas comercializadas em supermercados de Brasília (DF), sendo que foram encontrados valores entre 13 a 37% de gordura nas cinco diferentes marcas analisadas, e para a mussarela, a variação foi entre 29 a 36,6% de gordura (extrato seco). Atribuiu-se a isso o fato do Ministério da Agricultura não especificar o que é um queijo tipo ricota e nem o quanto ele deve conter em gordura ou proteína (Brasil, 1997 b).

Tabela 6 – Composição química dos queijos produzidos no verão.

	%Umidade	% Cinzas	% Proteína	% Lipídios
Mussarela	$43,37^c \pm 1,56$	$4,17^b \pm 0,18$	$25,06^a \pm 0,39$	$16,76^d \pm 0,99$
Provolone	$37,26^d \pm 0,38$	$4,71^a \pm 0,11$	$25,83^a \pm 0,56$	$22,96^a \pm 1,30$
Minas Frescal	$62,36^b \pm 2,54$	$2,07^c \pm 0,20$	$11,13^b \pm 0,64$	$20,82^b \pm 0,99$
Ricota	$67,78^a \pm 1,06$	$1,97^c \pm 0,11$	$8,60^c \pm 0,64$	$19,26^c \pm 1,46$

Resultados expressos em percentagem como média±desvio padrão dos resultados das análises em triplicata de três diferentes lotes (n=9). Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

Tabela 7– Composição química dos queijos produzidos no Inverno.

	%Umidade	% Cinzas	% Proteína	% Lipídios
Mussarela	43,79 ^a ±0,89	4,40 ^a ±0,14	23,54 ^a ±0,72	23,53 ^a ±1,48
Provolone	38,18 ^b ±1,70	5,23 ^b ±0,05	25,19 ^b ±1,20	22,98 ^a ±2,23
Minas Frescal	61,15 ^c ±0,71	2,28 ^c ±0,26	8,86 ^c ±0,50	20,69 ^b ±0,80
Ricota	66,84 ^d ±1,97	2,61 ^d ±0,25	9,87 ^c ±0,91	15,98 ^c ±1,57

¹Resultados expressos em percentagem como média±desvio padrão dos resultados das análises em triplicata de três diferentes lotes (n=9). Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, em nível de 5% de probabilidade.

5.2. Análise da amostra certificada

Foi utilizado material de referência certificado (leite em pó) para confirmação da exatidão do método de quantificação utilizado, cujas informações podem ser visualizadas no Anexo 3. A amostra certificada teve os lipídios extraídos através do mesmo método utilizado para as amostras reais, sendo então esterificada também de forma semelhante àquela realizada para as amostras reais.

Como pode ser verificada na tabela 8, houve uma ótima percentagem de recuperação. Assim, o método utilizado neste trabalho pode ser aplicado em amostras comerciais para quantificação de ácidos graxos.

Tabela 8: Análise da amostra certificada

Ácido Graxo	Valores experimentais (%)	Valores teóricos* (%)	%recuperação
4:0	4,97±0,44	4.84	102.85
10:0	3,58±0,19	3.29	108.86
12:0	3,89±0,07	3.80	102.23
14:0	12,48±0,06	12.77	97.71
14:1n-9	1,11±0,01	1.03	107.23
15:0	1,30±0,01	1.42	91.34
16:0	31,67±0,50	33.38	94.88
16:1n-9	1,16±0,06	1.41	82.54
17:0	0,85±0,01	0.90	94.79
18:0	11,35±0,35	11.78	96.27
18:1n-9	14,46±0,24	16.62	87.00
20:0	0,24±0,08	0.24	100.24

* Valores obtidos da rotulagem da amostra certificada.

5.3. Quantificação dos ácidos graxos e Modelagem dos experimentos

5.3.1. Verificação dos fatores Estação e Idade dos animais para os leites crus

Com a finalidade de avaliar a interferência da estação do ano e da idade dos animais na quantidade dos principais ácidos graxos presentes na gordura do leite, foi realizada uma modelagem fatorial, cujas condições estão listadas na tabela 9.

Foram tentativamente identificados e quantificados 27 ácidos graxos presentes na gordura dos leites analisados. O perfil dos cromatogramas para os leites podem ser visualizados no anexo 4.

Tabela 9: Condições pré-estabelecidas de Estação do ano e Idade dos animais para o planejamento fatorial.

Variável	Nível Baixo	Nível Alto
Estação do ano	Inverno	Verão
Idade dos animais	3 a 4 anos	5 a 7 anos

Modelagens de alguns parâmetros experimentais foram feitas por modelo fatorial. O planejamento foi feito com o objetivo de analisar o efeito da estação do ano e idade dos animais sobre a quantidade, em miligramas de ácidos graxos por grama de lipídios totais, para os ácidos graxos majoritários presentes na gordura do leite, 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 18:1t, 18:1n-9, além do 18:2c9t11, ômega-6, ômega-3 e razão n-6/n-3.

A Tabela 10 apresenta a análise realizada pelo modelo fatorial 2^2 pelo programa ANOVA e seu respectivo modelo de primeira-ordem. Observa-se que nenhuma das variáveis é totalmente insignificante neste modelo. Baseado nesta análise, os valores em mg g^{-1} de cada ácido graxo como função de Estação (E) e Idade (I) podem ser descritos com 95% de confiança pelas equações abaixo listadas.

Tabela 10: Análise de variância (ANOVA) obtida pelo design fatorial de 2² e seu respectivo modelo para a resposta da quantidade de ácidos graxos.

Ácido Graxo	Equação
Láurico	12:0 = 23,72 – 3,81*E -2,12*I – 0,75*E*I
Mirístico	14:0 =86,31 + 2,855*E - 7,84*I + 3,305*E*I
Palmítico	16:0 = 246,3725 + 7,8425*E - 21,5275*I + 8,1225*E*I
Estearico	18:0 = 90,28+2,93*E – 2,23*I + 2,14*E*I
18: 1 t	18:1t = 23,3075 - 3,5175*E + 1,3375*I - 0,8775*E*I
Oléico	18:1n-9 =189,77 - 11,02*E + 0,425*I + 2,335*E*I
Rumênico ou CLA	CLA = 7,60 + 1,23 *E + 1,15*I + 0.80*E*I
∑ n-6	n-6 = 21,62 - 4,88*E
∑ n-3	n-3 =2,92 +0,42*E + 0,43*I
n-6/n-3	n-6/n-3 = 8,00 – 2,89*E – 1,31*I + 0,48*E*I

E = Estação do ano; I = idade média dos animais; n-6 = somatório de ácidos graxos ômega 6; n-3 = somatório de ácidos graxos ômega 3. Resultados descritos com 95% de confiança.

Para montagem da tabela 11, que trás as condições pré-estabelecidas pelo modelo fatorial 2², foram utilizadas as médias das médias encontradas para cada produtor (Anexos e 6). Os produtores 1, 2, 3, 6 e 7 foram aqueles que possuíam o rebanho mais novo (em média 4 anos), enquanto que os produtores 4,5,8 e 9 possuíam o rebanho mais velho (em média 6 anos).

Tabela 11: Condições pré-estabelecidas para quatro experimentos realizados para verificação da quantidade de cada ácido graxo pelo modelo fatorial 2^2 na combinação de níveis altos e baixos de Idade e Estação do Ano.

Estação	Idade	12:0 (mg g ⁻¹)	14:0 (mg g ⁻¹)	16:0 (mg g ⁻¹)	18:0 (mg g ⁻¹)	18:1 t (mg g ⁻¹)	18:1n-9 (mg g ⁻¹)	Σ n-6 (mg g ⁻¹)	Σ n-3 (mg g ⁻¹)	n-6/n-3	CLA (mg g ⁻¹)	
1	Inverno	3-4	28,90±4,50	94,60±10,34	268,18±27,77	91,73±15,20	24,61±4,8	202,70±32,24	26,12±4,60	2,06±0,38	12,68±2,20	6,02±2,04
2	Inverno	5-7	26,16±4,34	93,70±10,47	267,62±22,20	82,98±4,46	19,33±3,77	175,99±25,49	26,88±8,80	2,95±0,41	9,11±2,10	6,71±2,00
3	Verão	3-4	22,78±2,62	84,63±12,27	240,81±24,99	93,30±7,52	20,25±3,56	181,51±20,10	17,42±3,20	2,94±0,80	5,93±1,42	6,88±1,50
4	Verão	5-7	17,04±1,50	72,31±12,34	208,88±30,01	93,13±15,20	29,04±4,20	198,88±30,41	16,06±6,02	3,57±1,07	4,28±1,00	10,77±2,01

✓ Resultados expressos em mg g⁻¹, sendo a média±desvio padrão das médias de análises em triplicata de três diferentes lotes. Idade entre 3-4 anos: n=45, Idade entre 5-7 anos: n=36.

5.3.1.1. Análise da influência das variáveis: Estação x Idade

O modelo indicou que a idade foi a maior contribuinte para uma alta concentração dos ácidos mirístico (76,32%) e palmítico (79,00%), enquanto que para os ácidos láurico e esteárico (18:0), a estação do ano favoreceu uma maior quantidade, com contribuições de 74,16 e 47,28%, respectivamente.

Analisando as superfícies da figura 6, percebe-se que animais mais novos na estação do ano mais fria foram aqueles que forneceram leite com maior quantidade de ácido láurico, mirístico e palmítico. Em contrapartida, no inverno as quantidades encontradas para o ácido esteárico são significativamente menores do que as encontradas no verão, especialmente para leite proveniente de animais mais velhos.

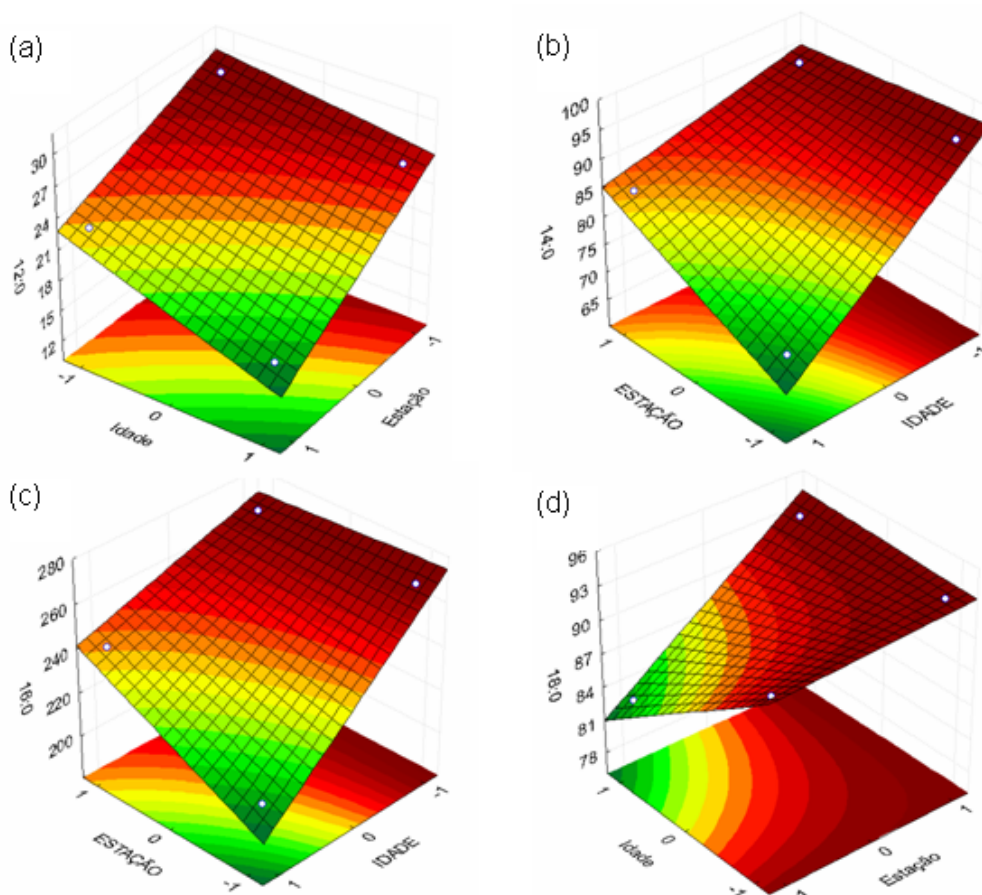


Figura 6: Superfície representativa da quantidade dos ácidos graxos (a) láurico, (b) mirístico, (c) palmítico e (d) esteárico em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e idade dos animais (1= de 5 a 7 anos e -1= de 3 a 4 anos). N=81.

O somatório dos ácidos graxos saturados, mostrados nos anexos 5 e 6, mostraram que no verão, a quantidade de ácidos graxos saturados foi menor que aquela encontrada no período do inverno. Esses resultados são semelhantes àquele encontrado por Aro *et al.*, (1998). Além disso, os valores para o ácido linoléico no inverno também foram superiores aos encontrados no verão. Isso sugere que o aumento da temperatura pode aumentar a atividade da enzima isomerase que converte ácido linoléico em CLA no rúmem, que por sua vez pode ir para os tecidos e glândulas mamárias ou ainda ser biohidrogenado a ácido vacênico pelo microorganismo *B. Fibriosolvens*. Sugere-se que em períodos frios esteja ocorrendo um maior transporte desta substância aos tecidos e glândulas mamárias do que posterior biohidrogenação.

Para o ácido oléico (18: 1n-9), a modelagem fatorial (figura 7) indicou que a estação do ano é o fator que mais contribuiu para uma alta concentração desse ácido graxo (95,57%), sendo que, no inverno, a quantidade encontrada foi maior que no verão. Bugaud *et al.*, (2001) sugeriram que uma diminuição na temperatura ambiente poderia induzir um aumento na concentração de ácido oléico, fato este confirmado neste trabalho.

O somatório de ácidos graxos insaturados (Anexos 5 e 6) seguiu a tendência dos saturados, sendo maior no período mais frio do ano. Resultados semelhantes para somatório de AGI foram verificados por Collomb *et al.*, 2002.

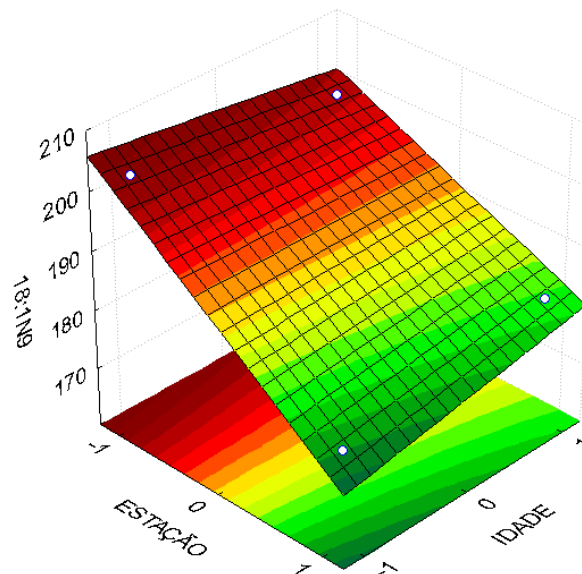


Figura 7: Superfície representativa da quantidade do ácido oléico em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e idade dos animais (1= de 5 a 7 anos e -1= de 3 a 4 anos). N=81

Em relação à quantidade de ácido graxo monoinsaturado trans (AGMI_t), cujo principal isômero é o ácido vacênico, precursor de CLA, o modelo (Figura 8) indicou que a estação do ano foi o fator que mais contribuiu para sua alta concentração (82,86%), seguido pela idade (11,98%).

Animais mais velhos, no verão, foram os que apresentaram a maior quantidade desse ácido graxo, enquanto que a menor quantidade foi verificada no inverno, também para animais mais velhos. Aro *et al.* (1998) também verificaram que em períodos quentes, a quantidade de ácidos graxos trans em leites foi maior do que aquela verificada em períodos frios.

A estação do ano também afeta a quantidade de ácido linoléico conjugado (CLA), sendo o fator que exerce maior influência (43,68%) do que a combinação dos fatores estação do ano e idade (16,01%) (Figura 8). No verão, animais mais velhos foram aqueles que produziram maior quantidade de ácido linoléico conjugado, enquanto que, no inverno, animais mais novos foram os que produziram leite com a menor quantidade de CLA.

O ácido rumênico, como também é chamado o ácido linoléico conjugado (CLA, c9t11) é formado no rúmen através da ação de uma isomerase que converte as ligações do ácido linoléico em ligações conjugadas. Entretanto, sua principal fonte no leite é a partir da síntese endógena nas glândulas mamárias, a partir do ácido vacênico. O Ácido vacênico (18:1n-7t) é um intermediário na biohidrogenação ruminal, sendo convertido a CLA pela ação da enzima Δ^9 dessaturase, nos tecidos e glândulas mamárias. Sabe-se que vários fatores afetam a quantidade de CLA no leite, como a estação do ano e fatores fisiológicos. Estudos sobre a razão 18:2c9t11/18:1t como função da alimentação já foram publicados (Tsiplakou e Zervas, 2008; Andrade e Schimidely, 2006; Dewhurst *et al.*, 2006), entretanto, nada há descrito até o momento sobre esta razão como função da idade dos animais ou estação do ano.

Bugaud *et al.*, (2001) propõem que no inverno, a biohidrogenação ruminal é menor que aquela verificada no verão, sendo que, desta forma, a principal fonte de CLA no leite em períodos de frio intenso deve ser aquela formada no rúmen pela conversão do ácido linoléico, e transportada até os tecidos e glândula

mamária. Além disso, a ação das enzimas é notadamente afetada pela ação da temperatura, sendo, em temperaturas frias, diminuída (Bobbio e Bobbio, 1995).

Os resultados encontrados confirmam esta observação. A razão 18:2c9t11/18:1t (Figura 9) mostra que a máxima conversão ocorreu em leite de animais mais velhos, quando a temperatura ambiente era alta. Tais resultados sugerem que, no inverno, embora a biohidrogenação tenha ocorrido, formando ácido graxo trans, este não foi dessaturado a CLA porque, provavelmente, houve diminuição da atividade da enzima Δ^9 dessaturase. Portanto, a influência da redução da temperatura ambiente sobre a biohidrogenação ruminal parece ser menos acentuada do que sobre a atividade da enzima Δ^9 dessaturase.

Pode-se ainda dizer que as quantidades de ácido esteárico encontradas, que indicam ser esta substância produzida em maior quantidade no verão independentemente da idade dos animais, enquanto que no inverno diminui significativamente apenas para animais mais velhos, sugerem que a biohidrogenação ruminal em animais mais novos é menos influenciada pela redução da temperatura do que para animais mais velhos. Em contrapartida, a menor razão 18:2c9t11/18:1t encontrada no inverno para animais mais novos, sugere que a atividade da enzima dessaturase afeta estes animais com maior intensidade do que os mais velhos.

Nota-se novamente pela figura 10, que animais mais novos são mais afetados com a redução da temperatura ambiente, uma vez que no período do inverno, a razão diminuiu significativamente mais do que no verão. Propõe-se que a diminuição da temperatura influi de forma distinta dependendo da idade dos animais. Animais mais velhos parecem ter a biohidrogenação mais afetada que os mais novos. Já a atividade da enzima Δ^9 dessaturase parece ser mais reduzida para animais novos.

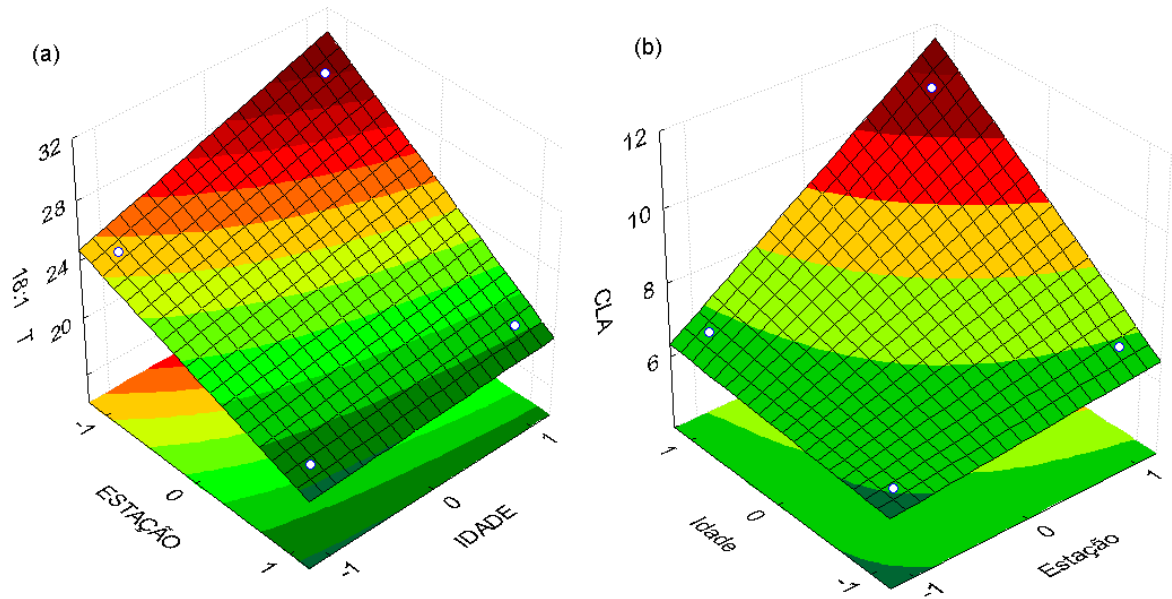


Figura 8: Superfície representativa da quantidade dos ácidos graxos (a) monoinsaturados trans e (b) linoléico conjugado (CLA) em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e idade dos animais (1= de 5 a 7 anos e -1= de 3 a 4 anos). N=81.

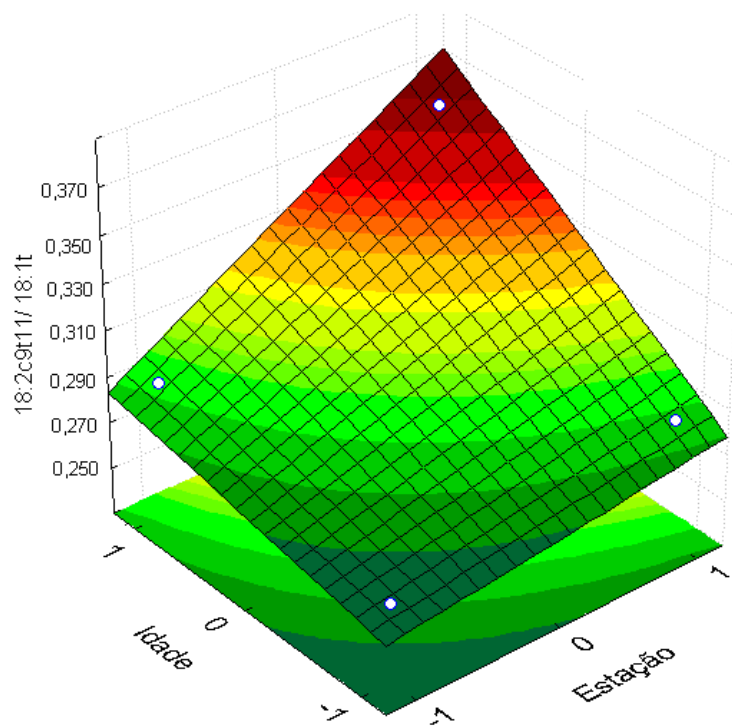


Figura 9: Superfície representativa da quantidade da razão 18:2c9t11/18:1t em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e idade dos animais (1= de 5 a 7 anos e -1= de 3 a 4 anos). N=81.

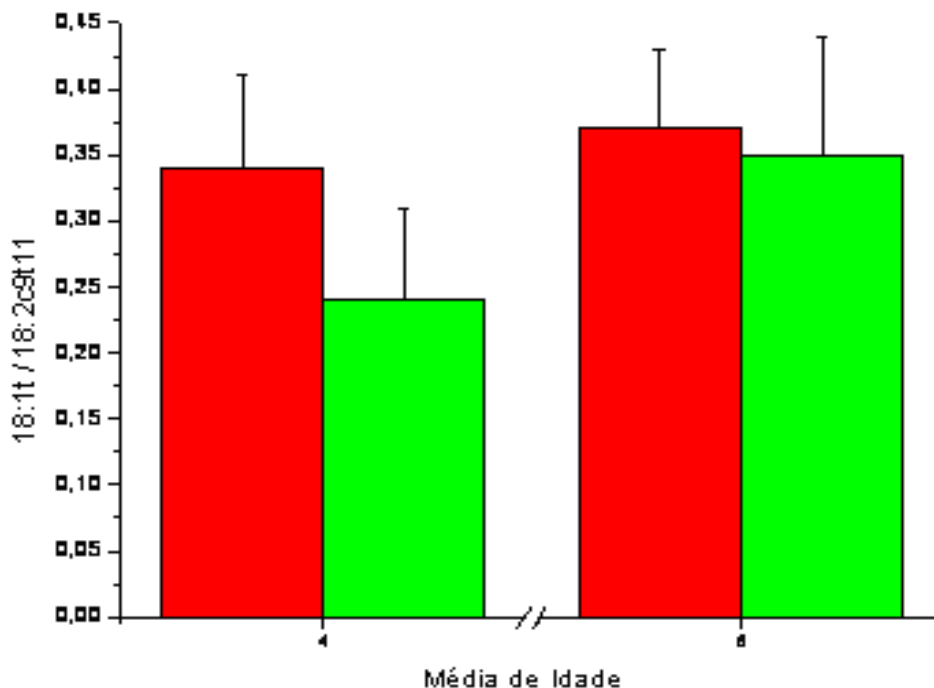


Figura 10: Relação entre as razões 18:2c9t11/18:1t para os animais com diferentes medias de idade, no verão (■) e inverno (■), N=81.

O somatório de ácidos graxos do tipo ômega-6 foi afetado, segundo o modelo, prioritariamente (98,74%) pela estação do ano. Entretanto, o somatório de ácidos graxos essenciais ômega-3 foi afetado tanto pela estação do ano (49,35%), quanto pela idade dos animais (50,53%) (Figura 11). Percebe-se pelas superfícies abaixo representadas que, no inverno, existe uma maior quantidade de n-6 nos leites dos animais analisados, novos e velhos. A maior quantidade de n-3 é produzida por animais mais velhos, no verão. Logo, analisando a razão n-6/n-3, a maior contribuição vêm da estação do ano (81,25%), seguido pela idade dos animais (16,51). Percebe-se pela superfície (Figura 12) que menores razões (5,75) são obtidas no verão, para animais mais velhos.

Tal qual para a quantidade de CLA, animais mais velhos no verão produziram uma menor razão n-6/n-3. Desta forma, poder-se-ia dizer que os leites produzidos por animais mais velhos no verão seriam aqueles com as melhores características em termos de composição em ácidos graxos, uma vez que a necessidade de se diminuir a razão n-6/n-3 tem sido sugerida pelos resultados de alguns estudos clínicos realizados na ultima década. O Departamento de saúde da Inglaterra (1994) sugere que a razão da ingestão de Ômega-6 e Ômega-3

esteja entre 5 e 10. Simopoulos (2006) sugere que esta razão não deve ultrapassar 4. Na Franca e Suíça recomenda-se que este valor seja igual a 5:1. Verifica-se, pois a convergência para valores entre 1 a 10 (Martin *et al.*, 2006). Além disso, é recomendada uma ingestão média de 400mg de CLA/dia para que possa surtir efeitos anticarcinogênicos (Sieber, 2004).

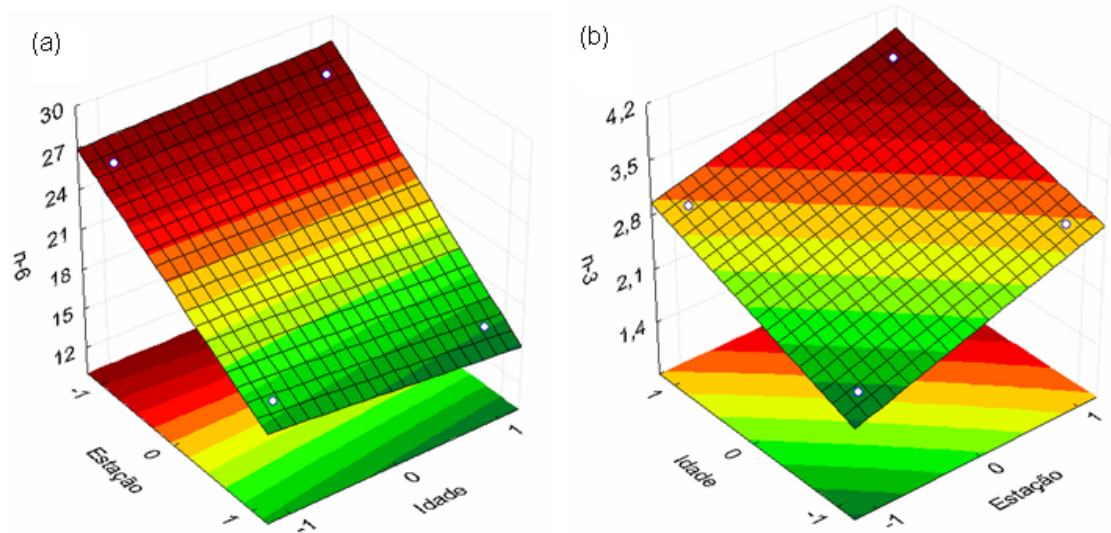


Figura 11: Superfície representativa do somatório dos ácidos graxos (a) ômega 6 (n-6) (b) ômega 3 (n-3) em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e idade dos animais (1= de 5 a 7 anos e -1= de 3 a 4 anos). N=81.

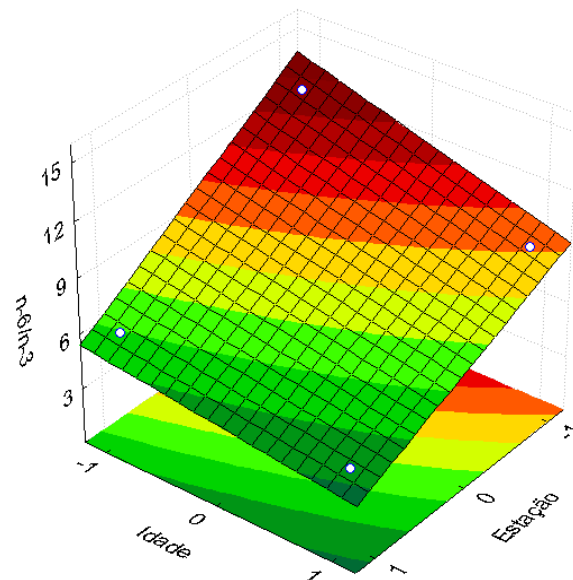


Figura 12: Superfície representativa da quantidade da razão dos ácidos graxos ômega 6 (n-6) e ômega 3 (n-3) em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e idade dos animais (1= de 5 a 7 anos e -1= de 3 a 4 anos). N=81.

5.3.2. Verificação dos fatores Estação e Pasteurização para os leites crus

Muitos pesquisadores têm estudado como os processos térmicos utilizados para conservação de leite e seus derivados afetam as suas propriedades nutricionais e organolépticas (Pereda *et al.*, 2008, Raynal-Ljutovac *et al.*, 2007, Rynnea *et al.*, 2004.). Além de desnaturações protéicas, o tratamento térmico também pode aumentar o número de reações, como as de Maillard, assim como a hidrólise e degradação de vitaminas. Neste sentido, Giroux *at al.*, (2008) sugerem que, apesar de tratamentos térmicos como a pasteurização afetar propriedades organolépticas e nutricionais do leite, pode também melhorar a sua atividade antioxidante. Este efeito pode ser atribuído ao desdobramento de proteínas e conseqüente exposição de grupos tióis, especialmente presentes na β -lactoglobulina, que podem agir como doadores de átomos de hidrogênio e inativar compostos sensíveis à oxidação.

Essas alterações referem-se principalmente a mudanças nas estruturas das proteínas. Entretanto, não foram encontrados relatos semelhantes que demonstrem como a pasteurização pode afetar a composição e quantidade de ácidos graxos.

Para verificar a influência do processo de pasteurização na quantidade de ácidos graxos, dependendo da estação do ano, foi realizada uma modelagem fatorial, cujas condições estão listadas na tabela 12. O planejamento foi feito com o objetivo de analisar o efeito da pasteurização em duas estações do ano, sobre a quantidade, em mg g^{-1} dos ácidos graxos 12:0, 14:0, 16:0, 18:0, 18:1n-9, 18:1n-9t,, 18:2n-6, 18:2n-6t, 18:2c9t11, ômega-6, ômega-3 e razão n-6/n-3.

A quantificação para cada ácido graxo encontrado nos leites pasteurizados pode ser visualizada nos anexos 7 e 8.

Tabela 12: Condições pré-estabelecidas de Estação do ano e Idade dos animais para o planejamento fatorial.

Variável	Nível Baixo	Nível Alto
Período	Inverno	Verão
Tipo	Leite cru	Leite pasteurizado

A Tabela 13 apresenta a análise realizada pelo modelo fatorial 2^2 pelo programa ANOVA e seu respectivo modelo de primeira-ordem. Observa-se que nenhuma das variáveis é totalmente insignificante neste modelo. Como verificado para o estudo anterior, a estação do ano e o tipo do processo realizado foram significantes para as quantidades de cada ácido graxo estudado. Baseado nesta análise, os valores em mg g^{-1} de cada ácido graxo como função de Período (P) e Tipo (T) podem ser descritos com 95 % de confiança.

Tabela 13: Análise de variância (ANOVA) obtida pelo design fatorial de 2^2 e seu respectivo modelo para a resposta da quantidade de ácidos graxos.

Ácido Graxo	Equação
Láurico	$12:0 = 4,09 + 0,1125 * T + 1,2275 * E + 2,2525 * T * E$
Mirístico	$14:0 = 0,58 - 1,08 * T - 6,4425 * E + ,9425 * T * E$
Palmítico	$16:0 = 0,10 + 6,91 * T - 11,58 * E + 9,58 * T * E$
Oléico	$18:0 = 97,33 + 8,18 * T + 4,41 * E + 3,10 * T * E$
18:1t	$18:1t = 24,64 + 1,67 * T + 3,30 * E + 1,40 * T * E$
Oléico	$18:1n9 = 200,44 + 13,07 * T + 1,77 * E - 1,27 * T * E$
Linolelaídico	$18:2n-6t = 8,62 - 0,24 * E + 1,13 * T + 0,25 * E * T$
Linoléico	$18:2n-6c = 16,48 - 0,91 * E - 1,99 * T + 0,12 * E * T$
Rumênico ou CLA	$CLA = 8,14 + 1,29 * E + 0,61 * T + 0,10 * T * E$
$\sum n-6$	$n-6 = 22,51 + 0,74 * T - 2,47 * E + 2,22 * T * E$
$\sum n-3$	$n-3 = 3,15 + 0,31 * T + 0,32 * E - 0,07 * T * E$
$n-6/n-3$	$n-6/n-3 = 7,97 - 1,10 * T - 1,53 * E + 1,0 * T * E$

E = Estação do ano; T = Tipo de Processo; n-6 = somatório de ácidos graxos ômega 6; n-3 = somatório de ácidos graxos ômega 3. Resultados descritos com 95% de confiança.

Tabela 14: Condições pré-estabelecidas para quatro experimentos realizados para verificação da quantidade de cada ácido graxo pelo design fatorial 2^2 na combinação de níveis altos e baixos de Tipo e Estação do Ano.

Tipo	Estação	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1n-7	18:1n-9	18:2n-6t	18:2n-6	n-6	n-3	n-6/n-3	CLA
1 Cru	Verão	20,72±3,70	80,28±15,01	230,03±36,22	94,66±18,71	24,87±5,03	190,41±27,71	7,01±0,94	17,45±2,92	17,09±3,70	3,22±0,66	6,54±0,50	8,72±2,60
2 Pasteurizado	Verão	22,95±2,35	80,00±7,00	263,00±22,70	113,00±7,90	31,00±2,29	214,00±12,50	9,75±0,13	13,70±0,16	23,00±1,52	3,70±0,36	6,34±0,65	10,14±0,34
3 Cru	Inverno	27,68±5,06	95,05±10,41	272,35±30,45	87,84±12,72	21,07±3,73	184,33±30,15	7,98±1,36	19,50±5,70	26,46±5,04	2,46±0,46	11,60±1,70	6,33±2,50
4 Pasteurizado	Inverno	25,00±2,63	91,00±7,33	267,00±19,68	98,00±10,55	21,60±2,18	213,00±20,65	9,74±0,05	15,28±0,45	23,50±5,40	3,20±0,40	7,40±0,69	7,35±0,13

✓ Resultados expressos em mg g^{-1} , como média±desvio padrão das médias de análises em triplicata de três diferentes lotes. Leite cru n=81, Leite pasteurizado n=36.

5.3.2.1. Análise da influência das variáveis: Estação x Pasteurização

Em relação ao ácido láurico, a estação do ano é a maior contribuinte para sua alta concentração (74,96%), seguido pela combinação estação x tipo (22,85%). A pasteurização altera a quantidade desse ácido graxo, aumentando-a. Confirmou-se que no inverno, a quantidade de ácido láurico foi superior que no verão.

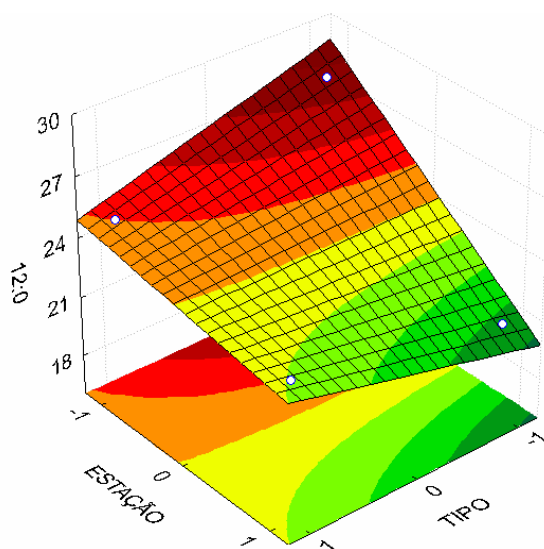


Figura 13: Superfície representativa da quantidade média do ácido láurico em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e tipo de processo (1= leite pasteurizado e -1= leite cru). Leite cru n=81, Leite pasteurizado n=36.

A estação do ano mais fria foi a maior contribuinte para uma maior concentração de ácido mirístico (95,27%). No inverno, o leite cru foi aquele que apresentou maior quantidade dessa substância. O processo de pasteurização não interfere significativamente na sua quantidade.

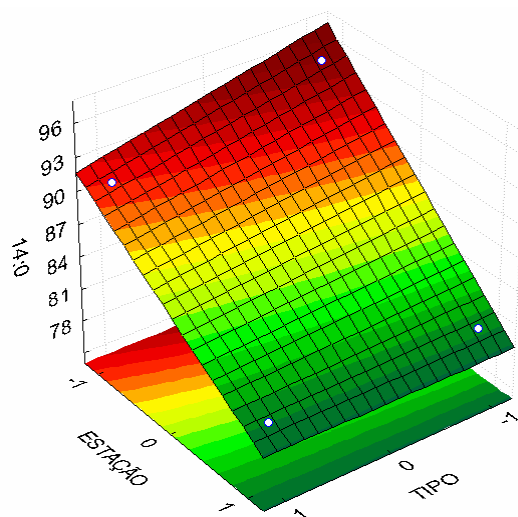


Figura 14: Superfície representativa da quantidade média do ácido mirístico em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e tipo de processo (1= leite pasturizado e -1= leite cru). Leite cru n=81, Leite pasteurizado n=36.

Para o ácido palmítico, a estação também foi o fator com maior contribuição para sua alta concentração (49,02%), porém, a combinação dos fatores e o tipo de processo também influíram significativamente (33,55 e 17,43%). No inverno, os leites crus apresentaram a maior quantidade média dessa substância (aproximadamente 285 mg.g⁻¹). Entretanto, a superfície representada pela figura 15 mostra que a pasteurização aumentou a quantidade desse ácido graxo.

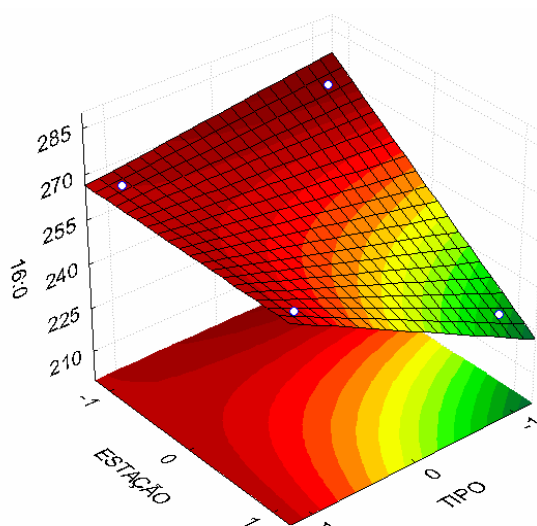


Figura 15: Superfície representativa da quantidade média do ácido palmítico em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e tipo de processo (1= leite pasturizado e -1= leite cru). Leite cru n=81, Leite pasteurizado n=36.

O processo de pasteurização mostrou-se mais importante para as altas concentrações de ácido esteárico (69,75%), seguido pela estação (20,25%). No verão, leites pasteurizados apresentaram uma quantidade desse ácido graxo significativamente maior que no inverno para o leite cru. O aumento da temperatura pelo processo de pasteurização, aumentou sua quantidade. Vale destacar que trata-se agora de leite industrializado, e que portanto, esse aumento nada tem a ver com fatores endógenos.

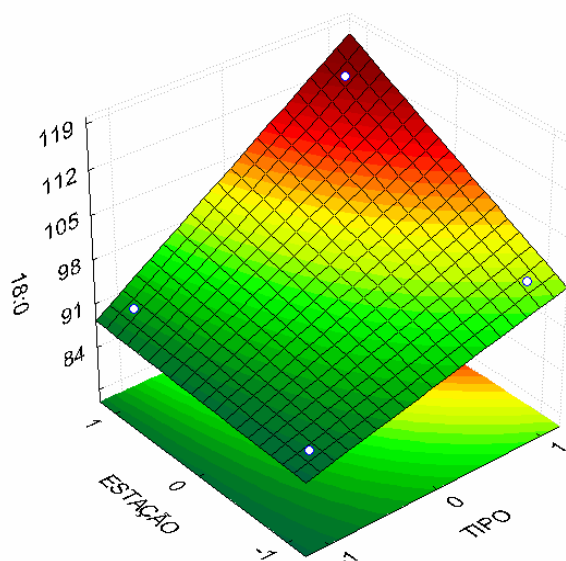


Figura 16: Superfície representativa da quantidade média do ácido esteárico em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e tipo de processo (1= leite pasteurizado e -1= leite cru). Leite cru n=81, Leite pasteurizado n=36.

Para o ácido oléico, o fator prioritariamente contribuinte foi o tipo do processo (97,30%). Leites pasteurizados apresentaram os maiores teores. O período do ano não modificou significativamente as quantidades desse ácido graxo, comparativamente ao processo térmico.

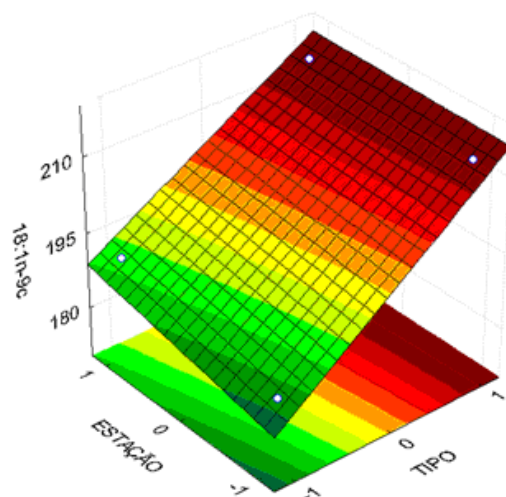


Figura 17: Superfície representativa da quantidade média do ácido oléico em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e tipo de processo (1= leite pasteurizado e -1= leite cru). Leite cru n=81, Leite pasteurizado n=36.

O processo térmico também influenciou na quantidade dos ácidos linolelaídico e linoléico, exercendo influências de 91,50 e 82,58%, respectivamente. Animais mais velhos apresentaram maiores quantidades de ácido linolelaídico e as menores de ácido linoléico, conforme pode ser visualizado na figura 18.

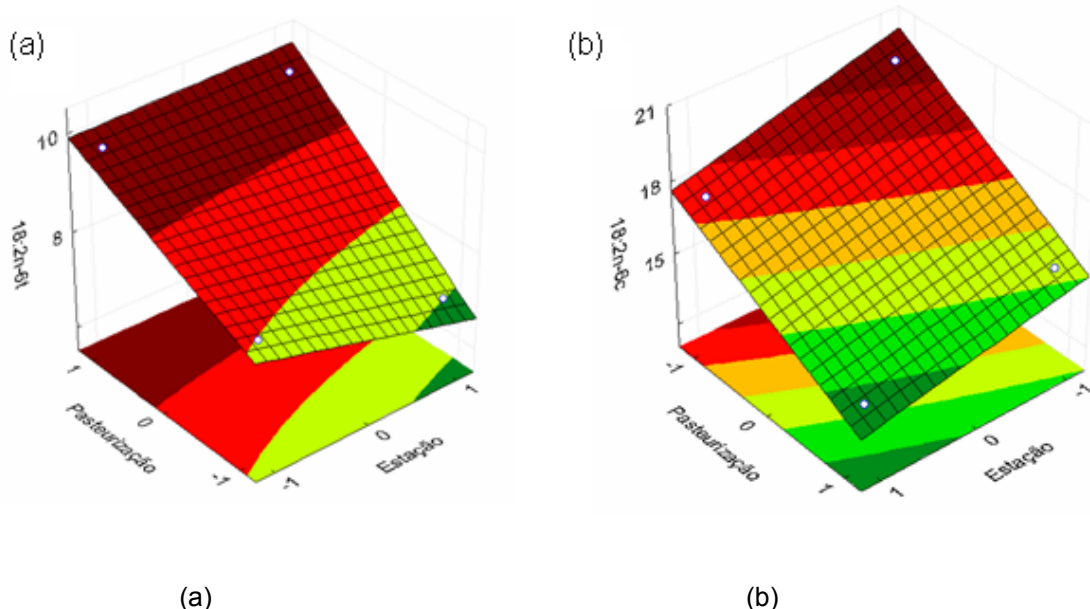


Figura 18: Superfície representativa da quantidade média dos ácidos (a) linolelaídico (18:2n-6a) e (b)linoléico (18:2n-6c) em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e tipo de processo (1= leite pasteurizado e -1= leite cru). Leite cru n=81, Leite pasteurizado n=36.

Quanto ao teor de CLA, o período do ano foi o fator que mais influenciou (81,45%), seguido pelo processo ao qual o leite foi submetido (18,07%). Nota-se pela superfície da figura 19, que o processo de pasteurização aumentou a quantidade de ácido rumênico tanto no verão quanto no inverno, entretanto, no período mais quente do ano o aumento foi maior ($1,42 \text{ mg g}^{-1}$) do que no frio ($1,02 \text{ mg g}^{-1}$).

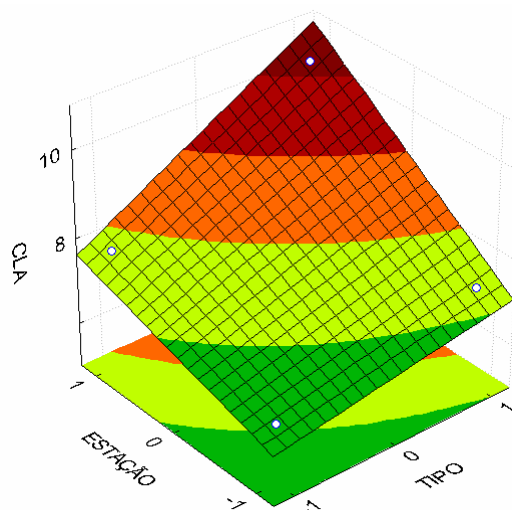


Figura 19: Superfície representativa da quantidade média do ácido rumênico (CLA c9t11) em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e tipo de processo (1= leite pasturizado e -1= leite cru). Leite cru n=81, Leite pasturizado n=36.

Quando analisa-se a figura 20, que mostra a quantidade média dos ácidos graxos linoléico ($18:2n-6c$) e linolelaídico ($18:2n-6t$), pode-se verificar o aumento na quantidade do ácido graxo trans linolelaídico, que se repetiu nas duas estações analisadas. Já a observação da quantidade de ácido linoleico, leva ao entendimento de que, ao contrário, ocorre uma diminuição na sua quantidade média. Tais variações podem ser verificadas na tabela 15.

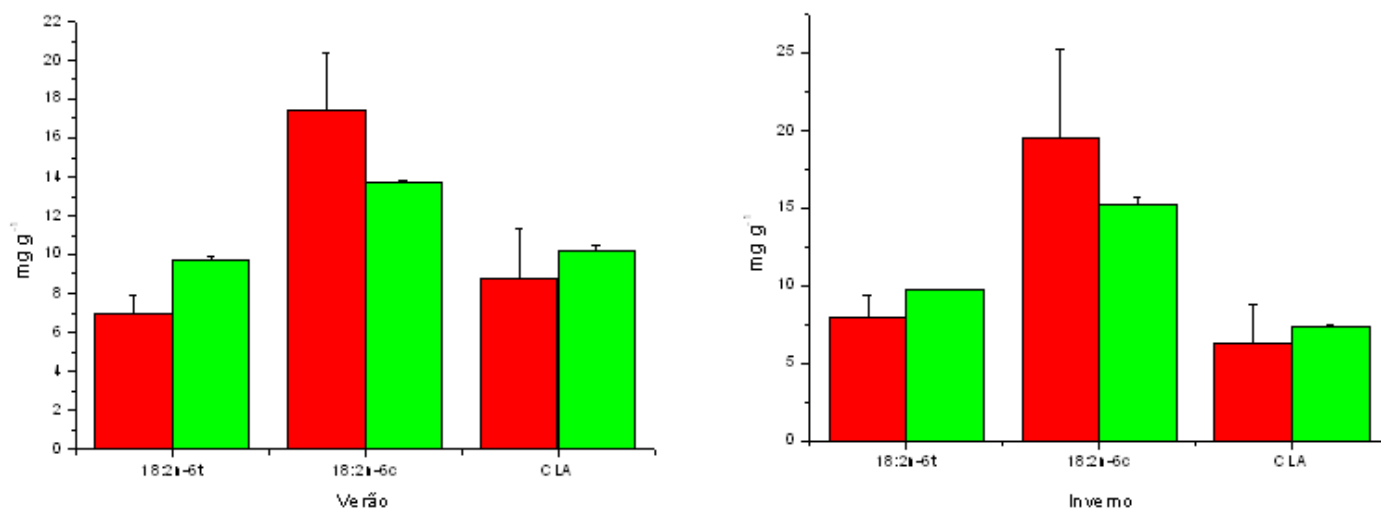


Figura 20 - Quantidade média dos ácidos linoléico (18:2n-6c) e linolelaídico (18:2n-6t) no verão e no inverno para os leites cru (■) e pasteurizados (■).

Tabela 15 - Variações ocorridas nas quantidades dos ácidos: linoléico conjugado (c9t11), linolelaídico e linoléico após a pasteurização;

VERÃO	CRU ¹	PASTEURIZADO ²	Δ
18:2c9t11	8,72 ± 2,67	10,14±0,34	1,42
18:2n-6t	7,01 ^a ±0,94	9,75 ^b ±0,13	2,74
18:2n-6c	17,45±2,92	13,70±0,16	-3,75
			0,41
INVERNO	CRU ¹	PASTEURIZADO ²	Δ
18:2c9t11	6,33±2,59	7,35±0,13	1,02
18:2n-6t	7,98±1,36	9,74±0,05	1,76
18:2n-6c	19,50±5,79	15,28±0,45	-4,22
			-1,50

¹Resultados expressos em percentagem como média±desvio padrão das médias dos resultados das análises em triplicata de três diferentes lotes de leite proveniente de 9 diferentes produtores de leite cru (n=81). ² Resultados expressos em percentagem como média±desvio padrão das médias dos resultados das análises em triplicata de três diferentes lotes dos leites pasteurizados tipo B e tipo C (n=36).

Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste Tukey, em nível de 5% de probabilidade. A ausência de letras indica que não houve diferença significativa entre os resultados.

Embora estatisticamente as diferenças não tenham sido significativas, as variações ocorridas podem indicar que o ácido linoléico esteja se isomerizando em linolelaídico e em ácido linoléico conjugado, ou ainda em outros ácidos octadecadienóicos não analisados neste estudo, durante o processo de pasteurização.

Analisando a relação entre o processo de pasteurização e estação do ano para o somatório de n-6, tem-se que a estação do ano foi o fator que mais contribuiu para um maior somatório (52,72%), seguido pela combinação entre o tipo e o período (42,58%). Leites crus, no inverno foram aqueles que apresentaram um maior somatório desses ácidos graxos. Percebe-se que no inverno os somatórios são maiores, e que a pasteurização diminui sua quantidade (Figura 21).

Para o somatório de ácidos graxos n-3, os fatores tipo e idade contribuem de forma semelhante (47,35 e 50,50%, respectivamente). A quantidade máxima foi encontrada nos leites pasteurizados analisados no verão.

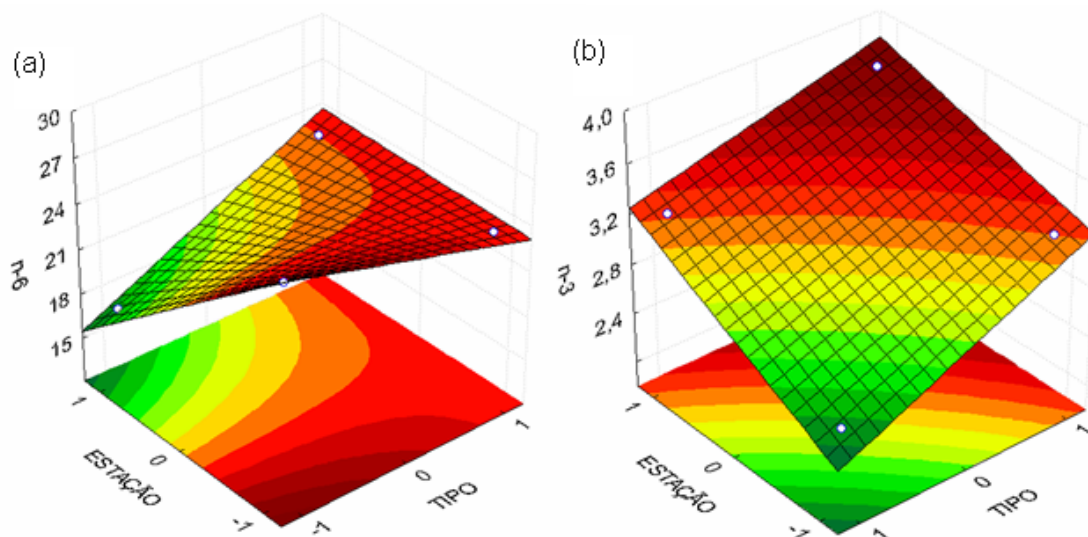


Figura 21: Superfície representativa do somatório da quantidade média de ácidos graxos ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3) em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e tipo de processo (1= leite pasteurizado e -1= leite cru). Leite cru n=81, Leite pasteurizado n=36.

Para a razão n-6/n-3 (Figura 22), a estação foi a maior contribuinte (51,44%), seguido pelo tipo (26,59%). As menores razões foram as encontradas para leites pasteurizados no verão. Nota-se que a pasteurização contribui para uma menor razão.

Assim, o processo de pasteurização não só melhora as características microbiológicas do leite, como influi positivamente na sua composição em ácidos graxos.

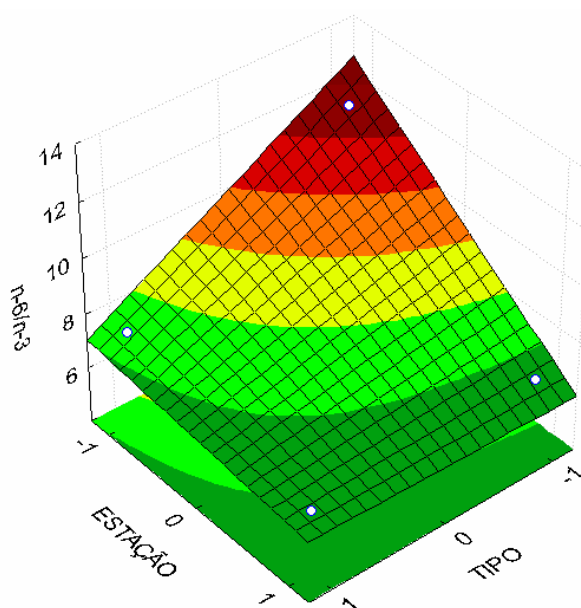


Figura 22: Superfície representativa da razão entre os ácidos graxos ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3) em função da estação do ano (1= verão e -1=inverno) e tipo de processo (1= leite pasteurizado e -1= leite cru). Leite cru n=81, Leite pasteurizado n=36

5.4. Análise dos Derivados

A gordura do leite de ruminantes possui uma grande quantidade de ácidos graxos, sendo que cerca de 400 já foram detectados (Collins, McSweeney e Wilkinson, 2003; Golay *et al.*, 2007). Esta situação se reflete nos derivados lácteos, sendo que, neste estudo, 27 ácidos graxos presentes na gordura dos mesmos, foram tentativamente identificados e quantificados. O cromatograma representativo para cada um dos derivados encontram-se em anexo (anexos 9 a 13)

A quantificação dos ácidos graxos presentes em derivados de leite de vaca nas duas estações do ano, mostrou uma falta de homogeneidade (Anexos 14 e 15). Vale destacar que esta heterogeneidade entre os resultados encontrados para as diferentes estações certamente não é devido a condições ambientais, e sim às características dos leites utilizados para os processos, bem como aos processos em si, uma vez que a fabricação de queijos envolve a adição de fermentos lácteos e agentes de precipitação, além também do uso de temperatura.

Assim como em relatos anteriores (Seçkin *et al.*, 2005), os ácidos graxos saturados (AGS) foram os mais abundantes nos derivados lácteos analisados. Entre os AGS, os majoritários foram o ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0) e mirístico (14:0). O ácido palmítico foi o AGS predominante em todas as amostras analisadas; sabe-se que esta substância está associada com o aumento do colesterol do sangue, enquanto o ácido esteárico não (Grundy, 1997).

Os ácidos graxos saturados não afetam as concentrações de colesterol da mesma maneira, sendo que, com exceção do esteárico, aumentam os níveis séricos de todas as lipoproteínas, principalmente as de baixa densidade (colesterol-LDL). Isto é atribuído a uma redução na síntese e atividade dos receptores LDL, pela diminuição da expressão de RNA mensageiro e da fluidez da membrana, reduzindo assim sua depuração da circulação. (Shaefer, 2002; Mustad *et al.*, 1997). Aumentando a fração LDL do colesterol sanguíneo, ocorre o favorecimento de depósito lipídico nas paredes dos vasos, que por sua vez proporciona o aparecimento de placas ateromatosas. Como consequência, as probabilidades de um ataque cardíaco aumentam.

Em experimento realizado com humanos, notou-se que a quantidade de receptores para LDL aumentou 10,5% após ingestão de dieta pobre em gordura saturada. Este aumento pode ser associado a uma redução correspondente de 11,8% nos níveis séricos de LDL-colesterol. Desta forma, a redução de gordura saturada da dieta parece estar relacionada com aumento na expressão de receptores para LDL de amplitude similar à redução de LDL-colesterol (Mustad *et al.*, 1997). Entretanto, gorduras polinsaturadas e monoinsaturadas estão relacionadas a menores riscos de enfermidades

cardíacas. O ácido graxo *esteárico*, apesar de ser saturado, não é considerado aterogênico, uma vez que, dentro do organismo, é rapidamente convertido a ácido oléico, que é monoinsaturado (Shaefer, 2002; Mustad *et al.*, 1997).

Mattson *et al.*, (1972) verificaram uma relação linear entre o colesterol da dieta e sanguíneo; observaram que cada 100 mg de colesterol/1000kcal consumidas resultou em um aumento no colesterol plasmático de 12 mg/100mL. O colesterol da dieta contribuiu com aproximadamente 15% na síntese do colesterol endógeno (Moura e Sonati, 1998). Entretanto, a redução de 100mg no colesterol da dieta resultou numa queda de apenas 5mg no colesterol sérico, quando a gordura da dieta não é alterada. Concluí-se assim, que o colesterol ingerido não tem tanta influência no colesterol sérico, como tem o consumo de gordura saturada, mono ou polinsaturada (Rosado e Monteiro, 2001).

Os derivados lácteos, assim como o leite, sempre foram apontados como vilões à saúde cardiovascular, devido à alta quantidade de AGS. Entretanto, são fontes de ácidos graxos importantes para a saúde humana, como os ácidos graxos essenciais ômega-6 e ômega-3, além do ácido linoléico conjugado.

A quantificação dos ácidos graxos presentes na gordura dos derivados lácteos analisados, mostrou que, nos lotes produzidos no período do verão, o somatório de ácidos graxos saturados variou de aproximadamente 360 a 550 mg/g de gordura enquanto que para aqueles fabricados no inverno, a variação foi de aproximadamente 500 a 600 mg g⁻¹ de gordura para os diferentes derivados analisados (Figura 24) . Prandini *et al.*, (2007) encontraram valores de AGS variando entre 652,3 a 685,2 mg g⁻¹ de gordura, valores estes superiores aos encontrados no presente trabalho.

Nas amostras produzidas tanto no verão quanto no inverno, o queijo “magro” minas frescal foi aquele que apresentou o maior somatório de ácidos graxos saturados (562,81±16,53 e 624,16±12,87 mg g⁻¹, respectivamente).

Não houve diferença significativa entre os resultados encontrados em ambas as estações do ano entre os derivados Minas Frescal e a Ricota.

Para a produção do verão, houve diferença significativa entre os valores encontrados para o somatório de ácidos graxos saturados da ricota

($519,19 \pm 15,14 \text{ mg g}^{-1}$) em relação aos queijos mussarela ($365,54 \pm 13,73 \text{ mg g}^{-1}$) e provolone ($415,75 \pm 19,24 \text{ mg g}^{-1}$). Em contrapartida, no inverno, a diferença entre estes derivados não foi significativa, sendo os valores iguais a $577,77 \pm 21,41 \text{ mg g}^{-1}$ para a ricota, $566,12 \pm 23,90 \text{ mg g}^{-1}$ para a mussarela e $608,43 \pm 18,42 \text{ mg g}^{-1}$ para o provolone.

É interessante observar essas quantidades de ácidos graxos saturados para a ricota e bebida láctea, derivados feitos a partir do soro do leite e que, portanto, deveriam apresentar pequena quantidade de gordura, uma vez que é permitido pela legislação a adição de 3 a 5% de leite integral na ricota e que na bebida, a base Láctea representa pelo menos 51% (cinquenta e um por cento) massa/massa (m/m) do total de ingredientes do produto.

A análise química mostrou que o percentual lipídico para estes derivados foi, em média, 17 e 2,30%, respectivamente, e o alto percentual lipídico encontrado para a ricota justifica a sua alta quantidade de ácidos graxos saturados. O somatório dos ácidos graxos saturados para a bebida láctea foi o menor entre os derivados estudados, mas que não diferiu significativamente da mussarela produzida no período do verão.

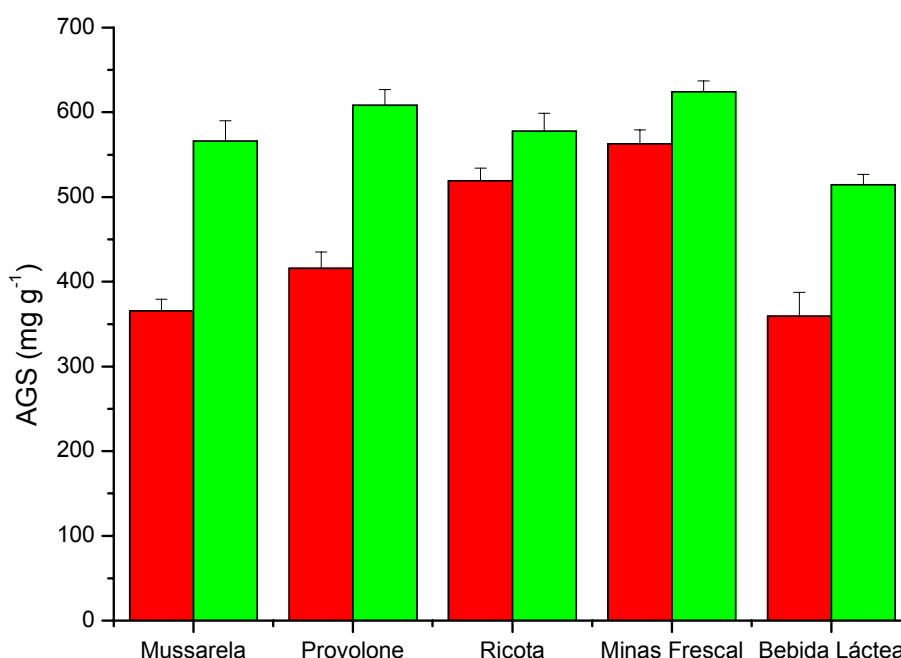


Figura 23: Somatório de ácidos graxos saturados para os diferentes derivados do leite de vaca, no verão (■) e no inverno (■), expresso como média \pm desvio padrão, em mg.g^{-1} de lipídios totais (n=9).

Em amostras de queijos italianos feitos com leite de vaca, Prandini *et al.*, (2007) encontraram valores de AGMI de 279,0 a 311,9 mg g⁻¹ de gordura. A análise dos derivados indicou uma quantidade de AGMI variando de 180 a 300 mg g⁻¹ de gordura. No inverno, a diferença entre os derivados só foi significativa para a bebida láctea (250,15±8,29 mg g⁻¹), sendo que mussarela (290,95±24,45 mg g⁻¹), provolone (297,79±11,05 mg g⁻¹), ricota (283,46±21,74 mg g⁻¹) e minas frescal (290,46±15,69 mg g⁻¹) não diferiram significativamente entre si. Entretanto, para os derivados analisados no verão, houveram diferenças significativas entre os somatórios de AGMI para os derivados, que podem ser visualizadas na tabela 5 em anexo. Na figura 24 é possível perceber que os menores somatórios foram encontrados para o queijo mussarela e para a bebida láctea.

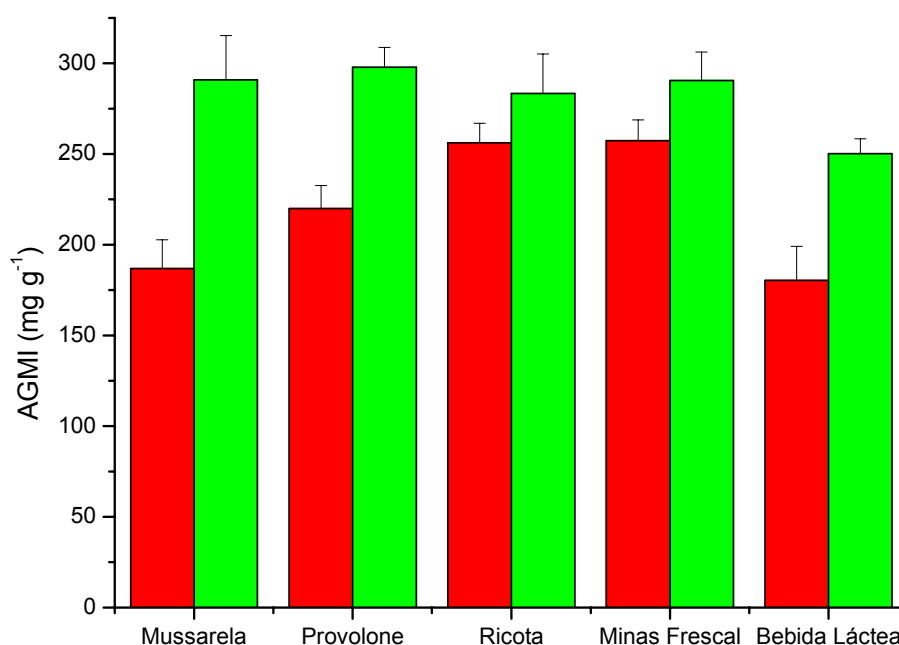


Figura 24: Somatório de ácidos graxos monoinsaturados para os diferentes derivados do leite de vaca, no verão (■) e no inverno (■), expresso como média ± desvio padrão, em mg.g⁻¹ de lipídios totais (n=9).

Ainda de acordo com o autor supracitado, valores de AGPI de 38,5 a 81,1 mg g⁻¹ de gordura foram encontrados para queijos italianos. Estes resultados são superiores aqueles encontrados para os derivados nas diferentes estações (24 a 36 mg g⁻¹). Os somatórios de AGPI não variaram

significativamente entre os diferentes derivados no período do inverno, entretanto, no verão, os valores para a ricota ($33,57 \pm 0,96 \text{ mg g}^{-1}$) e minas frescal ($31,56 \pm 1,62 \text{ mg g}^{-1}$) foram os maiores, diferindo significativamente em relação à mussarela ($24,62 \pm 1,25 \text{ mg g}^{-1}$), provolone ($24,17 \pm 1,43 \text{ mg g}^{-1}$) e bebida láctea ($25,10 \pm 1,84 \text{ mg g}^{-1}$). Os dados podem ser melhor visualizados na figura 25.

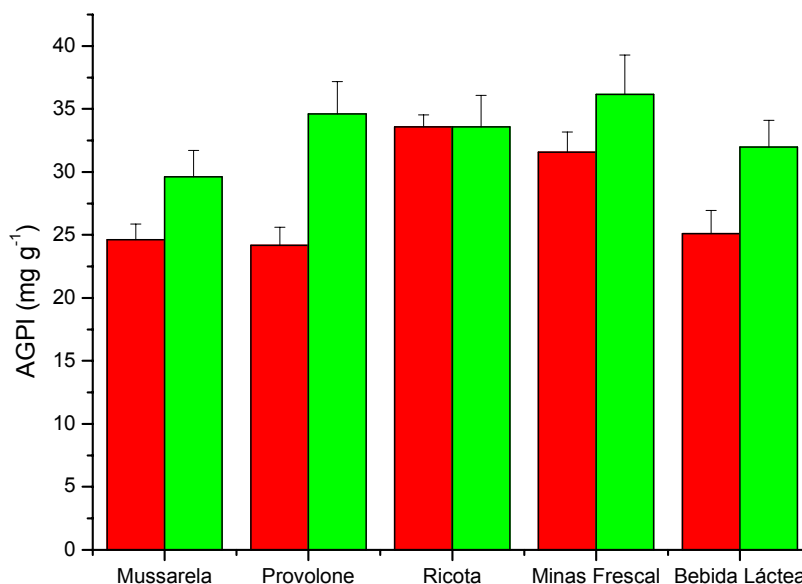


Figura 25: Somatório de ácidos graxos poliinsaturados para os diferentes derivados do leite de vaca, no verão (■) e no inverno (■), expresso como média \pm desvio padrão, em mg g^{-1} de lipídios totais (n=9).

O somatório de ácidos graxos ômega-6 encontrados para os derivados foi superior no inverno. Em ambas as estações a quantidade de n-6 para a ricota foi superior que para os outros derivados ($22,56 \pm 1,24 \text{ mg g}^{-1}$ no verão e $26,65 \pm 2,97 \text{ mg g}^{-1}$ no inverno).

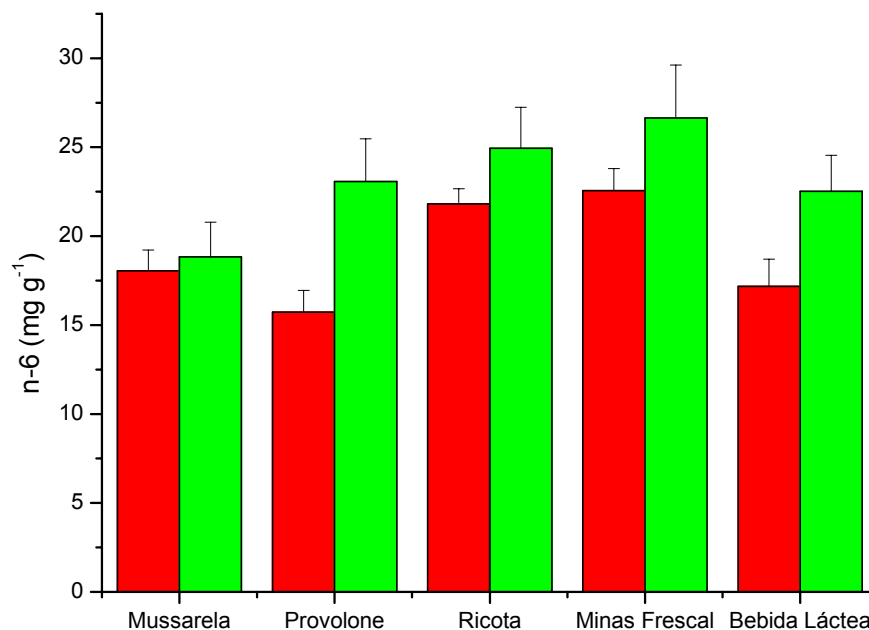


Figura 26: Somatório de ácidos graxos poliinsaturados ômega-6 (n-6) para os diferentes derivados do leite de vaca, no verão (■) e no inverno (■), expresso como média \pm desvio padrão, em mg g^{-1} de lipídios totais (n=9).

Para os derivados produzidos no período do verão, o somatório de ômega-3 foi superior para a Ricota ($3,41 \pm 0,28 \text{ mg g}^{-1}$) e Minas Frescal ($3,30 \pm 0,35 \text{ mg g}^{-1}$), diferindo significativamente estes valores em relação à mussarela ($2,65 \pm 0,19 \text{ mg g}^{-1}$) e provolone ($2,73 \pm 0,22 \text{ mg g}^{-1}$). A bebida láctea ($2,19 \pm 0,36 \text{ mg g}^{-1}$) diferiu de todos os outros derivados. Entre os derivados fabricados no inverno, não houve diferença significativa entre os valores encontrados.

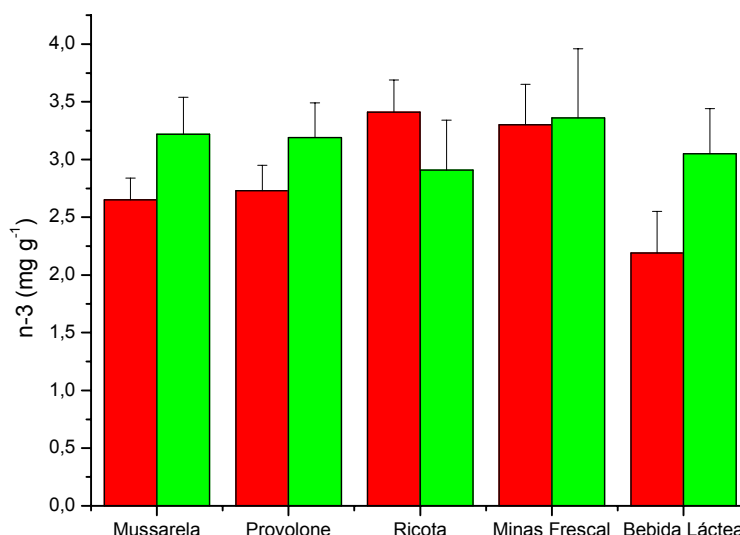


Figura 27: Somatório de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (n-3) para os diferentes derivados do leite de vaca, no verão (■) e no inverno (■), expresso como média \pm desvio padrão, em mg g^{-1} de lipídios totais (n=9).

Em relação à razão ômega-6/ômega-3, as razões variaram entre 5,5 e 9,0, valores estes que se enquadram na recomendação do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (FAO, 2007), que sugere que esta razão deve situar-se entre 5 e 10.

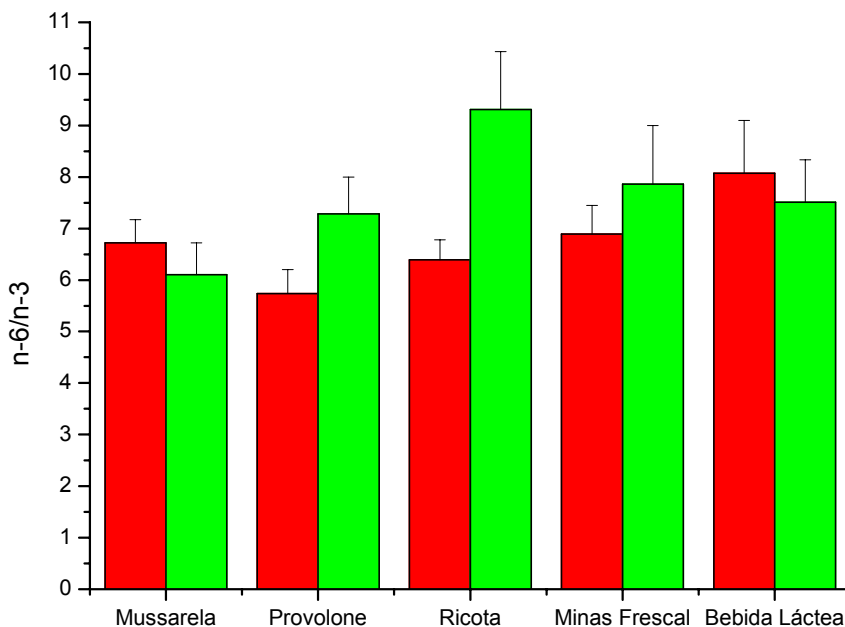


Figura 28: Razões entre os ácidos graxos poliinsaturados ômega-6 (n-6) e ômega-3 (n-3) para os diferentes derivados do leite de vaca, no verão (■) e no inverno (■), expresso como média \pm desvio padrão, em mg g^{-1} de lipídios totais (n=9).

Em relação à quantidade de ácido rumênico (CLA, c9t11), Prandini *et al.* (2007) encontram valores entre 3,85 a 8,11 mg g⁻¹ de gordura para queijos italianos e Seçkin *et al.* (2005) encontraram valores de 1,5 a 8,0 mg g⁻¹ de gordura de queijos turcos. Os valores encontrados para os derivados neste trabalho variaram entre 5,7 a 8,0 mg g⁻¹ de gordura.

Nota-se pela figura 29 que a quantidade de CLA na amostragem realizada no período do inverno foi superior àquela realizada no verão para os queijos mussarela, provolone e para a bebida láctea. Em contrapartida, Ricota e Minas frescal apresentaram resultados contrários, diferindo significativamente em relação aos outros derivados.

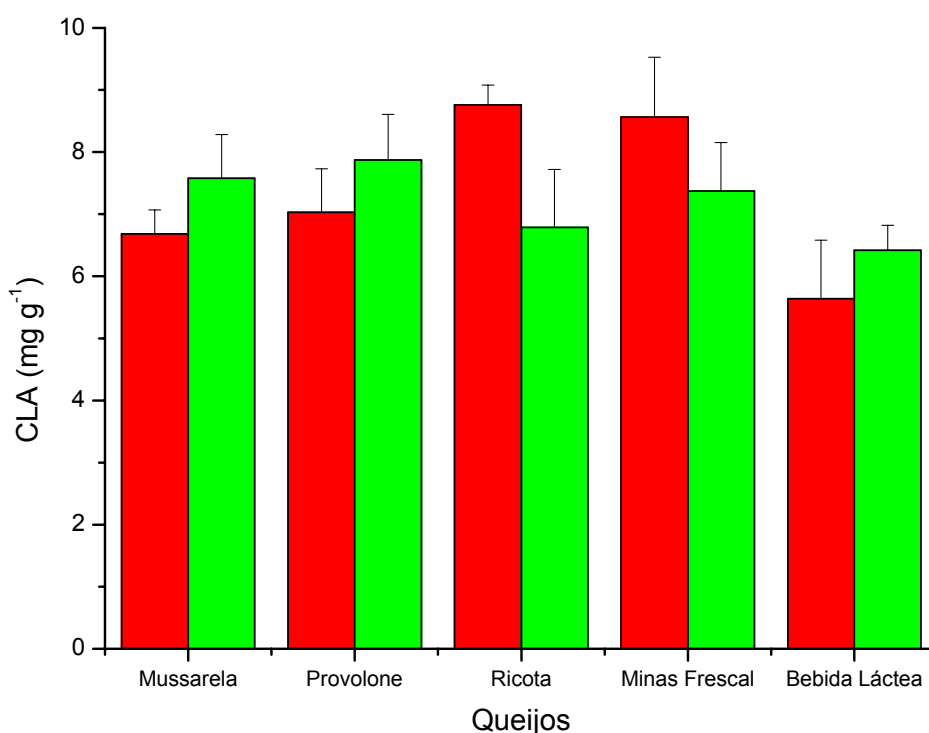


Figura 29: Ácido rumênico (CLA, c9t11) para os diferentes derivados do leite de vaca, no verão (■) e no inverno (■), expresso como média ± desvio padrão, em mg g⁻¹ de lipídios totais (n=9).

Em países como a Alemanha, estudos indicam que a ingestão diária de CLA para surtir efeitos anticarcinogênicos 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. Na América do Norte a recomendação é a ingestão de 620 e 441 mg para homens e mulheres, respectivamente (Sieber *et al.*, 2004). Nesse contexto, a ingestão dos

derivados analisados fornece quantidades significativas de CLA ao organismo, que podem ser verificadas na tabela 16.

Tabela 16: Quantidade em mg de CLA a cada 100g dos derivados.

Derivados	Verão (mg.100g ⁻¹)	Inverno (mg.100g ⁻¹)
Mussarela	113,49 ^a ±9,81	188,90 ^b ±20,27
Provolone	137,48 ^a ±19,69	188,74 ^b ±27,63
Ricota	169,28 ^a ±13,02	98,28 ^b ±6,93
Minas frescal	177,32 ^a ±18,32	62,72 ^b ±8,07
Bebida láctea	13,92 ^a ±2,09	13,64 ^a ±1,22

Resultados expressos como média±desvio padrão das análises em triplicata de três diferentes lotes (n=9). Letras diferentes em uma mesma linha indicam diferenças significativas pelo teste Tukey em nível de 5% de probabilidade.

A falta de homogeneidade verificada pelos resultados dos derivados em diferentes períodos do ano, tanto em relação à composição química quanto à quantidade dos ácidos graxos, indica que faltam procedimentos padrões na elaboração dos derivados lácteos. Isso dificultaria uma possível normatização das embalagens, onde seriam interessantes informações a respeito da presença de ácido linoléico conjugado. Além disso, essa heterogeneidade pode trazer também informações errôneas aos consumidores, que ao verificar a embalagem acreditam estar ingerindo, em média, aquilo que lá está descrito. As análises mostraram que em relação à quantidade de ácidos graxos saturados, informação obrigatória nos rótulos dos alimentos, a variação foi muito grande.

6. CONCLUSÕES

✚ Através da técnica da cromatografia gasosa utilizada foi possível a separação, identificação e quantificação de 27 ácidos graxos presentes na gordura dos produtos lácteos.

Na análise do material de referência certificado (leite em pó) para confirmação da exatidão do método utilizado, a recuperação foi considerada quantitativa para os ácidos graxos analisados, podendo o método utilizado neste trabalho ser aplicado em amostras comerciais para quantificação de ácidos graxos.

✚ Para as amostras de leites crus, a razão dos ácidos 18:2c9t11/18:1t encontrada mostrou que a máxima conversão a CLA ocorreu em leite de animais mais velhos, quando a temperatura ambiente era alta. Tais resultados levam ao entendimento de que a influência da redução da temperatura ambiente sobre a biohidrogenação ruminal foi menos acentuada do que sobre a atividade da enzima Δ^9 dessaturase.

As quantidades de ácido esteárico encontradas, que mostram que esta substância é produzida em maior quantidade no verão, independentemente da idade dos animais, enquanto que no inverno diminui significativamente apenas para animais mais velhos, sugerem que a biohidrogenação ruminal em animais mais novos é menos influenciada pela redução da temperatura do que para animais mais velhos. Sugere-se que a redução da temperatura ambiente exerça diferentes influências sobre animais novos e velhos. Animais mais novos parecem ter a atividade da enzima Δ^9 desaturase mais reduzidas com a diminuição da temperatura ambiente. Animais mais velhos parecem ter a biohidrogenação reduzida.

Tal qual para a quantidade de CLA, animais mais velhos no verão produziram uma menor razão n-6/n-3. Desta forma, poder-se-ia dizer que os leites produzidos por animais mais velhos no verão seriam aqueles com as melhores características em termos de composição em ácidos graxos.

✚ Após o processo de pasteurização, a observação do aumento na quantidade do ácido linolelaídico e CLA, bem como da diminuição da quantidade de ácido linoleico, podem sugerir que o ácido linoléico esteja se isomerizando em linolelaídico e em ácido linoléico conjugado, ou ainda em outros ácidos octadecadienóicos não analisados neste estudo, durante o processo de pasteurização.

Após o tratamento térmico as razões n-6/n-3 diminuíram significativamente. Assim, o processo de pasteurização não só melhora as características microbiológicas do leite, como influi positivamente na sua composição em ácidos graxos.

✚ A análise realizada com os derivados lácteos indicou que a quantidade de CLA na amostragem realizada no período do inverno foi superior àquela realizada no verão, para os queijos mussarela, provolone e para a bebida láctea. Em contrapartida, Ricota e Minas frescal apresentaram resultados contrários, diferindo significativamente em relação aos outros derivados.

A falta de homogeneidade verificada pelos resultados dos derivados em diferentes períodos do ano, tanto em relação à composição química quanto à quantidade dos ácidos graxos, indica que faltam procedimentos padrões na elaboração dos derivados lácteos, que dificultam uma possível normatização das embalagens, onde seriam interessantes informações a respeito da presença de ácido linoléico conjugado.

Além disso, essa heterogeneidade pode trazer também informações errôneas aos consumidores, que ao verificar a embalagem acreditam estar ingerindo, em média, aquilo que lá está descrito. As análises mostraram que em relação à quantidade de ácidos graxos saturados, informações obrigatórias dos rótulos dos alimentos, as variações foram muito grande.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackman, R.G., Sipos, J.C. *Application of specific response factors in the gas chromatography analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detectors*. Journal of American Oil Chemistry Society, 41: 377-378, 1964.
- Ackman, R.G. *The analysis of fatty acids and related materials by gas-liquid chromatography*. Progress in the Chemistry of Fats & Other Lipids, 12:165-284, 1972.
- Ackman, R.G. *The gás chromatography in practical analysis of common and uncommon fatty acids for the 21st century*. Analitica Chemical Acta, 465: 175-192, 2002.
- ACS-American Chemical Society. *Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in Environmental Chemistry*. Analytical Chemistry, 52: 2242-2249, 1980.
- Allinger, N. L.; Cava, M. P.; de Jongh, D. C.; Jonhson, C. R.; Lebel, N. A.; Stevens, C. L. *Química Orgânica*. Rio de Janeiro: Guanabara, 961p, 1978.
- Amouretti, M.C., *Cidades e campos gregos*. In: Flandrin, J.L, Montanari, M.: História da alimentação. Tradução: Luciano Vieira Machado e Guilherme J.F. Teixeira. Estação liberdade, Ltda, São Paulo, 1998.
- Andrade, P.V.D., Schmidely, P. *Influence of percentage of concentrate in combination with rolled canola seeds on performance, rumen fermentation and milk fatty acid composition in dairy goats*. Livestock Science, 104: 77– 90, 2006.
- Aro, A., Antoine, J.M., Pizzoferrato, L., Reykdal, O., van Poppel, G. *Trans fatty acids in dairy and meat products from 14 European Countries: The transfair study*. Journal of Food Composition and analysis, 11: 150-160, 1998.

- Bannon, C.D., Breen, G.J., Craske, J.D., Hai, N.T., Harper, N.L., O'Rourke, K.L. *Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability.* Journal of Chromatography, 247: 71-89, 1982.
- Barry, E.F. *Columns: packed and capillary/column selection in gas chromatography.* In: Grob, R.L. (editor). Modern practice of gas chromatography. New York: John Wiley & Sons, 887p., 1995.
- Bauman, D. E. *Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentration in milk fat.* Journal of Dairy Science, 3(84): 680-690, 2001.
- Behmer, M.L.A. Tecnologia do Leite. Ed. Nobel, 15 ed. São Paulo, 1991.
- Bhattacharya, A., Banu, J., Rahman, M., Causey, A., Fernandes, G. *Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease.* Journal of Nutritional Biochemistry, 18 (7): 467-474, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Divisão de Normas Técnicas. *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, 1997 a.
- BRASIL. Portaria nº 352 de 4 de setembro de 1997. Aprovar o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Minas Frescal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Seção 1, p. 19684. Brasília, DF. 8 set. 1997 b.
- BRASIL. Portaria nº 366, de 4 de setembro de 1997. Aprovar o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de massa para elaborar queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela). *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Seção 1, p. 19695. Brasília, DF, 8 set. 1997 c.
- Bobbio, F.O e Bobbio, P.A. *Introdução à Química de Alimentos.* Livraria Varela, 2ª edição, 1995.

- Brondz, I. *Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques*. Analytica Chimica Acta, 465: 1-37, 2002.
- Buccione, A., Antongiovanni, M., Petacchi, F., Mele, M., Serra, A., Secchiari, P., Benvenuti, D. *Effect of dietary fat quality on C_{18:1} fatty acids and conjugated linoleic acid production: An in vitro rumen fermentation study*. Animal Feed Science and Technology, 127: 268-282, 2006.
- Bugaud, C., Buchin, S., Coulon, J.B., Hauwuy, A., Dupont, D. *Influence of the nature of alpine pastures on plasmin activity, fatty acid and volatile compound composition of milk*. Le lait, 81(3):401-414, 2001.
- Christie, W.W. *Some recent advances in the chromatographic analysis of lipids*. Analysis, 26: 34-40, 1998.
- Cobuci, J.A., Euclides, R.F., Verneque, R.S., Teodoro, R.L., Lopes, P.S., Silva, M.A. *Curva de Lactação na Raça Guzerá*. Revista brasileira de zootecnia, 29(5):1332-1339, 2000.
- Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S. *Fundamentos de Cromatografia*. Editora Unicamp, Campinas, São Paulo, 2006.
- Collins, Y.F., McSweeneyb, P.L.H., Wilkinson, M.G. *Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge*. Review. International Dairy Journal, 13: 841-866, 2003.
- Collomb, M., Bütikofer, U., Sieber, R., Jeangros, B., Bosset, J.O. *Composition of fatty acids in cow's milk fat produced in the lowlands, mountains and highlands of Switzerland using high-resolution gas chromatography*. International Dairy Journal, 12:649-659, 2002.
- Collomb, M., Sollberger, H., Bütikofer, U., Sieber, R., Stoll, W., Scharen, W. *Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat*. International Dairy of Journal, 14: 549-559, 2004.
- Conseleite. Federação da Agricultura do Estado do Paraná. Disponível em www.faep.com.br/conseleite . Acesso em 27/05/2008.

- Ctena, M.L.B., Piroli, M. *Leite longa vida: indispensável na cozinha saudável*. Editora e Consultoria em nutrição Ltda, São Paulo: 71-73, 1999.
- Cunniff, P.A. *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th ed. Arlington: Association of Official Analytical Chemists, v. 2, 1998.
- Cunningham, J. G. *Tratado de Fisiologia Veterinária*. Edit. Guanabara Koogan, (527p), Rio de Janeiro, 1999.
- Cruz, C.D. e Gomes, M.I. *Avaliação do teor de lipídios em queijos Minas Frescal industrializados e artesanais e em ricotas comercializados na região de Botucatu/SP*. Revista Instituto Adolfo Lutz, 60(2): 109-112, 2001.
- De Carvalho, Marcelo Pereira; Fazio, Gabriela; Cavalcanti, Miguel; Groppo, Helen; Schirner, Ana Carolina. Levantamento TOP 100, 2002. Disponível em: <http://www.milkpoint.com.br> . Acesso em: 27/05/2008.
- Dewhurst, R.J., Shingfield, K.J., Lee, M.R.F., Scollan, N.D. *Increasing the concentrations of beneficial polyunsaturated fatty acids in milk produced by dairy cows in high-forage systems*. Animal Feed Science and Technology, 131 (3-4): 168-206, 2006.
- Dobson, G., Christie, W.W., Nikolova-Damyanova, B. *Silver ion chromatography of lipids and fatty acids*. Journal of Chromatography B., 671: 197-222, 1995.
- Eder, K. *Gas chromatography analysis of fatty acid methyl esters*. Journal of chromatography B, 671: 113-131, 1995.
- Embrapa Gado de Leite, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Informações Técnicas (Estatísticas do Leite). Disponível em www.cnpjl.embrapa.br . Acesso em 28/05/2008.
- FAO. Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, 2007. Disponível em <http://faostat.fao.org/site/601/default.aspx>. Acesso em: 14/02/2008.
- Fite, A., Goua, M., Wahle, K.W.J., Schofield, A.C., Hutcheon, A.W., Heys, S.D. *Potentiation of the anti-tumour effect of docetaxel by conjugated linoleic*

- acids (CLAs) in breast cancer cells in vitro*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, 77: 87-96, 2007.
- Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S. *A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues*. The Journal of biological chemistry. 226(1): 497-509, 1957.
- Frandsom. R.D., Wilke, W.L, Fails, A.D. *Anatomia e Fisiologia dos Animais de Fazenda*. 6ª ed , Edit. Guanabara Koogan, (454p), Rio de Janeiro, 2003.
- Fuente, M.A. de la; Luna, P.; Juarez, M. *Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers*. Trends in Analytical Chemistry, 25(9): 917-926, 2006.
- Giroux, H.J., St-Amant, J.B., Fustier, P., Chapuzet, J-M., Britten, M. *Effect of electroreduction and heat treatments on oxidative degradation of a dairy beverage enriched with polyunsaturated fatty acids*. Food Research International, 41: 145–153, 2008.
- Golay, P. A. ; Dionisi, F. ; Hug, B. ; Giuffrida, F.; Destailats, F. *Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on trans fatty acid content*. Food Chemistry, 3: 1115-1120, 2007.
- González, F. H. D. e Campos, R. *O leite como indicador metabólico-nutricional em vacas*. A Hora Veterinária, 22 (131): 36-38, 2003.
- Gurtler, H., Ketz, H. A., Schroder, L. *Fisiologia Veterinária*. 4ª ed, Edit. Guanabara (610p), Rio de Janeiro, 1984.
- Grundy, S.M. *What is the desirable ratio of saturated, polyunsaturated and monounsaturated fatty acids in the diet?*. American Journal of Clinical Nutrition, 66(suppl):988S-90S, 1997.
- HMSO. England Departament of Health. *Nutritional Aspects of Cardiovascular Disease*. Health and Social Subjects. Report Number 46. London, HMSO, p. 1-15, 1994.
- Láctea Brasil, 2008. Disponível em <http://www.lacteabrasil.org.br>. Acesso em: 28/05/2008,

- Ledoux, M., Laloux, L., Wolff, R.L. *Analytical methods for determination of trans-C18 fatty acid isomers in milk fat. A review.* *Analysis*, 28: 402-412, 2000.
- Machado, E.C., Ferreira, C.L.L.F., Fonseca, L.M., Soares, F.M., Pereira Junior, F.N. *Características físico-químicas e sensoriais do queijo Minas artesanal produzido na região do Serro, Minas Gerais.* *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 24(4): 516-521, out.-dez. 2004.
- Martin, C.A. Milinsk, M.C., Visentainer, J.V., Matsushita, M., Souza, N.E. *Trans fatty acid-forming processes in foods: a review.* *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*, 79(2):343-350, 2007.
- Martin, C.A.; Almeida, V.V.; Ruiz, M.R.; Visentainer, J.E.L.; Matsushita, M.; Souza, N.E.; Visentainer, J.V. *Ácidos graxos poliinsaturados omega-3 e omega-6: importância e ocorrência em alimentos.* *Brazilian Journal of Nutrition*. Campinas, 19(6): 761-770, 2006.
- Mattson, F.H., Erickson, B.A., Kligman, A.M. *Effect of dietary cholesterol on serum cholesterol in man.* *American Journal Clinical Nutrition.*, 25(6):589-94, 1972.
- Maynard, L. A.; Loosli, J.K., Hintz, H.F., Warner, R.G. *Nutrição Animal.* Trad. Antonio B. Neiva Figueiredo. 3ªed, Edit. Freitas Bastos (736p), Rio De Janeiro, 1984.
- Mendham, J.B. *Vogel: Análise Química Quantitativa.* 6ª edição, LTC, 2002.
- Milinsk, M.C, Matsushita, M., Visentainer, J.V., Oliveira, C.C., Souza, N.E. *Comparative analysis of eight esterification methods in the quantitative determination of vegetable oil fatty acid methyl esters (FAME).* *Journal of Brazilian Chemical Society*, in press, 2008.
- Moura, E. C., Sonati, J. G. *Perfil lipídico de dietas e sua relação com os níveis de colesterolemia em escolares de uma escola pública de Campinas, São Paulo (Brasil),* *Revista Nutrição*, 11(1):69-75, Campinas, São Paulo, 1998.

- Mourão, D. M.; Monteiro, J.B.R.; Costa, N.M.B.; Stringheta, P. C.; Minin, V.P.R.; Dias, C.M.G.C. *Ácido linoléico conjugado e perda de peso*. Brazilian Journal of Nutrition. Campinas, 18(3):391-399, 2005.
- Mustad, V.A., Etherton, T.D., Cooper, A.D. Mastro, A.M., Pearson, T.A., Jonnalagadda, S.S., Kris-Etherton, P.M. *Increased levels of LDL receptors on mononuclear cells in healthy men and women*. Journal of Lipid Research, 38, 1997.
- Neff, W.E., Adlof, R.O, El-Agaimy, M. *Silverp íon high-performance liquid-chromatography of the triacylglycerols of crepis-alpina seed oil*. Journal of American Oil Chemistry Society, 71: 853-855, 1994.
- Neto, B.B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E. *Planejamento e Otimização de experimentos*. Campinas, SP: Editora Unicamp, 299p, 1995.
- Neto, B.B., Scarminio, I., Bruns, R.E., *Como fazer experimentos*. Pesquisa e Desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, SP: Editora Unicamp, 401p, 2001.
- O Paraná. Disponibilizado em www.o-parana.com Acesso em 28/05/2008.
- Ou, L., Ip, C., Lisafeld, B., Ip. M.M. *Conjugated linoleic acid induces apoptosis of murine mammary tumor cells via Bcl-2 loss*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 356: 1044–1049, 2007.
- Parodi, P.W. *Conjugated linoleic acid: an anticarcinogenic fatty acid present in milk*. Australian Dairy Technology, 49: 93-97, 1994.
- Peene, J., Zeeuw, J., Biermans, F., Joziasse, L. *CP-Select CB for FAME*, 2003. Disponível em: <http://www.vaianinc.com>. Acesso em: 20 mai 2008.
- Pereda, J.A. *Tecnología de los alimentos*. Volume II: alimentos de origem animal. Espanha: Editorial Síntesis, 75-78, 2005.
- Pereda, J.A., Jaramillo, D.P., Quevedo, J.M., Ferragut, V., Guamis, B., Trujillo, A.J. *Characterization of volatile compounds in ultra-high-pressure homogenized milk*. International Dairy Journal, 18: 826–834, 2008.
- Perry, K.S.P. *Queijos: aspectos químicos, bioquímicos e microbiológicos*. Química Nova, 27(2): 293-300, 2004.

- Prandini, A., Sigolo, S., Tansini, G., Brogna, N., Piva, G. *Different level of conjugated linoleic acid (CLA) in dairy products from Italy*. Journal of Food Composition and Analysis, 20 (6): 472-479, 2007.
- Purushotham, A., Shrode, G.E., Wendel, A.A., Liu, L.F., Belury, M.A. Conjugated linoleic acid does not reduce body fat but decreases hepatic steatosis in adult Wistar rats. Journal of Nutritional Biochemistry, Vol. 18: (10): 676-684, 2007.
- Ratnayake, W.M.N. *Analysis of trans fatty acids*. In: Sebédio, J.L., Christie, W.W. (editors). *Trans fatty acids in human nutrition*. Dundee: The oil press, 1998.
- Raynal-Ljutovac, K., Park, Y.W., Gaucheron, F., Bouhallab, S. *Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk*. Small Ruminant Research 68: 207–220, 2007.
- Roach, J.A.G.; Mossoba, M.M.; Yurawecz, M.P., Kramer, J.K.G. *Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers*. Analytica Chimica Acta, 465: 207–226, 2002.
- Rocha, D. *Processo evolutivo nas formas de conservação de leite*. Bovinocultura leiteira, 2007. Disponível em: <http://www.zootecniabrasil.com.br>. Acesso em: 20/05/2008.
- Rocha, F. *Análise da gordura total e do perfil de ácidos graxos em queijos do tipo mussarela, prato e ricota em comparação dos dados experimentais com os teóricos*. Tese: Universidade de Brasília, 2004.
- Roque, R.A., Shumacher, S.S.P., Paiva, P.C. *Quantificação de microorganismos psicrotóxicos em leites pasteurizados tipos B e C, comercializados na cidade de São Paulo – SP*. Revista Higiene Alimentar, 17 (112): 59-68, 2003.
- Rosado, E.L., Monteiro, J.B.R. *Obesidade e a substituição de macronutrientes da dieta*. Revista Nutrição, 14(2): 145-152, Campinas, São Paulo, 2001.
- Rynnea, N.M., Beresforda, T.P., Kellyb, A.L., Guineea, T.P. *Effect of milk pasteurization temperature and in situ whey protein denaturation on the*

- composition, texture and heat-induced functionality of half-fat Cheddar cheese*. International Dairy Journal, 14: 989–1001, 2004.
- Santos, G.T., Uhlig, L., Branco, A.F., Jobim, C.C., Damasceno, J.C., Cecato, U. *Bovinocultura de leite – Inovações tecnológica e sustentabilidade*. Editora da Universidade Estadual de Maringá, 2008.
- Schaefer, E.J. *Lipoproteins, nutrition, and heart disease*. American Journal of Clinical Nutrition, 75:191–212, 2002.
- Schmidt, G.H. *Biologia de la lactacion*. Editorial Acribia, Zaragoza, Espanha (307p), 1974.
- Seçkin K.A.; Gursoy, O; Kinik O.; Akbulut, N. *Conjugated linoleic acid (CLA) concentration, fatty acid composition and cholesterol content of some Turkish dairy products*. Food Science and Technology, 38: 909–915, 2005.
- Sieber, R; Collomba, M.; Aeschlimann, A.; Jelen, P.; Eyer, H. *Impact of microbial cultures on conjugated linoleic acid in dairy products—a review*. International Dairy Journal, 14: 1–15, 2004.
- Simopoulos, A.P. *Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases*. Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 60 (9), 502-507, 2006.
- Statsoft, Statistica 7.0 software. Tucksá, USA, 2004.
- Tetra-Pak. *Leite – alimento versátil*. 2005. Disponível em: <http://www.pratique.com.br>, Acesso em: 29/05/2008.
- Thalpur, F. N.; Bhangar, M.I.; Khuhawar, M.Y. *Comparison of fatty acids and cholesterol content in the milk of Pakistani cow breeds*. Journal of Food Composition and Analysis, 19: 698-703, 2006.
- Tsiplakou, E., Zervas, G. *Comparative study between sheep and goats on rumenic acid and vaccenic acid in milk fat under the same dietary treatments*. Livestock Science, in press, 2008.
- Vilela, Duarte; Leite, José Luiz Bellini; Resende, João Cesar. *Políticas para o Leite no Brasil: Passado, presente e futuro*. Anais do Sul- Leite: Simpósio

sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil / editores Geraldo Tadeu dos Santos *et al.* – Maringá : UEM/CCA/DZO – NUPEL, 1-26, 2002.

Visentainer, J.V. e Franco, M.R.B. *Ácidos Graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação*. Ed. Varela, São Paulo, 2006.

Wahle, K.W.J., Heys, S.D., Rotondo, D. conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Progress in Lipid Research*, 43: 553-587, 2004.

Anexo 1: Valores de comprimento equivalente de cadeia (ECL), calculados a partir do tempo de retenção corrigido de ésteres metílicos, e respectivos coeficientes angular, linear e de correlação, para análise de regressão linear dos valores de ECL

Éster metílico de ácido graxo	CEC referência ¹	CEC encontrado ²
	$Y = 0,1372x - 1,8425$ $R^2 = 0,9983$	
10:0	10.04	9.79
11:0	11.22	10.90
12:0	12.1	11.96
13:0	13.03	13.02
14:0	14	14.06
i15:0	14.51	14.52
15:0	14.98	15.10
i16:0	15.51	15.55
16:0	16	16.13
16:1n-5	16.37	16.45
17:1n-9	17.23	17.15
18:0	17.65	17.46
18:1n-9	18.21	18.17
18:1n-7	18.26	18.41
18:3n-6	18.92	18.90
18:3n-3	19.25	19.22

¹- Maia, 1992 – (Coluna DB-WAX 20M – 50mx0,22mmx0,25µ; 200°C/42min).

²- Coluna CP-7420 (100m, 0,25mm, 0,39 µm i.d., 100% cianopropil ligado, Varian, EUA).

Anexo 2: Fator de Correção Experimental (FCE), Teórico (FCT) e Fator de Erro (FE) para o Cromatógrafo à gás Varian CP-3380.

Ácido Graxo	FCE	FCT	%FE(erro)
4:0	2.73	1.59	1.71
6:0	1.20	1.35	0.88
8:0	0.89	1.23	0.72
10:0	0.80	1.16	0.69
11:0	0.82	1.14	0.72
12:0	0.82	1.11	0.74
13:0	0.84	1.10	0.76
14:0	0.81	1.08	0.75
14:1N-5	0.83	1.07	0.77
15:0	0.85	1.07	0.79
15:1	0.89	1.06	0.84
16:0	0.77	1.05	0.73
16:1N-7	0.87	1.05	0.83
17:0	1.12	1.04	1.07
17:1N-9	0.84	1.04	0.81
18:0	0.86	1.03	0.83
18:1N-9T	0.86	1.03	0.84
18:1N-9	0.76	1.03	0.74
18:2N-6T	0.91	1.02	0.89
18:2N-6	0.84	1.02	0.82
18:3N-6	1.06	1.01	1.04
18:3N-3	1.01	1.01	0.99
20:0	1.00	1.02	0.98
20:1N-9	0.88	1.01	0.87
20:2N-6	0.99	1.01	0.98
21:0	1.03	1.01	1.02
20:3N-6	1.16	1.00	1.16
20:3N-3	1.12	1.00	1.12
22:1N-9	1.04	1.00	1.04
22:0	0.99	1.01	0.98
20:4N-6	0.92	0.99	0.92
22:2N-6	1.27	0.99	1.28
23:0	1.00	1.00	1.00
20:5N-3	0.93	0.99	0.94
24:0	1.03	0.99	1.04
24:1N-9	0.92	0.99	0.93
22:6N-3	1.74	0.97	1.79

Anexo 3: Artigo de Investigação do material de referência Leite em pó, NIST 8435.

National Institute of Standards & Technology

Report of Investigation

Reference Material 8435

Whole Milk Powder

A Joint Material of Agriculture Canada and NIST

Distributed by the National Institute of Standards and Technology

Reference Material (RM) 8435 is intended for use in evaluating analytical methods and instruments used for the determination of major, minor, and trace constituent elements, as well as proximates, fatty acids, calories, and vitamins in milk, dairy products, and other similar food, agricultural, and biological materials. This material can also be used for quality assurance when assigning values to in-house control materials. RM 8435 consists of 40 g of dry powdered whole milk packaged in a glass bottle sealed in an aluminum-nylon pouch.

Reference Concentration Values: Reference concentration values for major, minor, and trace constituent elements are provided in Table 1. Reference concentration values for proximates, calories, and fatty acids are provided in Table 2. Reference concentration values for selected vitamins are provided in Table 3. The reference values in Tables 1 through 3 were derived from results reported in three separate interlaboratory comparison exercises. Reference values are noncertified values that are the best estimates of the true values; however, the values do not meet NIST criteria for certification and are provided with associated uncertainties that may reflect only measurement precision, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods.

Information Concentration Values: Information concentration values for additional elements, fatty acids, and selected vitamins are provided in Tables 4 through 6, respectively. These are noncertified values with no reported uncertainties as there is insufficient information to assess uncertainties. The information values are given to provide additional characterization of the material. Use of this RM to quantitatively monitor method performance for analytes other than those with reference concentration values in Tables 1 through 3 is not recommended.

Expiration of Certification: The certification of RM 8435 is valid, within the measurement uncertainty specified, until **25 February 2011**, provided the RM is handled in accordance with instructions given in this report (see "Instructions for Use"). This certification is nullified if the RM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

Maintenance of RM Value Assignment: NIST will monitor this RM over the period of its value assignment. If substantive technical changes occur that affect the value assignment before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet) will facilitate notification.

Statistical support was provided by M.S. Wolynetz of the Statistical Research Section, Research Program Service, Agriculture Canada and L.M. Gill of the NIST Statistical Engineering Division.

Support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Measurement Services Division.

Stephen A. Wise, Chief

Analytical Chemistry Division

Gaithersburg, MD 20899 Robert L. Watters, Jr., Chief

Report Issue Date: 27 April 2008 Measurement Services Division

See Report Revision History on Page 10

RM 8435 Page 1 of 12 RM 8435 Page 2 of 12

RM 8435 was prepared at Agriculture Canada under the direction of M. Ihnat, Centre for Land and Biological Resources Research (CLBRR). Coordination of the technical measurements leading to the value assignment of this RM was performed by M. Ihnat of CLBRR, Agriculture Canada, and K.E. Sharpless and S.A. Wise of the NIST Analytical Chemistry Division. Following the original analyses for elemental value assignment by the laboratories listed in Appendix A, the material was distributed by NIST to Covance Laboratories (Madison, WI), Lancaster Laboratories (Lancaster, PA), Medallion Laboratories (Minneapolis, MN), and Southern Testing and Research Laboratories (Wilson, NC) for the measurement of proximates, calories, and fatty acids. RM 8435 was also distributed in an interlaboratory comparison exercise in 1995; reference and information values for the concentrations of selected vitamins have been assigned based on results reported by the laboratories listed in Appendix C.

NOTICE AND WARNING TO USERS

Storage: Until required for use, RM 8435 should be refrigerated between 2 °C and 8 °C in its original bottle, tightly- capped, and not exposed to intense direct light or ultraviolet radiation.

Warning: For laboratory use only. Not for human consumption.

Instructions for Use: The bottle and contents should be allowed to warm up to room temperature prior to opening. Prior to each use, contents of the bottle should be well mixed by gentle shaking and rolling of the bottle. A minimum subsample size of 0.5 g should be taken for analysis. Moisture content should be determined on a separate subsample for conversion of analytical results to a dry-mass basis. The recommended method of drying to relate analytical results to the reference values listed in the tables is drying for 4 h in an air oven at 85 °C. Dissolution procedures for elemental analyses should be capable of rendering a completely dissolved sample appropriate to the method and should be designed to avoid losses of elements by volatilization or by retention on decomposition and processing containers and measuring equipment. Analytical methods should be capable of measuring total levels of elements for comparison with reference values.

PREPARATION AND ANALYSIS

Preparation: The source of material for RM 8435 was spray-processed whole milk powder (Fedeco brand manufactured by Cooperative Federe de Quebec, Montreal, Quebec) obtained from Cooperative Agricole de la Cote Sud, La Pocatiere, Quebec, Canada. All preparatory work following acquisition of the commercial product was performed at the facilities of Agriculture Canada, Ottawa [1,2]. The dry bulk powder was sterilized with cobalt-60 gamma radiation to 2.0 megarads by Atomic Energy of Canada Ltd. Material sieving was through nylon monofilament sieve cloths supported in high- density white polyethylene holders. Pairs of sieves with openings of approximately 250 µm and 90 µm were used to yield a middle-cut fraction for use as the RM. This fraction was blended in a polymethylmethacrylate V-configuration blender and packaged into clean 150 mL brim capacity, colorless glass bottles with tri seal (polyethylene)-lined white polypropylene screw caps. A total of 144 randomly selected units were used for physical and chemical characterization in the original analyses. Units were individually hermetically sealed in aluminum-nylon pouches to enhance long-term stability.

Homogeneity Assessment: Homogeneity testing was performed on randomly selected units for ten elements in three laboratories [2-4]. Subsamples of 0.5 g were taken from a total of four units and analyzed by M. Ihnat, Agriculture Canada, for calcium, potassium, magnesium, sodium, and zinc using acid digestion flame atomic absorption spectrometry [5,6]. Subsamples of 0.7 g to 3.0 g each, taken from a total of six units, were analyzed by R.W. Dabeka, Health and Welfare Canada, for cadmium, cobalt, nickel, and lead by graphite furnace atomic absorption spectrometry following acid digestion and separation and preconcentration of the analytes using coprecipitation with ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (cadmium, cobalt, and nickel) or palladium and ascorbic acid for lead [7-9]. Fluoride was determined by the same analyst in 0.2 g subsamples from six units by an acid-facilitated microdiffusion ion specific electrode method [10]. In addition, the analytical results obtained from a large number of analysts (Appendix A) participating in the interlaboratory comparison exercise were assessed to provide homogeneity estimates for other elements [3,4]. No statistically significant heterogeneity was found for aluminum, barium, boron, bromine, calcium, chlorine, copper, iodine, iron, lead, magnesium, manganese, molybdenum, nitrogen, phosphorus, potassium, selenium, sodium, strontium, sulfur, and zinc in sample sizes required by the analytical technique, ranging from 0.2 g to 3 g. Data for all analytes (including the proximates and fatty acids) have been statistically treated as though they are homogeneous, although the homogeneity of other analytes has not been investigated.

Value Assignment: Chemical analyses to establish reference concentrations of elements were conducted in an interlaboratory comparison exercise involving Agriculture Canada and selected analysts in other laboratories (Appendix RM 8435 Page 3 of 12)

A) using analytical methods listed in Table 7. Analyses were performed by each participant on duplicate subsamples from randomly selected (typically four) units of material; subsample sizes and methods were left to the discretion of the analyst. Subsample sizes ranged from 0.001 g to 5 g, typically 0.5 g. Elemental determinations were performed on the material “as received,” with conversion of results to a dry-mass basis using moisture values determined on separate 2 g subsamples by the drying procedure specified in the “Instructions for Use” section of this report.

Following the original elemental determinations, NIST distributed RM 8435 to four laboratories (Appendix B) for measurement of proximates, fatty acids, and calories. Each laboratory analyzed one portion from each of three bottles of RM 8435 using their routine methods (Table 8). Determinations were performed on the material “as received,” with conversion of results to a dry-mass basis using moisture values determined on separate subsamples taken from each of the three bottles. Standard Reference Material (SRM) 1846 Infant Formula was analyzed for quality assurance. RM 8435 was also analyzed by several laboratories participating in an interlaboratory comparison exercise in 1995; several of these laboratories (Appendix C) reported values for vitamins, and these results are provided as reference and information values in Tables 3 and 6.

Table 1. Reference Concentrations of Constituent Elements

Major Constituents	
Mass Fraction	
Element (%) ^(a)	Methods ^(b)
Nitrogen ^c	4.187 ± 0.043 I01, J01
Potassium	1.363 ± 0.047 A01, B02, B04, E01
Calcium	0.922 ± 0.049 A01, B02, B04, B05
Chlorine	0.842 ± 0.044 D01, D04, F02, K01, K02
Phosphorus	0.780 ± 0.049 B02, B04, B05, F01, F02, M01
Sodium	0.356 ± 0.040 A01, A03, B02, B03, D01, D04
Sulfur	0.265 ± 0.035 B02, B03, D04, F04, J02, J03, J04, M02
Minor and Trace Constituents	
Mass Fraction	
Element (mg/kg) ^(a)	Methods ^(b)
Magnesium	814 ± 76 A01, A03, B02, B03, B04, B05, D01
Zinc	28.0 ± 3.1 A01, A03, B02, B03, B04, B05, D02, D03, E01
Bromine	20 ± 10 D01, E01
Strontium	4.35 ± 0.50 B02, B03, B04, B05, C03, E01
Iodine	2.3 ± 0.4 D01, D05, F02
Iron	1.8 ± 1.1 B02, B03, B05, D02, E01, E02
Boron	1.1 ± 0.23 B02, B03, B04, B05, C03
Copper	0.46 ± 0.08 A05, B02, B05, C03, C06, D03, E01
Molybdenum	0.29 ± 0.13 B02, C03, C06, C07, D03, F01, H06
Manganese	0.17 ± 0.05 A05, A06, B02, B05, D03
Selenium	0.131 ± 0.014 B06, C01, C04, G01
Lead	0.11 ± 0.05 A05, A16, C03

^(a) Reference values, expressed as mass fractions, are based on the dry material, dried according to instructions in this report, and are equally weighted means of results from generally at least two, but typically several, different analytical methods applied by analysts in different laboratories. Uncertainties are imprecision estimates expressed either as a 95 % confidence interval or occasionally (B, Ca, Cl, Se) as an interval based on the entire range of accepted results for a single future determination based on a sample weight of at least 0.5 g. These uncertainties, based on among-method, among-laboratory, among-unit, and within-unit estimates of variances, include measures of analytical method and laboratory imprecisions and biases and material homogeneity. (NIST has replaced the previously used term “best estimate” with “reference value.”)

^(b) Analytical method codes and descriptions are provided in Table 7.

^(c) The reference value for nitrogen has been updated to include results from four additional collaborating laboratories (Appendix B). RM 8435 Page 4 of 12

Table 2. Reference Concentrations of Proximates, Selected Fatty Acids (as Triglycerides), and Calories
Mass Fraction, Mass Fraction,

Analyte as received (%) ^(a,b)	dry-mass basis (%) ^(a)
Moisture	3.54 ± 0.57 0 (by definition)
Solids	96.46 ± 0.57 100 (by definition)
Ash	5.97 ± 0.11 6.19 ± 0.13
Protein ^b	25.86 ± 0.67 26.81 ± 0.67 Carbohydrate 43.4 ± 3.0 45.0 ± 2.9
Fat	21.3 ± 2.4 22.0 2.7
Butanoic Acid (C4:0) (Butyric Acid)	1.03 ± 0.11 1.07 ± 0.11
Decanoic Acid (C10:0) (Capric Acid)	0.70 ± 0.18 0.73 ± 0.19
Dodecanoic Acid (C12:0) (Lauric Acid)	0.81 ± 0.13 0.84 ± 0.14
Tetradecanoic Acid (C14:0) (Myristic Acid)	2.72 ± 0.28 2.83 ± 0.31
Pentadecanoic Acid (C15:0)	0.302 ± 0.030 0.313 ± 0.033
Hexadecanoic Acid (C16:0) (Palmitic Acid)	7.11 ± 0.67 7.38 ± 0.73
Heptadecanoic Acid (C17:0) (Margaric Acid)	0.191 ± 0.020 0.198 ± 0.020
Octadecanoic Acid (C18:0) (Stearic Acid)	2.51 ± 0.19 2.60 ± 0.21
(Z)-9-Octadecenoic Acid (C18:1) (Oleic Acid)	3.54 ± 0.72 3.67 ± 0.76
9-Octadecenoic Acid (C18:1) (Z-Elaidic Acid)	0.417 ± 0.058 0.432 ± 0.060
Eicosanoic Acid (C20:0) (Arachidic Acid)	0.051 ± 0.005 0.053 ± 0.005
Calories ^(c)	(470 ± 10) kcal/100 g (490 ± 10) kcal/100 g

^(a) Each reference concentration value, expressed as a mass fraction on an as-received or dry-mass basis, is an equally weighted mean of results from the laboratories shown in Appendix B. The uncertainty in the reference values is expressed as an expanded uncertainty, U , at the 95 % level of confidence, and is calculated according to the method described in the *ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* [11]. The expanded uncertainty is calculated as $U = k u_c$, where u_c is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined effect of between-laboratory and within-laboratory components of uncertainty. The coverage factor, k , is determined from the Student's t -distribution corresponding to the appropriate associated degrees of freedom and 95 % confidence for each analyte. Analytical methodology information is provided in Table 8.

^(b) The “as received” values are based on the moisture content at the time the measurements for value assignment were performed. The amount of moisture in this material may change if moisture is transferred to or absorbed from the atmosphere during storage.

^(c) The protein concentration was calculated from the nitrogen values reported by the laboratories shown in Appendix B using a conversion factor of 6.38; subsequent calculation of carbohydrates and calories were also based on these protein concentrations. The nitrogen values reported by the laboratories shown in Appendix B were combined with the original data for calculation of the reference value for nitrogen provided in Table 1.

^(d) The value for calories is the mean of the individual caloric calculations. If the mean proximate values are used for calculation, with caloric equivalents of 9, 4, and 4 for fat, protein, and carbohydrate, respectively, the mean caloric content is 460 kcal/100 g and 490 kcal/100 g on an as-received and dry-mass basis, respectively. RM 8435 Page 5 of 12

Table 3. Reference Concentrations of Selected Vitamins

Mass Fraction, Mass Fraction, Analyte as received (mg/kg) ^(a) dry-mass basis (mg/kg) ^(a)
Vitamin B ₁ 1.80 ± 0.52 1.87 ± 0.54
Vitamin B ₂ 10.6 ± 3.2 11.0 ± 3.4
Vitamin B ₆ 1.86 ± 0.58 1.94 ± 0.61
Vitamin B ₁₂ 0.017 ± 0.003 0.018 ± 0.003
Niacin 7.35 ± 0.86 7.65 ± 0.93
Pantothenic Acid 25.6 ± 5.4 26.7 ± 5.7

^(a) Each reference concentration value, expressed as a mass fraction on an as-received or dry-mass basis, is an equally weighted mean of results from the laboratories shown in Appendix C. The uncertainty in the reference values is expressed as an expanded uncertainty, U , at the 95 % level of confidence, and is calculated according to the method described in the *ISO Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement* [11]. The expanded uncertainty is calculated as $U = k u_c$, where u_c is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined effect of between-laboratory and within-laboratory components of uncertainty. The coverage factor, k , is determined from the Student's t -distribution corresponding to the appropriate associated degrees of freedom and 95 % confidence for each analyte. Analytical methodology information is provided in Table 9.

Table 4. Information Concentrations of Constituent Elements

Mass Fraction Element (mg/kg) ^(a) Methods ^(b)
Aluminum 0.9 A05, A06, B02
Arsenic 0.001 D03
Cadmium 0.0002 A16
Cobalt 0.003 A16, D02
Chromium 0.5 B02, B04
Fluorine 0.17 H04
Nickel 0.01 A14, A16
Rubidium 16 D01, D02, E01
Titanium 4 B02, C08, E02
Tungsten 0.002 C07, H06

^(a) These analytical values, on a dry-mass basis, are estimates given strictly for information only, as they are based on results of limited determinations or only one method; no uncertainties are provided.

^(b) Analytical method codes and descriptions are provided in Table 7.

Table 5. Information Concentrations of Selected Fatty Acids (as Triglycerides)

Mass Fraction, Mass Fraction, Analyte as received (%) ^(a) dry-mass basis (%) ^(a)
Tridecanoic Acid (C13:0) 0.030 0.031
9-Tetradecenoic Acid (C14:1) 0.22 0.23 (Myristoleic Acid)
9-Hexadecenoic Acid (C16:1) 0.30 0.31 (Palmitoleic Acid)
Docosanoic Acid (C22:0) 0.030 0.31 (Behenic Acid)
Tetracosanoic Acid (24:0) 0.021 0.022 (Lignoceric Acid)

^(a) These information values, reported on an as-received or dry-mass basis, are the equally weighted means of results reported by the laboratories shown in Appendix B. These values are based on results from determinations by two to four of the laboratories and are included to provide additional characterization of the material; no uncertainties are provided. Analytical methodology information is provided in Table 8. RM 8435 Page 6 of 12

Table 6. Information Concentrations of Selected Vitamins

Mass Fraction, Mass Fraction,
 Analyte as received (mg/kg)^(a) dry-mass basis (mg/kg)^(a)
 Vitamin A (as *trans*-retinol) 1.9 2.0
 Vitamin D 0.039 0.041
 Biotin 0.15 0.16
 Choline 940 980
 Inositol 310 320

^(a) These information values, reported on an as-received or dry-mass basis, are the equally weighted means of results reported by the laboratories shown in Appendix C. These values are based on results from determinations by one to four laboratories, and are included to provide additional characterization of the material; no uncertainties are provided. Analytical methodology information is provided in Table 9.

Table 7. Analytical Methods Used by Collaborating Laboratories (Appendix A) to Determine Reference and Information Concentration Values of Elements^(a)

Analytical Method Code Elements Determined
 Acid digestion flame atomic A01 Ca, K, Mg, Na, Zn
 absorption spectrometry
 Dry ashing flame atomic A03 Mg, Na, Zn
 absorption spectrometry
 Closed vessel acid digestion A05 Al, Cu, Mn, Pb
 electrothermal atomic absorption
 spectrometry
 Dry ashing electrothermal A06 Al, Mn
 atomic absorption spectrometry
 Acid digestion solvent extraction A14 (Ni)
 flame atomic absorption
 spectrometry
 Acid digestion coprecipitation A16 (Cd), (Co), (Ni), Pb
 electrothermal atomic absorption
 spectrometry
 Acid digestion inductively B02 Al, B, Ba, Ca, (Cr), Cu, Fe, K, Mg, Mo, Na, P, S, Sr,
 coupled plasma atomic (Ti), Zn
 emission spectrometry
 Closed vessel acid digestion B03 Ba, Fe, Mg, Na, S, Sr, Zn
 inductively coupled plasma
 atomic emission spectrometry
 Dry ashing inductively coupled B04 B, Ba, Ca, (Cr), K, Mg, P, Sr, Zn
 plasma atomic emission spectrometry
 Acid digestion dry ashing B05 Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Sr, Zn
 inductively coupled plasma atomic
 emission spectrometry RM 8435 Page 7 of 12

Acid digestion hydride generation B06 Se
inductively coupled plasma
atomic emission spectrometry
Acid digestion isotope dilution C01 Se
mass spectrometry
Closed vessel acid digestion C03 Ba, Cu, Mo, Pb, Sr
isotope dilution inductively
coupled plasma mass spectrometry
Acid digestion dry ashing C04 Se
hydride generation isotope
dilution inductively coupled
plasma mass spectrometry
Acid digestion isotope dilution C06 Cu, Mo
inductively coupled plasma mass
spectrometry
Dry ashing inductively coupled C07 Mo, (W)
plasma mass spectrometry
Acid digestion inductively coupled C08 (Ti)
plasma mass spectrometry
Instrumental neutron activation D01 Br, Cl, I, Mg, Na, (Rb)
analysis
Instrumental neutron activation D02 (Co), Fe, (Rb), Zn
analysis with acid digestion
Neutron activation analysis D03 (As), Cu, Mn, Mo, Zn
with radiochemical separation
Neutron capture prompt gamma D04 B, Cl, Na, S
activation analysis
Epithermal instrumental neutron D05 I
activation analysis
Particle induced X-ray E01 Br, Cu, Fe, K, (Rb), Sr, Zn
emission spectrometry
X-ray fluorescence E02 Fe, (Ti)
Acid digestion light absorption F01 Mo, P
spectrometry
Dry ashing light absorption F02 Cl, I, P
spectrometry
Combustion light absorption F04 S
spectrometry
Acid digestion fluorometry G01 Se
Extraction ion selective H04 (F)
electrode RM 8435 Page 8 of 12

Dry ashing catalytic adsorption H06 Mo,(W)
 Polarography
 Kjeldahl method for nitrogen - I01 N^(b)
 volumetry
 Combustion elemental analysis - J01 N^(b)
 thermal conductivity
 Combustion elemental analysis J02 S
 with chromatographic separation -
 thermal conductivity
 Combustion elemental analysis - J03 S
 infrared spectrometry
 Combustion elemental analysis - J04 S
 fluorometry
 Extraction volumetry K01 Cl
 Dry ashing volumetry K02 Cl
 Acid digestion gravimetry M01 P
 Dry ashing gravimetry M02 S

^(a) Letter codes refer to classes of similar methods; number codes refer to specific variants. Elements in parentheses have only information values in this RM.

^(b) See Table 8 for additional information.

Table 8. Methods Used by Collaborating Laboratories (Appendix B) for the Determination of Proximates, Calories, and Fatty Acids

Ash mass loss after ignition in a muffle furnace
 Calories calculated; $[(9 \times \text{fat}) + (4 \times \text{protein}) + (4 \times \text{carbohydrate})]$
 Carbohydrate calculated; $[\text{solids} - (\text{protein} + \text{fat} + \text{ash})]$
 Fat sum of individual fatty acids
 Fatty acids hydrolysis followed by gas chromatography
 Moisture mass loss after drying in a vacuum oven (3 laboratories); mass loss after drying in a forced-air oven (1 laboratory)

Nitrogen Dumas (1 laboratory); modified Dumas (1 laboratory); Kjeldahl (2 laboratories). Note that in the original elemental determinations, 8 laboratories provided results using Kjeldahl, combustion - thermal conductivity, and combustion - chromatographic separation - thermal conductivity.

Protein calculated from nitrogen using a factor of 6.38

Solids calculated; $(\text{sample mass} - \text{moisture})$

Table 9. Methods Used by Collaborating Laboratories (Appendix C) for the Determination of Vitamins
 Vitamin A saponification – normal-phase liquid chromatography (NPLC) – absorbance detection (1 laboratory)
 saponification – reversed-phase liquid chromatography (RPLC) – absorbance detection (1 laboratory)

Vitamin D saponification – NPLC – absorbance detection (2 laboratories)

saponification – RPLC – absorbance detection (2 laboratories)

Vitamin B₁ microbiological (1 laboratory) RM 8435 Page 9 of 12

digestion with fluorescence detection (3 laboratories)
extraction – RPLC – fluorescence detection (3 laboratories)
Vitamin B₂ microbiological (1 laboratory)
digestion with fluorescence detection (3 laboratories)
extraction – RPLC – fluorescence detection (2 laboratories)
Vitamin B₆ microbiological (5 laboratories)
Vitamin B₁₂ microbiological (6 laboratories)
Niacin microbiological (5 laboratories)
acid digestion – colorimetry (1 laboratory)
Folic Acid microbiological (5 laboratories)
Pantothenic Acid microbiological (5 laboratories)
Biotin microbiological (5 laboratories)
Choline acid digestion – colorimetry (2 laboratories)
acid digestion – LC – enzymatic reaction – Pt electrode (1 laboratory)
acid digestion – choline oxidase membrane (1 laboratory)
Inositol LC - amperometry (1 laboratory) RM 8435 Page 10 of 12

REFERENCES

- [1] Ihnat M.; *Preparation of Twelve Candidate Agricultural Reference Materials*; Fresenius' J. Anal. Chem., Vol. 332, pp. 539–545 (1988).
- [2] Ihnat, M.; Dabeka, R.W.; Wolynetz, M.S.; *Preparation and Homogeneity Characterization of Ten Agricultural/Food Reference Materials for Elemental Composition*; Fresenius' J. Anal. Chem., Vol. 348, pp. 445–451 (1994).
- [3] Ihnat, M.; Stoeppler, M.; *Preliminary Assessment of Homogeneity of New Candidate Agricultural/Food Reference Materials*; Fresenius' J. Anal. Chem., Vol. 338, pp. 455–460 (1990).
- [4] Ihnat, M.; *Characterization (Certification) of Bovine Muscle Powder (NIST RM 8414), Whole Egg Powder (NIST RM 8415) and Whole Milk Powder (NIST RM 8435) Reference Materials for Essential and Toxic Major, Minor, and Trace Element Constituents*; Fresenius' J. Anal. Chem., Vol. 348, pp. 459–467 (1994).
- [5] Ihnat, M.; *High Reliability Atomic Absorption Spectrometry of Major and Minor Elements in Biological Materials*; Fresenius' J. Anal. Chem., Vol. 326, pp. 739–741 (1987).
- [6] Ihnat, M.; *Reliable Measurement of Major, Minor, and Trace Elemental Nutrients*; J. Res. Natl. Bur. Stand., Vol. 93, pp 354–358 (1988).
- [7] Dabeka, R.W.; McKenzie, A.D. *Graphite-Furnace Atomic Absorption Spectrometric Determination of Lead and Cadmium in Food after Nitric-Perchloric Acid Digestion and Coprecipitation with Ammonium Pyrrolidine Dithiocarbamate*; Can. J. Spectrosc. Vol. 31, pp. 44–52 (1986).
- [8] Dabeka, R.W.; *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometric Determination of Lead, Cadmium, Cobalt and Nickel in Infant Formulas and Evaporated Milks After Nitric-Perchloric Acid Digestion and Coprecipitation with Ammonium Pyrrolidine Dithiocarbamate*; Sci. Total Environ. Vol. 89, pp. 271–277 (1989).
- [9] Dabeka, R.W.; *A Novel Coprecipitation Method for the Isolation and Concentration of Lead and Its Application to the GFAAS Determination of Microtrace Lead Levels in Biologicals, in Final Program of the 17th Annual Meeting of the Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies*; p. 102 (1990).
- [10] Dabeka, R.W.; McKenzie, A.D.; Conacher, H.B.S.; *Microdiffusion and Fluoride-Specific Electrode Determination of Fluoride in Foods*; J. Assoc. Off. Anal. Chem. Vol. 62, pp. 1065–1069 (1979).
- [11] ISO; *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, ISBN 92-67-10188-9, 1st ed. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland (1993); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office, Washington, DC (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.
- Report Revision History:** 27 April 2008 (Editorial changes); 17 March 2008 (Editorial changes); 25 January 2008 (Update of expiration date and editorial changes); 29 April 1999 (This technical revision reports the addition of reference and information values for fat, protein, carbohydrate, calories, ash, moisture, solids, fatty acids, and vitamins); 24 September 1993 (Original report date).
- Users of this RM should ensure that the report in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: telephone (301) 975-6776; fax (301) 926-4751; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.* RM 8435 Page 11 of 12

APPENDIX A

Collaborating Analysts for Elemental Determinations

- P. Allain and Y. Mauras, Laboratoire de Pharmacologie et Toxicologie, Centre de Pharmacovigilance, Centre Hospitalier Regional et Universitaire d'Angers, Angers Cedex, France.
- D.L. Anderson, Division of Contaminants Chemistry, Center for Food Safety and Applied Nutrition, US Food and Drug Administration, Washington, DC, USA.
- R. Beine, D.E. Lichtenberg, E. Denniston, and M. Peralta, Division of Regulatory Services, University of Kentucky, Lexington, KY, USA.
- P.R. Beljaars and Th. Rondags, Governmental Food and Commodities Inspection Service, Maastricht, The Netherlands.
- M. Bouraly, N. Texier, and A. Couty, Centre d'Application de Levallois, Atochem, Levallois-Perret, Cedex, France.
- W.T. Buckley, G. Wilson, and D. Godfrey, Agassiz Research Station, Agriculture Canada, Agassiz, BC, Canada.
- A. Chatt and R.R. Rao, Slowpoke-2 Facility, Trace Analysis Research Centre, Department of Chemistry, Dalhousie University, Halifax, NS, Canada.
- J.G. Crock, Branch of Geochemistry, US Geological Survey, Denver, CO, USA.
- W.C. Cunningham, Division of Contaminants Chemistry, Center for Food Safety and Applied Nutrition, US Food and Drug Administration, Washington, DC, USA.
- R.W. Dabeka, Food Research Division, Health Protection Branch, Health and Welfare Canada, Ottawa, ON, Canada.
- J. de Jong and E. Boers, State Institute for Quality Control of Agricultural Products (RIKILT), Wageningen, The Netherlands.
- J.F. Dlouhy, Analytical Services Division, River Road Environmental Technology Centre, Environment Canada, Ottawa, ON, Canada.
- A. Farina Mazzeo, R. Piergallini, E.P. Salsano, and F. Abballe, Laboratory of Pharmaceutical Chemistry, Istituto Superiore di Sanita, Rome, Italy.
- C.T. Figueiredo and W.B. McGill, Department of Soil Science, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.
- P.W.F. Fischer and A. Giroux, Bureau of Nutritional Sciences, Food Directorate, Health and Welfare Canada, Ottawa, ON, Canada.
- K. Frank, J. Denning, and L. Hayne, Institute of Agriculture and Natural Resources, Department of Agronomy, University of Nebraska-Lincoln, Lincoln, NE, USA.
- F.L. Fricke, C. Gaston, and K.A. Wolnik, National Forensic Chemistry Center, US Food and Drug Administration, Cincinnati, OH, USA.
- E.S. Gladney and E.M. Hodge, Health and Environmental Chemistry Group, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA.
- D.C. Gregoire, K. Church, and J.L. Bouvier, Analytical Chemistry Laboratory, Geological Survey of Canada, Energy Mines and Resources Canada, Ottawa, ON, Canada.
- R.D. Hauck and R.H. Scheib, Office of Agricultural and Chemical Development, Tennessee Valley Authority, Muscle Shoals, AL, USA.
- G.U. Hesselius, Mikro Kemi AB, Uppsala, Sweden.
- W. Holak, New York Regional Laboratory, US Food and Drug Administration, Brooklyn, NY, USA.
- M. Ihnat, Centre for Land and Biological Resources Research, Agriculture Canada, Ottawa, ON, Canada.
- J.L. Imbert and M. Olle, Service Centrale d'Analyse, Centre National de la Recherche Scientifique, Vernaison, France.
- L.L. Jackson, Branch of Geochemistry, US Geological Survey, Denver, CO, USA.
- D.L. Jeffress and S. Allison, Feed Control Laboratory, Missouri Department of Agriculture, Jefferson City, MO, USA.
- L. Jorhem, E. Ericsson, and C.A. Yates, National Food Administration, Uppsala, Sweden.
- P.F. Kane and N. Suttles, Indiana State Chemist Laboratory, Purdue University, West Lafayette, IN, USA.
- F.J. Kasler, Department of Chemistry, University of Maryland, College Park, MD, USA.
- B. Kratochvil and N. Motkosky, Department of Chemistry, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada.
- S.S. Krishnan and J. Lin, Medical Physics Laboratory, Toronto General Hospital, Toronto, ON, Canada.
- D. Kuik and P. Heida, Governmental Food and Commodities Inspection Service, Leeuwarden, The Netherlands.
- J. Kumpulainen, Central Laboratory, Agricultural Research Center of Finland, Jokioinen, Finland.

G.W. Latimer, Jr., W. Igler, L. Park, H. Hinojosa, C. Upton, and D. Arvelo, Agricultural Analytical Services, Office of the Texas State Chemist, College Station, TX, USA.

J.W. McLaren, S.N. Willie, V.J. Boyko, and S.S. Berman, Measurement Science, Institute for Environmental Chemistry, National Research Council of Canada, Ottawa, ON, Canada.

W. Maenhaut, and G. Hebbrecht, Laboratory for Analytical Chemistry, Instituut voor Nucleaire Wetenschappen, Rijksuniversiteit Gent, Gent, Belgium.

B. Magyar, B. Aeschlimann, and H.R. Elsener, Institute of Inorganic Chemistry, Swiss Federal Institute of Technology, RM 8435 Page 12 of 12

Zurich, Switzerland.

H. Mauss, R.U. Haak, G. Haarman, and H.W. Oehmen, Zentrale Forschung und Entwicklung, Zentrale Analytik, Bayer AG, Leverkusen, Federal Republic of Germany.

T.P. Mawhinney, R. Boles, R. Cathey, and P. Eggegan, Experimental Station Laboratories, College of Agriculture, University of Missouri-Columbia, Columbia, MO, USA.

I. Olmez, Nuclear Reactor Laboratory, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA.

I.S. Palmer, O.E. Olson Biochemistry Laboratories, Chemistry Department, South Dakota State University, Brookings, SD, USA.

J.B. Reust, H.R. Lang, and A. Janchen, Analytical Research and Development, Project/Product Coordination, Sandoz Pharma Ltd., Basle, Switzerland.

L.J. Schmidt and U. Soni, Mass Spectrometry and Elemental Analysis Department, Shell Development Company, West Hollow Research Center, Houston, TX, USA.

J. Schoenau, Department of Soil Science, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada.

P. Schramel, Institut für Okologische Chemie, Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH, Neuherberg, Federal Republic of Germany.

T.R. Shuler and F.H. Nielsen, Grand Forks Human Nutrition Research Center, US Department of Agriculture, Grand Forks, ND, USA.

R.J. Stevens and A. Beattie, Food and Agricultural Chemistry Research Division, Department of Agriculture (Northern Ireland), Belfast, Northern Ireland.

J.T. Tanner and K.K. Cook, Nutrient Surveillance Branch, Division of Nutrition, US Food and Drug Administration, Washington, DC, USA.

C. Veillon, K.Y. Patterson, and N. Hardison, Vitamin and Mineral Nutrition Laboratory, Beltsville Human Nutrition Research Center, US Department of Agriculture, Beltsville, MD, USA.

J. Versieck, L. Vanballenberghe, and A. Wittoek, Department of Internal Medicine, Division of Gastroenterology, University Hospital, Gent, Belgium.

R.F. Walker, K.J. Thurlow, and G. Holcombe, Laboratory of the Government Chemist, Teddington, Great Britain.

J.H. Watkinson and A.A. Judge, MAFTech Ruakura, Ruakura Agriculture Centre, Ministry of Agriculture and Fisheries, Hamilton, New Zealand.

G.M. Whitford, School of Dentistry, Department of Oral Biology - Physiology, Medical College of Georgia, Augusta, GA, USA.

P.C. Williams, Grain Research Laboratory, Canadian Grain Commission, Winnipeg, MB, Canada.

W. Yuen, Saskatchewan Research Council, Saskatoon, SK, Canada.

APPENDIX B

Collaborating Laboratories for Proximate, Fatty Acid, and Caloric Determinations

Covance Laboratories, Madison, WI, USA.

Lancaster Laboratories, Lancaster, PA, USA.

Medallion Laboratories, Minneapolis, MN, USA.

Southern Testing and Research Laboratories, Wilson, NC, USA.

APPENDIX C

Collaborating Laboratories for Vitamin Determinations

Abbott Laboratories, Ross Products Division, Columbus, OH, USA.

Bristol Meyers Squibb, Mead Johnson Nutritionals, Zeeland, MI, USA.

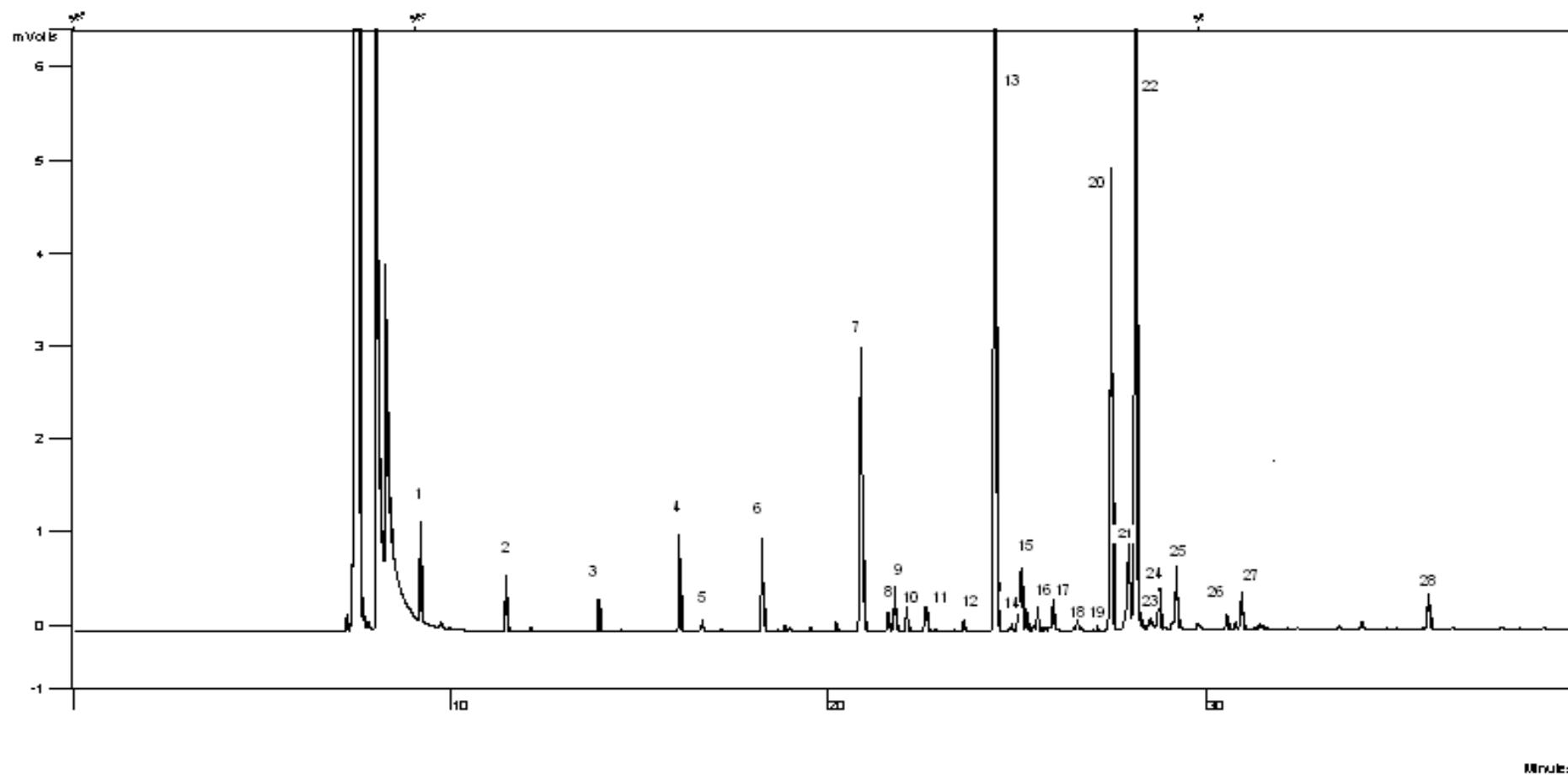
Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition, Washington, DC, USA.

Covance Laboratories, Madison, WI, USA.

Lancaster Laboratories, Lancaster, PA, USA.

Nestle USA, Dublin, OH, USA.

Southern Testing and Research Laboratories, Wilson, NC, USA.



ANEXO 4: Cromatograma representativo para os leites. (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) 20:0, (27) 18:2c9t11, (28) 23:0 (PI).

ANEXO 5: Ácidos Graxos em mg/g de lipídios totais para o leite cru proveniente de diferentes fornecedores no período do Verão

PRODUTOR	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ácido Graxo									
4:0	33,62 ^a ±4,93	29,94 ^{a,b} ±3,05	28,34 ^{a,b} ±3,25	36,64 ^a ±3,26	19,20 ^b ±1,27	20,53 ^b ±1,47	36,54 ^a ±4,26	313,32 ^a ±3,37	20,21 ^b ±3,12
6:0	15,96 ^{a,b,d} ±1,69	17,05 ^{a,b} ±1,19	14,90 ^{b,e} ±1,40	12,61 ^{c,e,g,f} ±1,25	13,24 ^{d,e,g} ±1,95	12,19 ^{e,f} ±0,73	17,38 ^a ±1,63	11,91 ^{f,g} ±1,19	10,24 ^f ±0,98
8:0	9,13 ^{a,e} ±0,90	8,56 ^{a,c,e} ±1,26	8,91 ^{a,e} ±0,92	7,03 ^{b,c,d} ±0,83	8,04 ^{d,e} ±1,41	6,89 ^{b,c,d} ±0,33	10,05 ^a ±0,94	6,15 ^b ±0,77	6,45 ^{b,d} ±0,82
10:0	19,48 ^{a,d} ±1,90	18,90 ^{a,d,e} ±2,42	19,15 ^{a,d} ±1,98	14,90 ^{b,c} ±1,49	15,19 ^{c,a} ±0,89	15,19 ^{c,a} ±0,60	21,87 ^d ±2,02	12,91 ^c ±1,57	15,64 ^{c,e} ±2,05
11:0	2,18 ^a ±0,27	2,13 ^a ±0,30	2,17 ^a ±0,19	1,90 ^a ±0,27	1,90 ^a ±0,13	1,85 ^a ±0,23	2,89 ^b ±0,48	1,76 ^a ±0,39	1,79 ^a ±0,22
12:0	23,10 ^{a,c} ±2,38	23,05 ^{a,c} ±2,22	23,09 ^{a,c} ±2,38	17,46 ^{b,d} ±1,70	18,29 ^{a,b} ±1,15	18,67 ^{a,b} ±0,53	25,99 ^c ±2,67	15,37 ^b ±1,78	21,41 ^{a,d} ±2,65
14:0	86,27 ^{a,c} ±9,83	94,80 ^{a,c} ±6,37	80,84 ^{a,b} ±8,42	66,08 ^b ±4,77	66,91 ^{b,c} ±5,12	74,88 ^{c,b} ±2,71	96,52 ^a ±13,21	65,34 ^b ±7,49	90,91 ^{a,c} ±12,21
14:1n-11	3,10 ^{a,d} ±0,37	2,25 ^{b,c} ±0,07	2,93 ^{a,c,d} ±0,28	2,71 ^{a,b} ±0,31	2,13 ^b ±0,41	2,24 ^{b,c} ±0,33	3,41 ^d ±0,26	2,40 ^{b,c} ±0,24	3,42 ^d ±0,46
14:1n-9	10,69 ^a ±1,17	11,73 ^{a,c} ±0,86	9,58 ^{a,b} ±0,69	9,84 ^{a,b} ±0,92	10,09 ^{a,b} ±1,52	9,59 ^{a,b} ±0,34	10,42 ^a ±0,97	8,52 ^b ±0,93	13,74 ^c ±2,03
14:1n-7	5,33 ^{a,b} ±0,46	6,54 ^a ±0,41	5,20 ^{a,b} ±0,62	5,85 ^a ±0,59	5,80 ^{a,b} ±1,02	5,11 ^{a,b} ±0,19	4,45 ^b ±0,28	6,15 ^a ±0,78	8,70 ^c ±1,17
15:0	9,83±0,79	10,03±0,56	8,49±0,90	10,03±1,00	9,68±1,61	9,39±0,43	8,12±0,51	9,85±1,14	10,07±1,96
15:1n-7	2,41 ^{a,b} ±0,26	2,71 ^a ±0,17	2,61 ^{a,c} ±0,35	2,08 ^b ±0,23	2,14 ^{a,b} ±0,21	2,20 ^{a,b} ±0,10	2,11 ^{b,c} ±0,18	2,44 ^{a,b} ±0,28	2,55 ^{a,b} ±0,33
16:0	241,30 ^{a,b} ±27,19	271,52 ^a ±11,16	223,25 ^{b,c} ±22,06	182,63 ^c ±16,79	202,62 ^{b,c} ±34,45	229,88 ^{a,c} ±7,79	268,80 ^a ±28,08	210,55 ^{b,c} ±24,12	239,73 ^{a,b} ±31,25
16:1n-11	10,53 ^{a,d,e} ±0,72	6,57 ^{b,c} ±0,54	8,84 ^{a,c,d} ±0,50	9,15 ^{a,c,d} ±0,59	6,94 ^{c,d} ±1,40	7,45 ^{c,d} ±0,50	10,49 ^{a,e} ±0,87	8,62 ^d ±1,07	11,57 ^e ±1,85
16:1n-9	7,63 ^{a,c} ±0,04	12,10 ^{b,e} ±0,41	11,27 ^{b,c} ±1,06	9,24 ^{a,c,d} ±0,57	9,67 ^{c,d} ±1,92	10,70 ^{b,d} ±0,53	12,55 ^{b,e} ±1,03	8,98 ^{a,d} ±0,77	14,03 ^e ±0,81
16:1n-7	3,87 ^{a,c} ±0,25	4,91 ^{b,c,d} ±0,29	3,71 ^{a,c} ±0,35	3,78 ^{a,c} ±0,35	3,06 ^{a,c} ±0,60	2,82 ^{a,c} ±0,17	4,00 ^c ±0,39	4,20 ^{a,b,d} ±0,52	5,12 ^d ±0,38
17:0	4,10 ^a ±0,38	5,59 ^b ±0,26	3,75 ^a ±0,41	4,28 ^{a,c} ±0,21	3,83 ^a ±0,35	4,03 ^a ±0,17	5,18 ^b ±0,42	4,93 ^{b,c} ±0,71	5,69 ^b ±0,62
17:0	6,29 ^{a,c,d} ±0,68	6,92 ^{a,c} ±0,37	4,71 ^{b,c,d} ±0,51	7,60 ^{a,d} ±0,37	5,47 ^{c,d} ±0,89	4,84 ^f ±0,18	5,99 ^d ±0,42	7,43 ^a ±0,87	10,91 ^e ±0,46
17:1n-7	2,34 ^{a,b} ±0,23	2,76 ^{a,c} ±0,13	2,02 ^b ±0,18	2,93 ^a ±0,25	2,21 ^{b,c} ±0,32	2,14 ^b ±0,35	1,98 ^b ±0,27	2,29 ^b ±0,27	3,61 ^d ±0,28
18:0	96,11 ^{a,b} ±8,04	95,62 ^{a,b} ±9,06	90,13 ^{a,b,d} ±7,49	82,59 ^{a,d} ±6,82	75,98 ^{a,d} ±10,36	82,28 ^{a,b,d} ±2,84	102,34 ^b ±10,47	120,82 ^c ±16,47	68,26 ^d ±16,02
18:1t	25,20 ^{a,c} ±2,29	26,67 ^{a,c} ±1,22	15,39 ^b ±1,53	30,73 ^{a,e} ±1,44	24,81 ^c ±2,82	18,74 ^{b,d} ±1,39	21,65 ^{c,d} ±2,07	34,05 ^e ±3,89	26,56 ^{a,c} ±3,27
18:1n-9	171,66 ^{a,b} ±13,43	192,15 ^{a,b,c,d} ±10,94	187,15 ^{a,b,c} ±18,32	189,29 ^{a,b,c} ±10,23	160,51 ^a ±30,19	162,01 ^a ±5,42	205,22 ^{b,c,d} ±15,80	212,93 ^{c,d} ±24,67	232,79 ^d ±20,08
18:1n-7	2,57 ^{a,c} ±0,35	3,26 ^a ±0,31	1,68 ^{b,c} ±0,08	2,32 ^{c,d} ±0,61	2,34 ^{c,d} ±0,4	2,38 ^{c,d} ±0,12	2,22 ^{c,d} ±0,28	2,26 ^{c,d} ±0,13	2,71 ^{a,d} ±0,31
18:2n-6t	6,53 ^{a,b,c} ±0,65	6,69 ^{a,b,c} ±0,51	7,14 ^{a,c,d} ±0,44	7,17 ^{a,c,d} ±0,57	5,58 ^b ±0,48	5,93 ^{a,b} ±0,28	7,69 ^{c,d} ±0,72	7,69 ^{c,d} ±0,98	8,63 ^d ±1,25

Continuação do anexo 5.

18:2n-6	15,37 ^a ±0,90	17,77 ^{a,b} ±1,50	17,40 ^{a,b} ±1,53	15,75 ^a ±1,16	14,28 ^a ±1,62	17,07 ^{a,b} ±0,42	19,45 ^b ±1,42	24,09 ^c ±3,30	15,83 ^a ±2,08
18:3n-3	3,18 ^{a,d} ±0,22	4,22 ^b ±0,24	1,70 ^c ±0,32	3,57 ^{a,b} ±0,81	2,76 ^{a,d} ±0,37	2,21 ^{c,d} ±0,07	3,03 ^a ±0,26	3,44 ^{a,b} ±0,30	3,05 ^a ±0,60
18:2c9t11	7,99 ^{a,d} ±0,70	8,61 ^{a,d,e} ±0,44	4,94 ^b ±0,46	13,16 ^{c,f} ±0,73	9,22 ^{a,e,f} ±1,03	5,74 ^{b,d} ±0,44	7,11 ^d ±0,81	9,92 ^{e,f} ±0,87	11,75 ^f ±1,22
AGS	491,57±30,64	556,20±16,45	356,17±25,26	329,74±19,25	334,17±36,52	385,69±8,94	462,08±33,26	466,20±30,51	380,20±37,54
AGMI	231,23±13,71	254,46±11,07	190,30±18,46	126,99±10,45	193,59±30,48	184,05±5,69	199,59±16,04	261,83±25,05	234,55±20,60
AGPI	25,33±1,33	27,78±1,66	19,05±1,69	20,73±1,70	21,19±2,01	23,78±0,67	29,42±1,81	35,32±3,56	28,24±2,78
n-6	15,43 ^{a,b,c} ±1,11	17,50 ^{a,b,c} ±1,59	14,99 ^{a,b,c} ±1,59	13,48 ^{a,b} ±1,30	11,06 ^a ±1,69	16,27 ^{a,b,c} ±0,50	22,89 ^{b,c} ±1,60	23,65 ^c ±3,44	18,48 ^{a,b,c} ±2,43
n-3	3,18 ^{a,d,e} ±0,22	4,22 ^{b,d} ±0,24	2,07 ^c ±0,32	5,05 ^{d,e} ±0,81	2,76 ^{a,e} ±0,37	2,21 ^{a,c} ±0,07	3,03 ^e ±0,26	3,44 ^{d,e} ±0,30	3,05 ^e ±0,60
AGPI/AGS	0,054±0,003	0,051±0,002	0,49±0,04	0,94±0,07	0,09±0,01	0,42±0,01	0,19±0,01	0,08±0,01	0,09±0,01
n-6/n-3	5,69 ^{a,c} ±0,40	4,82 ^{a,d} ±0,35	9,29 ^b ±1,22	5,58 ^{a,d} ±0,72	3,91 ^a ±0,56	8,57 ^c ±0,27	7,47 ^{c,d} ±0,59	6,97 ^{a,c} ±0,81	6,56 ^{a,c} ±1,08

Resultados expressos em percentagem como média±desvio padrão dos resultados das análises em triplicata de três diferentes lotes (n=81). AGS = Ácidos Graxos Saturados; AGMI = Ácidos graxos monoinsaturados; AGPI=ácidos graxos poliinsaturados; n-6=ácidos graxos ômega-6; n-3=ácidos graxos ômega-3. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 6: Ácidos Graxos em mg/g de lipídios totais para o leite cru proveniente de diferentes fornecedores no período do Inverno

Produtor	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Ácido Graxo									
4:0	26,10 ^{a,b,c} ±4,17	25,31 ^{a,b} ±3,10	24,25 ^{a,d} ±4,71	22,17 ^a ±2,84	20,74 ^a ±2,21	31,45 ^{b,c} ±3,55	32,15 ^{c,d} ±3,56	31,81 ^{c,d} ±3,75	29,37 ^{b,d} ±5,36
6:0	16,40 ^{a,b,c,d} ±2,03	17,07 ^{a,c,d,e} ±1,97	15,22 ^{a,b,c} ±2,40	13,34 ^b ±1,82	14,89 ^{a,b} ±1,72	18,86 ^{c,d} ±2,51	19,75 ^d ±2,04	20,02 ^e ±3,07	17,74 ^{a,d,e} ±2,58
8:0	9,37 ^{a,b} ±1,20	10,81 ^{a,d} ±1,04	9,26 ^{a,b} ±1,31	7,75 ^b ±1,04	8,91 ^{b,c} ±0,92	9,84 ^{a,c,d} ±1,29	11,81 ^d ±1,27	11,70 ^d ±1,35	10,38 ^{a,c,d} ±1,31
10:0	21,67 ^{a,c} ±1,85	26,45 ^{b,c} ±2,24	23,19 ^{c,d,e} ±3,01	18,23 ^a ±2,57	20,01 ^{a,d} ±1,78	22,18 ^{a,c,e} ±1,99	27,36 ^b ±3,16	26,46 ^{b,e} ±4,39	22,42 ^{c,d} ±2,81
11:0	2,95 ^{a,c} ±0,35	3,82 ^{b,c} ±0,42	3,27 ^{c,d,e} ±0,35	2,61 ^a ±0,36	3,22 ^{c,d,e} ±0,31	3,07 ^{a,d} ±0,25	3,98 ^b ±0,54	3,74 ^{b,e} ±0,42	3,48 ^{b,c,d} ±0,42
12:0	23,02 ^{a,c,e} ±2,65	33,06 ^{b,d} ±2,20	28,64 ^{b,c,e} ±2,68	21,39 ^{a,c} ±2,99	24,28 ^{a,c,e} ±2,05	26,06 ^{c,e} ±2,09	33,70 ^d ±4,19	31,51 ^{b,d,e} ±4,94	27,46 ^e ±2,66
14:0	88,76 ^a ±9,56	102,22 ^b ±6,02	92,36 ^{a,b} ±8,31	87,41 ^a ±10,61	88,25 ^a ±7,88	93,09 ^{a,b} ±7,46	104,19 ^b ±10,04	96,41 ^{a,b} ±7,38	102,75 ^b ±7,92
14:1n-11	3,49 ^a ±0,32	3,66 ^{a,b} ±0,49	4,00 ^{a,b} ±0,26	3,81 ^{a,b} ±0,39	3,80 ^{a,b} ±0,40	3,86 ^{a,b} ±0,31	4,34 ^b ±0,76	4,24 ^b ±0,36	4,37 ^b ±0,65
14:1n-9	10,31 ^{a,c} ±1,12	10,76 ^{a,b} ±0,97	8,81 ^a ±1,24	12,25 ^b ±1,65	11,15 ^{b,c} ±1,20	9,41 ^{a,c} ±0,76	12,23 ^b ±1,56	10,68 ^{a,b} ±0,92	12,35 ^b ±1,04
14:1n-7	4,77 ^{a,c} ±0,48	4,08 ^a ±0,25	4,30 ^a ±0,58	6,18 ^b ±0,72	5,52 ^{c,b,d} ±0,57	4,74 ^{a,c,d} ±0,36	5,21 ^c ±0,64	4,86 ^{a,c} ±0,70	6,17 ^d ±0,37
15:0	8,95 ^{a,c} ±0,86	10,64 ^{b,c} ±1,08	8,66 ^a ±0,80	10,42 ^{c,d} ±1,21	10,89 ^{b,d} ±1,10	8,95 ^{a,c} ±1,05	10,88 ^{b,d} ±1,11	10,94 ^{b,d} ±1,08	10,85 ^{b,d} ±1,02
15:1n-7	2,51 ^{a,c} ±0,12	1,78 ^b ±0,13	2,38 ^a ±0,26	2,44 ^{a,c} ±0,25	2,51 ^{a,c} ±0,34	2,48 ^{a,c} ±0,26	2,65 ^{a,c} ±0,34	2,50 ^{a,c} ±0,36	2,85 ^c ±0,36
16:0	274,76 ^a ±19,86	307,99 ^b ±12,40	244,39 ^c ±23,03	262,70 ^{a,c} ±19,87	257,31 ^{a,c} ±24,85	285,22 ^{a,b} ±26,33	268,36 ^{a,c} ±10,50	280,57 ^{a,b} ±23,66	269,90 ^{a,c} ±16,58
16:1n-11	9,16 ^a ±0,66	9,71 ^{a,b,d} ±0,83	9,59 ^{a,b,d} ±0,99	9,47 ^{a,b,d} ±1,08	9,16 ^{a,b} ±1,05	10,34 ^{a,b,c} ±0,86	11,03 ^{b,c} ±1,46	11,84 ^c ±1,62	11,09 ^{d,c} ±1,20
16:1n-9	12,86 ^{a,b} ±1,02	14,26 ^a ±1,18	12,12 ^b ±1,56	12,98 ^{a,b} ±1,46	12,93 ^{a,b} ±1,85	14,31 ^{a,b} ±1,07	13,90 ^a ±0,78	13,25 ^{a,b} ±1,10	13,55 ^{a,b} ±1,22
16:1n-7	3,68 ^a ±0,35	1,83 ^b ±0,43	3,02 ^c ±0,26	4,65 ^d ±0,37	3,48 ^{a,c} ±0,38	3,86 ^{a,e} ±0,27	4,35 ^{d,e} ±0,43	3,74 ^a ±0,45	4,56 ^d ±0,42
17:0	4,46 ^{a,c} ±0,52	3,87 ^a ±0,30	4,00 ^a ±0,40	5,81 ^b ±0,40	4,78 ^{c,d} ±0,47	4,65 ^{a,c,d} ±0,44	5,75 ^b ±0,74	4,61 ^{a,c} ±0,63	5,46 ^{b,d} ±0,49
17:0	5,77 ^{a,d} ±0,50	4,88 ^{b,e} ±0,56	4,42 ^b ±0,37	6,39 ^{a,c} ±0,43	6,88 ^c ±0,63	5,27 ^{b,d,e} ±0,66	5,69 ^{a,e} ±0,39	6,05 ^{a,d} ±0,83	6,07 ^{a,d} ±0,45
17:1n-7	2,44 ^a ±0,23	1,64 ^b ±0,22	1,63 ^b ±0,21	2,42 ^{a,c} ±0,21	2,71 ^a ±0,41	2,59 ^a ±0,38	2,62 ^a ±0,48	1,91 ^{b,c} ±0,29	1,88 ^{b,c} ±0,24
18:0	102,64 ^a ±9,42	67,30 ^b ±2,45	93,90 ^{a,c} ±12,20	83,31 ^{c,d} ±3,70	79,17 ^d ±8,01	105,77 ^a ±7,96	89,06 ^{c,d} ±3,69	80,31 ^{d,e} ±8,13	89,14 ^{c,e} ±4,64
18:1t	18,21 ^a ±1,01	13,87 ^b ±0,94	17,57 ^a ±1,41	17,38 ^{a,b} ±3,81	17,13 ^{a,b} ±1,83	23,60 ^c ±3,10	39,07 ^d ±1,82	15,45 ^{a,b} ±2,41	27,37 ^c ±2,71
18:1n-9	190,95 ^{a,e} ±7,44	144,20 ^{b,c} ±10,44	174,01 ^{a,c} ±20,32	164,94 ^c ±9,96	160,36 ^c ±24,62	231,70 ^d ±20,63	214,12 ^{e,d} ±11,70	169,17 ^{a,b,c} ±13,92	209,49 ^{e,d} ±15,94

Continuação anexo 6.

18:1n-7	2,50 ^{a,b,c} ±0,38	2,34 ^{a,b,c} ±0,59	2,08 ^{a,b} ±0,43	1,84 ^a ±0,23	1,71 ^a ±0,11	2,77 ^{b,c} ±0,62	3,13 ^c ±0,50	2,83 ^{b,c} ±0,47	2,70 ^{b,c} ±0,50
18:2n-6t	7,84 ^a ±0,69	5,78 ^b ±0,77	7,82 ^{a,b} ±0,65	7,28 ^{a,b} ±0,60	8,06 ^{a,d} ±1,25	8,85 ^{a,c} ±1,11	9,97 ^c ±1,82	6,59 ^{a,b} ±0,75	9,67 ^{c,d} ±2,35
18:2n-6	15,54 ^{a,d} ±1,74	16,89 ^{a,d} ±2,14	17,93 ^a ±1,13	15,77 ^{a,d} ±1,78	16,76 ^{a,d} ±1,91	22,34 ^b ±2,33	23,45 ^b ±1,64	32,55 ^c ±3,41	14,24 ^d ±1,75
18:3n-3	2,31 ^a ±0,31	1,62 ^a ±0,28	1,42 ^b ±0,13	2,45 ^a ±0,37	3,23 ^c ±0,43	2,11 ^{a,b} ±0,12	2,39 ^a ±0,09	3,31 ^c ±0,33	3,34 ^c ±0,22
18:2c9t11	4,80 ^{a,b} ±0,30	3,97 ^a ±0,36	4,71 ^a ±0,40	5,60 ^{a,b} ±1,44	6,31 ^b ±0,64	6,33 ^b ±0,78	10,31 ^c ±1,62	3,98 ^a ±0,46	10,94 ^c ±1,54
AGS	548,34±24,68	611,19±14,91	474,77±28,19	519,41±23,47	516,71±27,60	611,26±29,03	557,03±16,52	473,50±27,42	583,45±20,32
AGMI	235,00 ^{a,b} ±7,73	198,50 ^{a,b} ±10,67	182,38 ^{a,b} ±20,51	214,59 ^{a,b} ±10,98	184,35 ^{a,b} ±24,83	296,35 ^a ±20,94	256,29 ^{a,b} ±12,12	163,65 ^b ±14,33	263,11 ^{a,b} ±16,33
AGPI	29,09 ^{a,b} ±1,92	23,64 ^a ±2,38	27,73 ^{a,b} ±1,32	27,96 ^{a,b} ±1,92	36,21 ^{a,b} ±2,33	38,45 ^{a,b} ±2,58	38,98 ^b ±2,45	30,60 ^{a,b} ±3,51	33,39 ^{a,b} ±2,93
n-6	21,97 ^{a,d} ±1,87	21,85 ^{a,d} ±2,27	24,79 ^{a,b,d} ±1,31	20,41 ^{a,d} ±1,88	26,78 ^{a,b,d} ±2,28	30,92 ^{a,b} ±2,58	31,09 ^b ±2,45	39,47 ^c ±3,49	20,86 ^d ±2,93
n-3	2,31 ^a ±0,31	2,10 ^a ±0,63	1,42 ^b ±0,12	2,45 ^a ±0,10	3,23 ^c ±0,16	2,11 ^{a,b} ±0,17	2,38 ^a ±0,14	2,78 ^c ±0,06	3,34 ^c ±0,22
AGPI/AGS	0,05±0,003	0,04±0,002	0,07±0,004	0,05±0,003	0,07±0,004	0,06±0,001	0,07±0,004	0,08±0,01	0,06±0,001
n-6/n-3	9,73 ^{a,c} ±1,06	12,03 ^{a,d} ±2,43	19,28 ^b ±1,34	8,41 ^{a,c,e} ±0,55	8,47 ^{c,e} ±0,57	14,28 ^d ±1,17	13,32 ^d ±0,92	12,15 ^{a,d} ±0,66	6,72 ^e ±0,70

Resultados expressos em percentagem como média±desvio padrão dos resultados das análises em triplicata de três diferentes lotes (n=81). AGS = Ácidos Graxos Saturados; AGMI =Ácidos graxos monoinsaturados; AGPI=ácidos graxos poliinsaturados; n-6=ácidos graxos ômega-6; n-3=ácidos graxos ômega-3. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 7: Ácidos Graxos em mg/g de lipídios totais para o leite pasteurizado tipo “B” e “C” no período do Verão

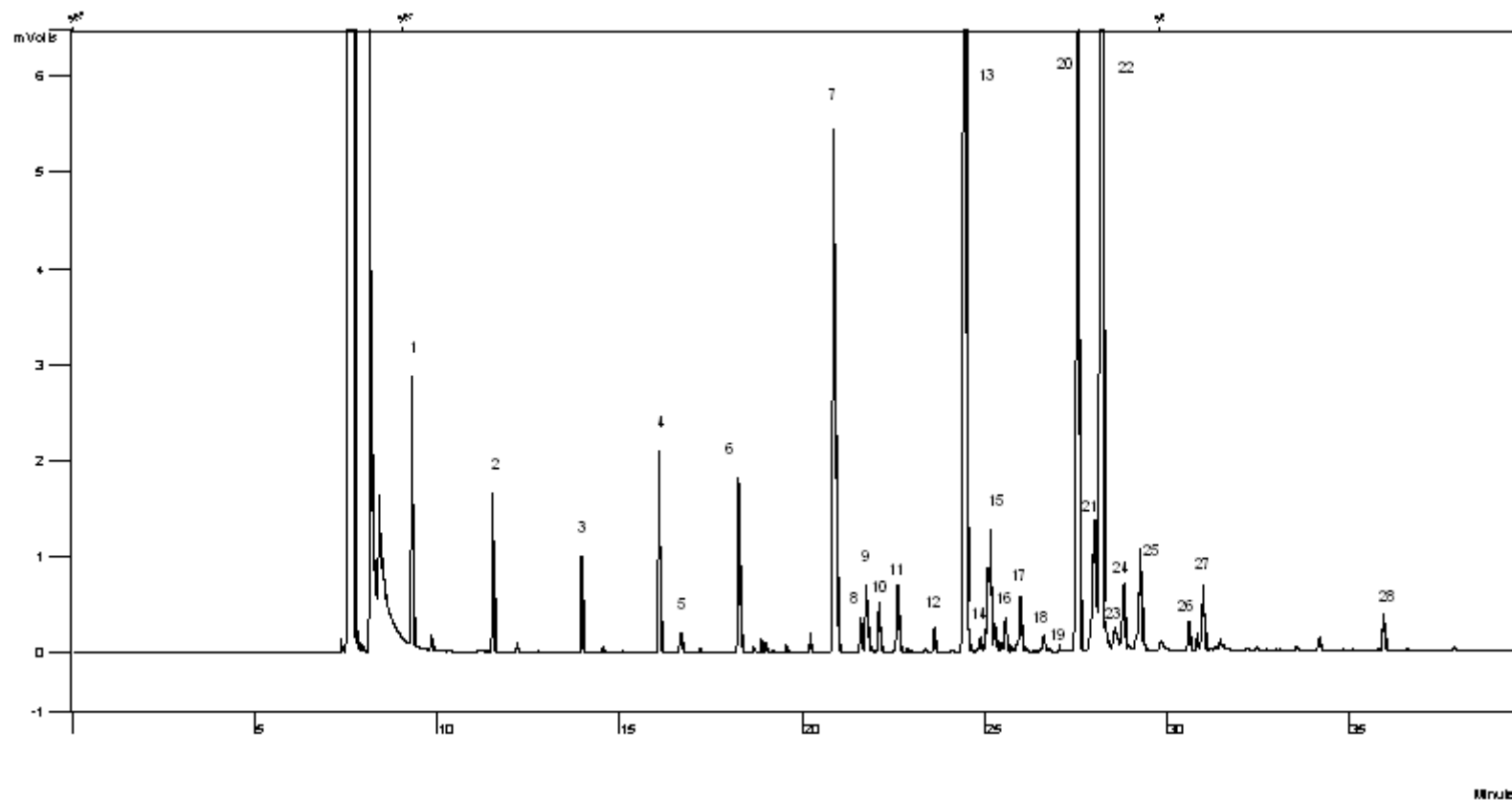
Ácido Graxo	Leite Pasteurizado tipo “B”	Leite Pasteurizado tipo “C”
4:0	36,32±5,67	37,32±2,67
6:0	17,19 ^a ±0,86	14,51 ^b ±1,69
8:0	9,79 ^a ±0,48	8,37 ^b ±0,92
10:0	20,78 ^a ±1,02	17,77 ^b ±1,80
11:0	2,45 ^a ±0,20	2,84 ^b ±0,39
12:0	24,65 ^a ±1,44	21,32 ^b ±2,01
14:0	94,99 ^a ±5,88	84,55 ^b ±6,67
14:1n-11	4,41 ^a ±0,21	4,15 ^b ±0,41
14:1n-9	12,73 ^a ±0,98	11,31 ^b ±0,80
14:1n-7	6,78 ^a ±0,45	6,17 ^b ±0,50
15:0	11,83 ^a ±0,75	10,79 ^b ±0,97
15:1n-7	2,90 ^a ±0,20	2,66 ^b ±0,25
16:0	275,85 ^a ±17,13	248,47 ^b ±20,45
16:1n-11	14,51 ±0,88	13,73±1,29
16:1n-9	11,80 ^a ±1,09	10,75 ^b ±0,88
16:1n-7	4,34±0,41	4,10±0,35
17:0	5,48 ^a ±0,34	4,92 ^b ±0,40
17:0	8,59±0,56	8,24±0,86
17:1n-7	3,19 ^a ±0,49	2,56 ^b ±0,26
18:0	113,45±6,01	113,67±10,50
18:1 t	30,97±1,48	30,75±3,25
18:1n-9	215,11±13,26	213,01±19,76
18:1n-7	4,05±0,69	4,34±0,60
18:2n-6t	9,65±0,68	9,84±1,01
18:2n-6	13,59±1,12	13,81±1,01
18:3n-3	3,87±0,32	3,66±0,44
18:2c9t11	10,38±0,69	9,90±0,64
AGS	616,50 ^a ±19,49	563,57 ^a ±24,35
AGMI	310,40±13,49	302,04±20,13
AGPI	37,54±1,52	35,33±1,63
n-6	23,30±1,31	23,12±1,43
n-3	3,84±0,32	3,66±0,44
AGPI-/AGS	0,06±0,00	0,06±0,00
n-6/n-3	6,36±0,45	6,72±0,61

Resultados expressos em percentagem como média±desvio padrão dos resultados das análises em triplicata de três diferentes lotes (n=9). AGS = Ácidos Graxos Saturados; AGMI =Ácidos graxos monoinsaturados; AGPI=ácidos graxos poliinsaturados; n-6=ácidos graxos ômega-6; n-3=ácidos graxos ômega-3. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

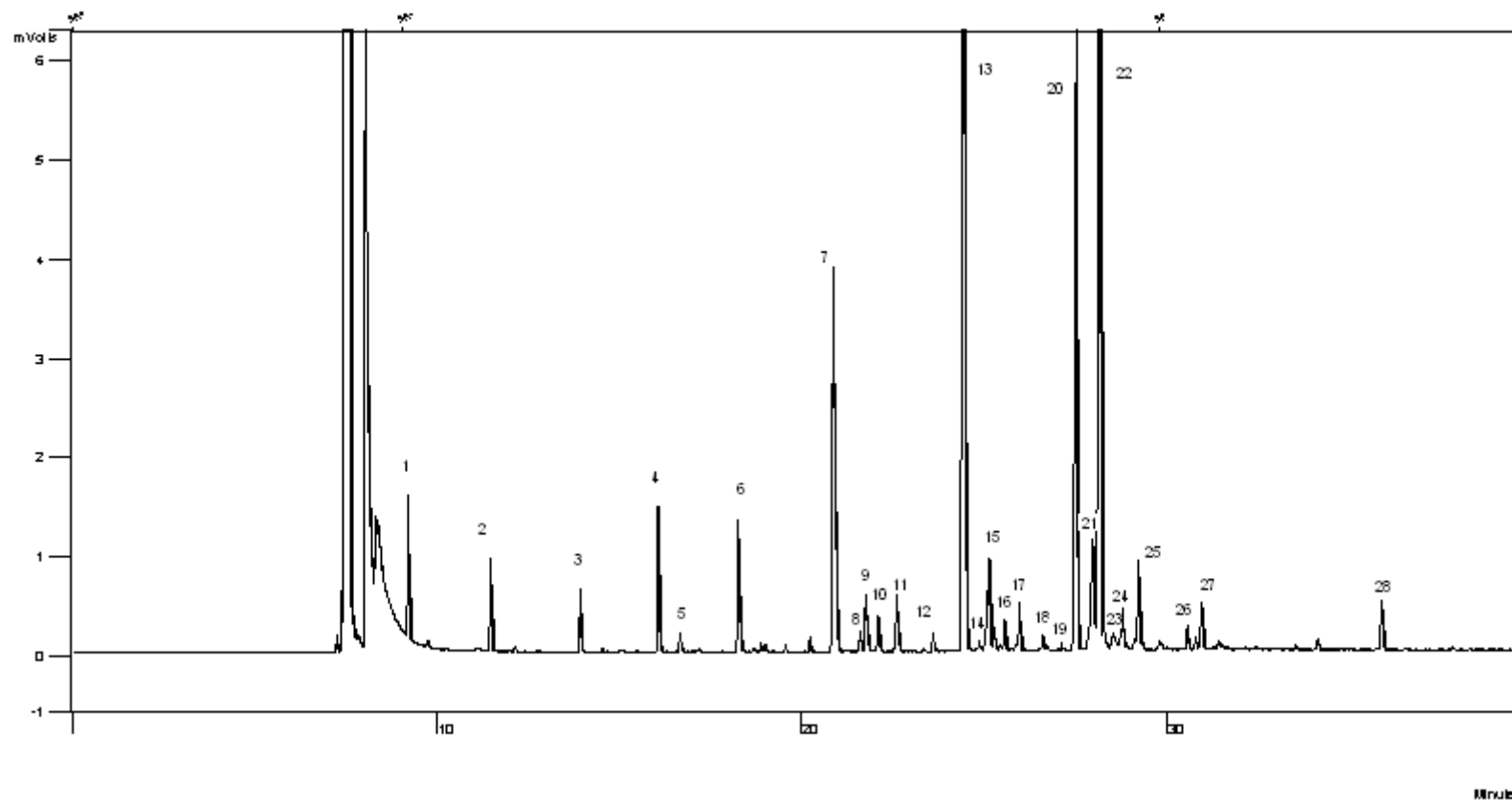
ANEXO 8: Ácidos Graxos em mg/g de lipídios totais para o leite pasteurizado tipo “B” e “C” no período do Inverno

Ácido Graxo	Leite Pasteurizado tipo “B”	Leite Pasteurizado tipo “C”
4:0	29,17 ^a ±4,66	23,65 ^b ±3,32
6:0	18,68 ^a ±2,57	15,25 ^b ±1,95
8:0	10,45 ^a ±1,24	9,03 ^b ±1,08
10:0	22,00 ^a ±2,31	19,91 ^b ±2,47
11:0	3,53 ^a ±0,35	3,20 ^b ±0,37
12:0	25,69±2,22	24,27±2,91
14:0	93,62 ^a ±7,57	87,19 ^b ±5,72
14:1n-11	4,37 ^a ±0,44	3,79 ^b ±0,23
14:1n-9	12,10 ^a ±1,18	11,10 ^b ±0,58
14:1n-7	5,54 ^a ±0,38	5,05 ^b ±0,38
15:0	10,19±0,91	10,41±0,58
15:1n-7	2,82±0,24	2,59±0,28
16:0	271,77±21,01	261,85±17,74
16:1n-11	11,78 ^a ±1,17	9,76 ^b ±0,72
16:1n-9	14,25±0,81	14,63±0,83
16:1n-7	3,99 ^a ±0,31	3,70 ^b ±0,35
i17:0	4,88±0,30	4,67±0,30
17:0	6,48±0,58	6,33±0,96
17:1n-7	2,93±0,29	2,98±0,36
18:0	103,65 ^a ±9,02	91,44 ^b ±8,38
18:1 t	21,66±2,66	21,51±1,67
18:1n-9	223,14 ^a ±17,69	203,27 ^b ±19,06
18:1n-7	2,44±0,34	2,19±0,27
18:2n6t	9,70±1,69	9,77±1,56
18:2n-6	14,96±1,66	15,59±2,30
18:3n-3	3,32±0,43	3,15±0,40
18:2c9t11	7,44±0,82	7,25±0,85
AGS	600,11 ^a ±24,93	553,91 ^b ±21,21
AGMI	304,38 ^a ±18,01	277,08 ^b ±19,19
AGPI	35,15±2,54	30,93±2,94
N-6	24,67±2,37	25,95±2,78
N-3	3,32±0,43	3,17±0,40
AGPI/AGS	0,06±0,00	0,06±0,00
N-6/N-3	7,50±0,85	7,42±0,94

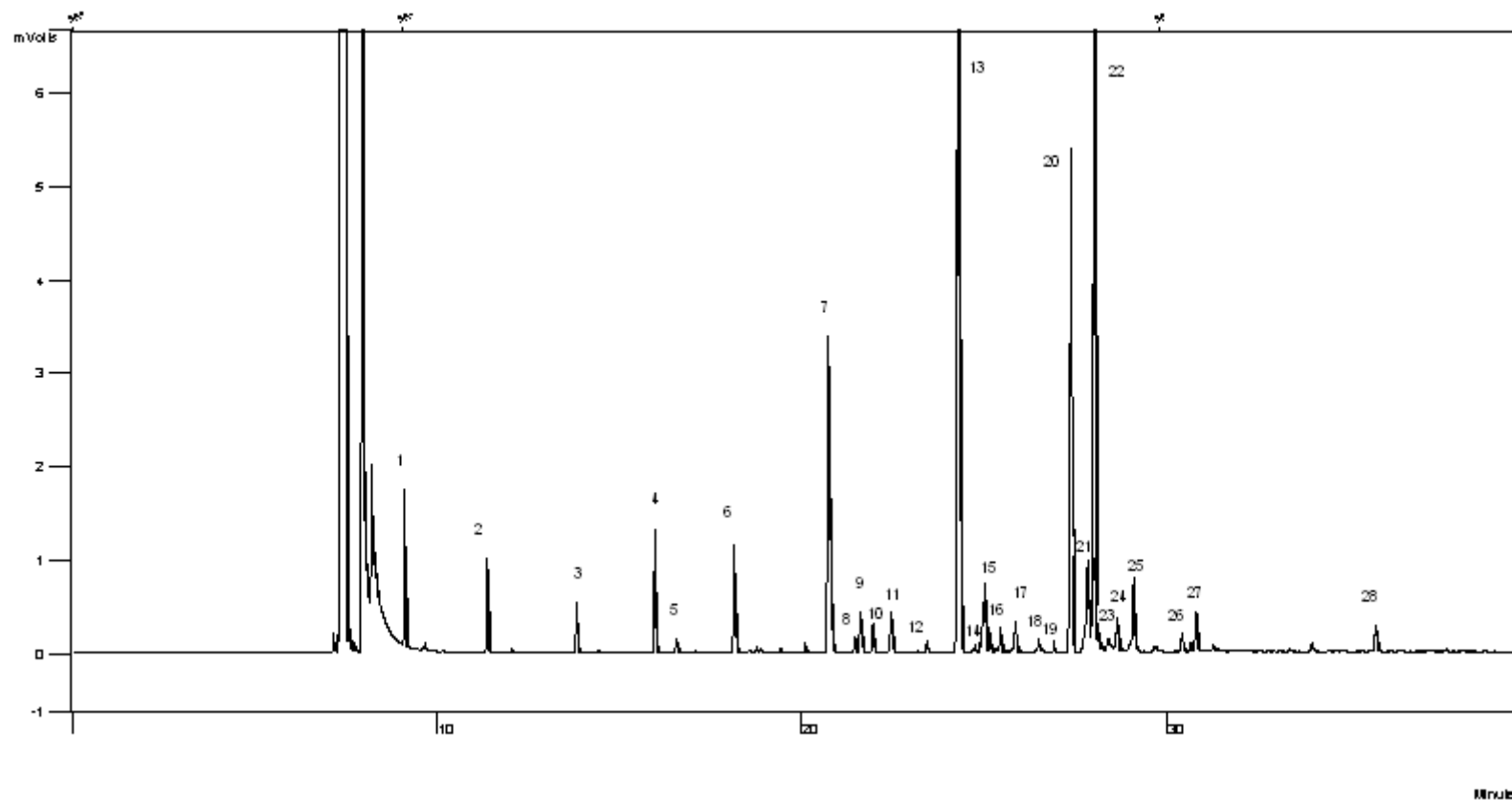
Resultados expressos em percentagem como média±desvio padrão dos resultados das análises em triplicata de três diferentes lotes (n=9). AGS = Ácidos Graxos Saturados; AGMI =Ácidos graxos monoinsaturados; AGPI=ácidos graxos poliinsaturados; n-6=ácidos graxos ômega-6; n-3=ácidos graxos ômega-3. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.



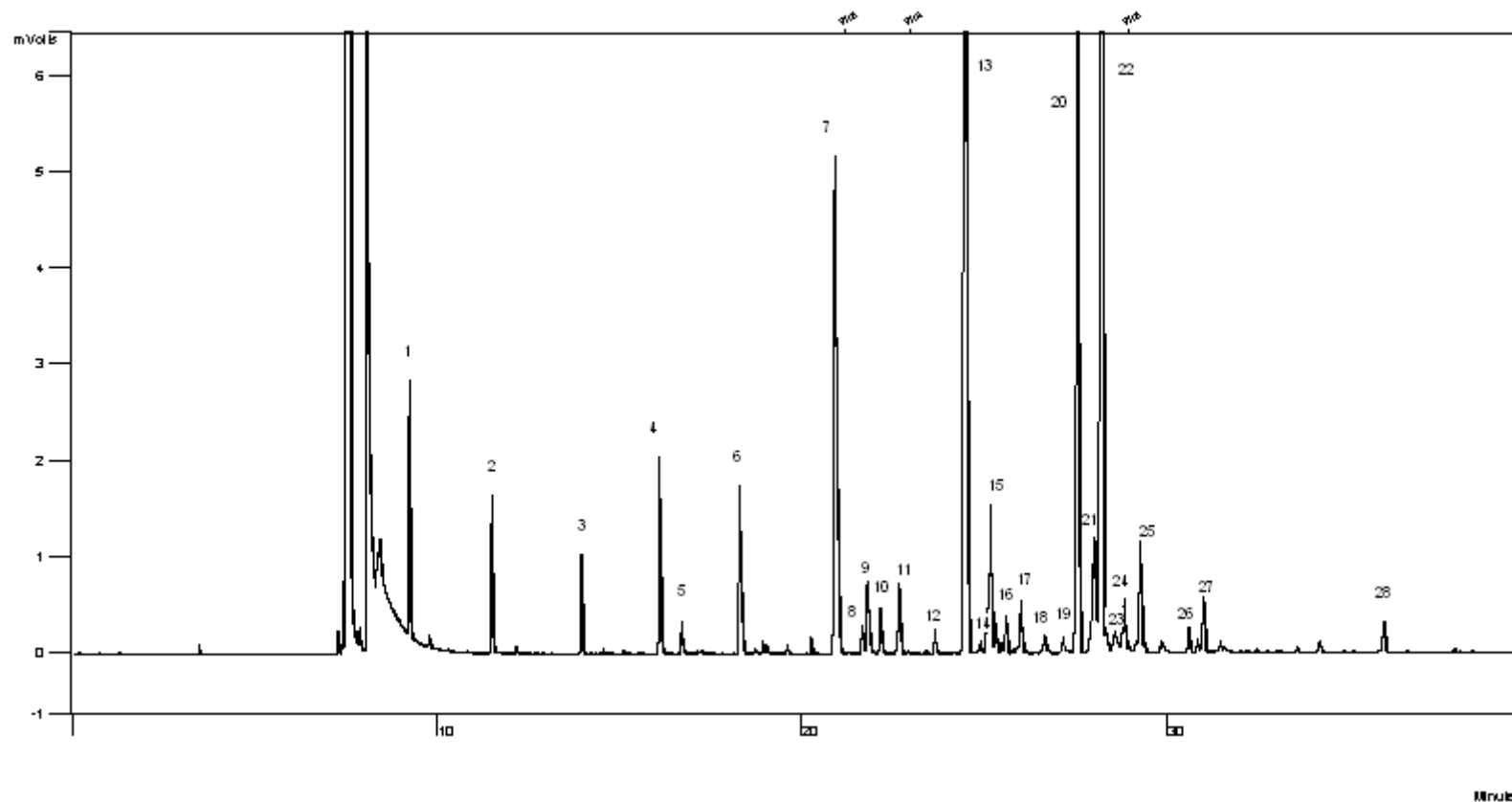
ANEXO 9: Cromatograma representativo para a bebida láctea. (1) 4:0, (2) 6:0, (3) 8:0; (4) 10:0, (5) 11:0, (6) 12:0, (7) 14:0, (8) 14:1n-11, (9) 14:1n-9, (10) 14:1n-7, (11) 15:0, (12) 15:1n-7, (13) 16:0, (14) 16:1n-11, (15) 16:1n-9, (16) 16:1n-7, (17) 17:0, (18) 17:1n-7, (19) 18:0, (20) 18:1t, (21) 18:1n-9, (22) 18:1n-7, (23) 18:2n-6t, (24) 18:2n-6, (25) 18:3n-3, (26) 20:0, (27) 18:2c9t11, (28) 23:0 (PI)



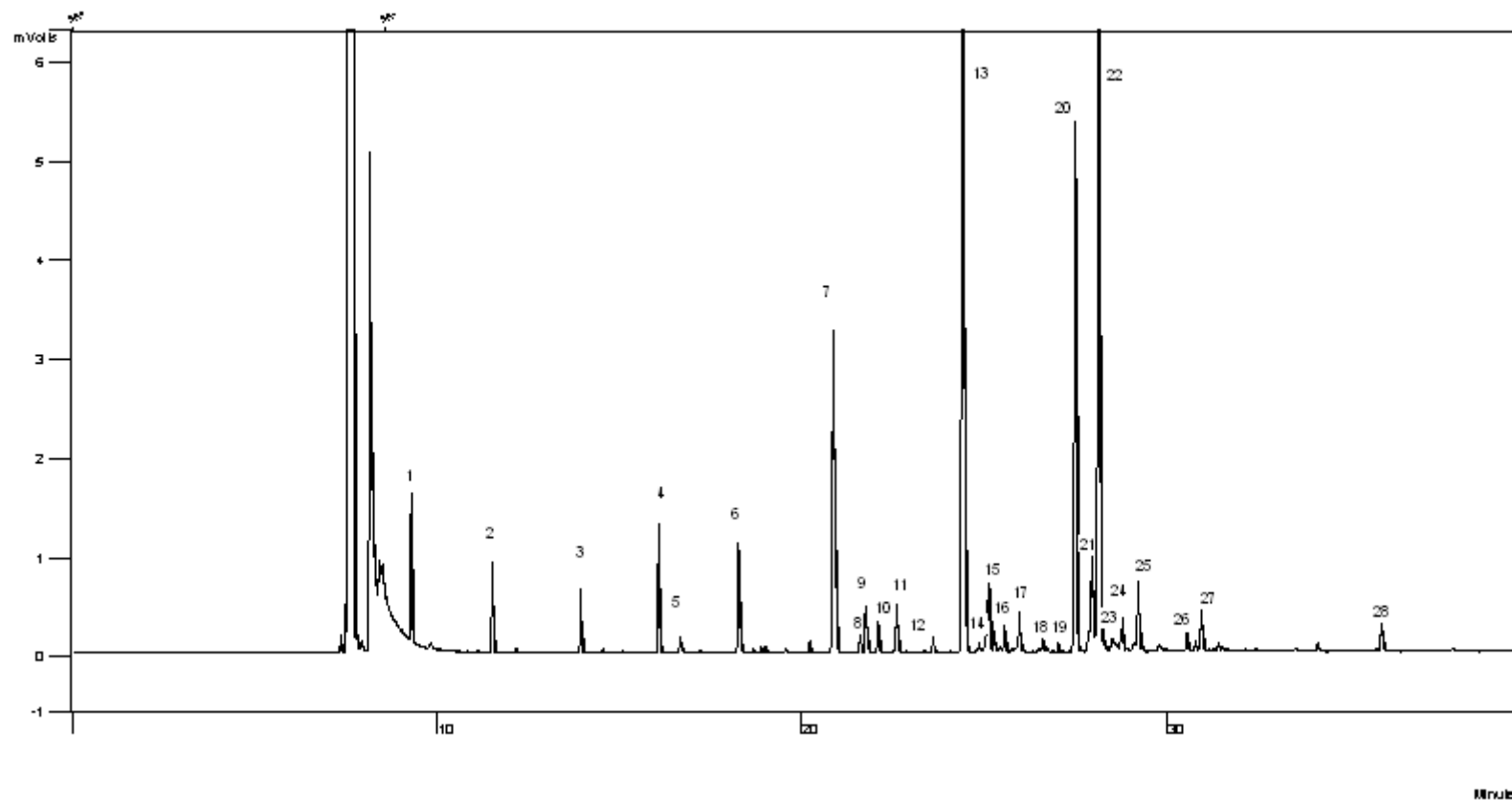
ANEXO 10: Cromatograma representativo para o queijo mussarela. (1) 4:0, (2) 6:0, (3) 8:0; (4) 10:0, (5) 11:0, (6) 12:0, (7) 14:0, (8) 14:1n-11, (9) 14:1n-9, (10) 14:1n-7, (11) 15:0, (12) 15:1n-7, (13) 16:0, (14) 16:1n-11, (15) 16:1n-9, (16) 16:1n-7, (17) 17:0, (18) 17:1n-7, (19) 18:0, (20) 18:1t, (21) 18:1n-9, (22) 18:1n-7, (23) 18:2n-6t, (24) 18:2n-6, (25) 18:3n-3, (26) 20:0, (27) 18:2c9t11, (28) 23:0 (PI)



ANEXO 11: Cromatograma representativo para o queijo provolone. (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) 20:0, (27) 18:2c9t11, (28) 23:0 (PI)



ANEXO 12: Cromatograma representativo para o queijo minas frescal. (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) 20:0, (27) 18:2c9t11, (28) 23:0 (PI)



ANEXO 13: Cromatograma representativo para a ricota. (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) 20:0, (27) 18:2c9t11, (28) 23:0 (PI)

ANEXO 14: Ácidos Graxos em mg/g de lipídios totais para os derivados de leite no período do Verão

Ácido Graxo	Queijo Mussarela	Queijo Provolone	Ricota	Minas Frescal	Bebida Láctea Integral
4:0	31,02 ^a ±2,84	27,19 ^a ±2,83	37,30 ^b ±5,04	39,90 ^b ±4,05	15,08 ^c ±1,62
6:0	10,75 ^{a,c} ±0,92	11,77 ^a ±1,18	15,35 ^b ±1,49	16,30 ^b ±1,39	8,91 ^c ±1,77
8:0	6,33 ^{a,c} ±0,53	6,44 ^a ±0,52	9,18 ^b ±0,98	9,05 ^b ±0,56	4,41 ^c ±0,78
10:0	13,38 ^a ±0,94	13,56 ^a ±1,14	18,69 ^b ±1,43	20,13 ^b ±1,53	10,77 ^c ±1,86
11:0	2,13 ^a ±0,19	2,25 ^a ±0,22	3,02 ^b ±0,28	3,01 ^b ±0,28	1,88 ^c ±0,34
12:0	15,85 ^{a,c} ±0,91	16,55 ^a ±1,52	22,13 ^b ±1,35	23,51 ^b ±1,59	13,57 ^c ±1,93
14:0	61,48 ^a ±3,68	63,54 ^a ±5,88	84,28 ^b ±3,50	89,87 ^b ±5,46	58,33 ^c ±9,30
14:1n-11	2,59 ^{a,c} ±0,27	2,65 ^a ±0,23	3,03 ^{a,b} ±0,34	3,34 ^b ±0,32	2,32 ^c ±0,37
14:1n-9	7,87 ^{a,c} ±0,47	8,05 ^a ±0,73	11,00 ^b ±0,51	11,54 ^b ±1,00	6,74 ^c ±0,98
14:1n-7	4,47 ^a ±0,40	4,42 ^a ±0,38	5,95 ^b ±0,31	6,06 ^b ±0,54	3,63 ^c ±0,61
15:0	7,66 ^a ±0,61	7,86 ^a ±0,60	10,36 ^b ±0,51	10,51 ^b ±0,82	6,24 ^c ±1,06
15:1n-7	2,01 ^a ±0,17	1,93 ^a ±0,16	2,67 ^b ±0,21	2,60 ^b ±0,16	1,30 ^c ±0,18
16:0	180,49 ^a ±11,76	184,00 ^a ±16,56	236,53 ^b ±10,74	255,99 ^b ±13,29	157,24 ^c ±24,36
16:1n-11	7,23 ^{a,c} ±1,16	8,66 ^{a,b} ±0,81	9,99 ^b ±0,57	7,62 ^{a,c} ±0,55	5,47 ^c ±1,13
16:1n-9	8,38 ^{a,b} ±0,85	7,94 ^a ±0,74	10,27 ^b ±0,54	13,15 ^c ±1,32	8,30 ^a ±1,33
16:1n-7	2,74 ^{a,c} ±0,20	2,88 ^a ±0,24	3,91 ^b ±0,11	3,89 ^b ±0,20	2,72 ^c ±0,43
i17:0	3,34 ^{a,c} ±0,20	3,50 ^a ±0,30	4,64 ^b ±0,19	4,66 ^b ±0,29	3,04 ^c ±0,48
17:0	5,59 ^{a,c} ±0,16	5,77 ^a ±0,48	7,24 ^b ±0,44	7,01 ^b ±0,62	4,76 ^c ±0,74
17:1n-7	1,89 ^{a,c} ±0,17	1,79 ^{a,c} ±0,13	2,46 ^b ±0,24	2,02 ^{a,b} ±0,29	1,59 ^c ±0,26
18:0	79,83 ^a ±5,04	82,81 ^a ±6,81	102,69 ^b ±8,28	103,51 ^b ±6,49	72,11 ^c ±10,00
18:1t	20,60 ^{a,c} ±1,28	22,50 ^a ±2,10	27,79 ^b ±1,41	26,56 ^b ±2,07	18,66 ^c ±2,68
18:1n-9	153,64 ^a ±15,62	151,02 ^a ±12,56	192,40 ^b ±10,54	197,36 ^b ±11,05	125,22 ^c ±18,50
18:1n-7	2,99 ^{a,d} ±0,30	3,51 ^{a,b} ±0,31	4,00 ^b ±0,42	1,71 ^c ±0,15	2,75 ^d ±0,40
18:2n-6t	6,41 ^{a,b} ±0,43	6,66 ^{a,b} ±0,52	7,43 ^a ±0,59	7,27 ^a ±0,45	6,29 ^b ±0,90
18:2n-6	11,63 ^a ±1,09	11,29 ^a ±1,11	14,35 ^b ±0,63	15,28 ^b ±1,16	10,47 ^c ±1,25
18:3n-3	2,65 ^a ±0,19	2,66 ^a ±0,22	3,48 ^b ±0,28	3,30 ^b ±0,35	2,15 ^c ±0,36
20:0	1,29 ^a ±0,10	6,41 ^b ±1,12	1,66 ^a ±0,21	1,45 ^{a,b} ±0,08	
18:2c9t11	6,68 ^a ±0,39	7,03 ^a ±0,70	8,76 ^b ±0,32	8,56 ^b ±0,97	5,64 ^a ±0,94
AGS	365,54 ^{a,c} ±13,73	415,75 ^a ±19,24	519,19 ^b ±15,14	562,81 ^b ±16,53	359,14 ^c ±28,20
AGMI	186,90 ^a ±15,76	219,83 ^{a,c} ±12,82	256,23 ^{b,c} ±10,70	257,39 ^c ±11,40	180,27 ^a ±18,82
AGPI	24,62 ^a ±1,25	24,17 ^a ±1,43	33,57 ^b ±0,96	31,56 ^b ±1,62	25,10 ^a ±1,84
n-6	18,04 ^{a,b} ±1,17	15,73 ^a ±1,23	21,80 ^{b,c} ±0,86	22,56 ^c ±1,24	17,17 ^a ±1,54

Continuação do anexo 14

n-3	2,65 ^a ±0,19	2,73 ^a ±0,22	3,41 ^b ±0,28	3,30 ^b ±0,35	2,19 ^c ±0,36
AGPI/AGS	0,09±0,004	0,06±0,003	0,07±0,002	0,06±0,002	0,07±0,01
n-6/n-3	6,72 ^a ±0,45	5,74 ^a ±0,46	6,39 ^b ±0,39	6,89 ^b ±0,56	8,07 ^c ±1,03

Resultados expressos em percentagem como média±desvio padrão dos resultados das análises em triplicata de três diferentes lotes (n=9). AGS = Ácidos Graxos Saturados; AGMI =Ácidos graxos monoinsaturados; AGPI=ácidos graxos poliinsaturados; n-6=ácidos graxos ômega-6; n-3=ácidos graxos ômega-3. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significativamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

ANEXO 15: Ácidos Graxos em mg/g de lipídios totais para os derivados de leite no período do Inverno

Ácido Graxo	Queijo Mussarela	Queijo Provolone	Ricota	Minas Frescal	Bebida Láctea Integral
4:0	31,12 ^{a,b} ±4,45	35,69 ^a ±4,86	35,07 ^a ±3,71	30,03 ^c ±3,41	18,78 ^c ±2,10
6:0	17,64 ^a ±2,30	19,05 ^{a,b} ±2,16	18,94 ^{a,b} ±1,60	20,21 ^c ±1,91	14,46 ^c ±1,33
8:0	10,04 ^{a,b,c} ±0,77	10,56 ^a ±1,05	10,72 ^a ±1,07	11,74 ^c ±0,95	8,92 ^{±c} 0,82
10:0	20,48 ^a ±1,74	22,15 ^{a,b} ±1,97	23,43 ^{b,c} ±2,31	25,23 ^a ±2,24	19,80 ^a ±1,66
11:0	3,47 ^{a,c} ±0,27	3,79 ^{a,b} ±0,32	3,65 ^a ±0,32	4,07 ^c ±0,30	3,16 ^c ±0,27
12:0	24,10 ^a ±1,94	26,09 ^a ±2,20	27,04 ^{a,b} ±2,73	29,46 ^a ±2,75	24,41 ^a ±1,97
14:0	90,10 ^{a,c} ±5,99	97,69 ^b ±6,06	95,19 ^{a,b} ±6,71	100,84 ^c ±5,39	83,50 ^c ±5,09
14:1n-11	4,14 ^a ±0,36	4,44 ^{a,b} ±0,28	4,24 ^a ±0,33	4,70 ^a ±0,22	4,11 ^a ±0,30
14:1n-9	12,58 ^a ±1,18	13,88 ^b ±0,80	12,13 ^a ±0,94	12,49 ^c ±0,68	10,04 ^c ±0,72
14:1n-7	5,54 ^a ±0,57	6,18 ^b ±0,36	5,37 ^a ±0,38	5,47 ^a ±0,25	4,67 ^c ±0,31
15:0	10,76 ^{a,b} ±1,25	11,44 ^a ±0,92	10,33 ^{a,b} ±0,98	10,28 ^b ±0,71	8,81 ^c ±0,71
15:1n-7	2,99 ^{a,b} ±0,36	3,11 ^a ±0,22	2,73 ^b ±0,30	2,68 ^b ±0,29	2,22 ^c ±0,15
16:0	263,86 ^{a,b} ±20,53	280,58 ^a ±15,46	277,23 ^a ±18,33	283,66 ^b ±9,36	238,27 ^c ±9,13
16:1n-11	10,76 ^a ±0,73	11,49 ^{a,b} ±1,00	10,86 ^a ±0,72	11,93 ^b ±0,65	10,89 ^a ±0,89
16:1n-9	15,17 ^a ±2,19	15,72 ^a ±0,90	14,39 ^a ±1,62	14,59 ^a ±1,26	11,41 ^b ±0,58
16:1n-7	4,05 ^{a,b} ±0,42	4,23 ^a ±0,32	3,84 ^b ±0,31	3,89 ^{a,b} ±0,26	3,29 ^c ±0,23
17:0	4,90 ^a ±0,49	5,22 ^a ±0,36	4,80 ^a ±0,35	4,87 ^a ±0,27	4,12 ^b ±0,25
17:1n-7	3,77 ^a ±0,51	3,65 ^a ±0,31	3,11 ^{a,b} ±0,51	2,83 ^b ±0,83	1,88 ^c ±0,33
18:0	91,71 ^{a,b} ±8,84	94,76 ^a ±4,89	96,99 ^a ±6,74	97,95 ^a ±4,37	86,84 ^b ±4,18
18:1t	21,15±2,05	21,87±1,33	20,34±2,62	21,20±2,19	19,77±1,07
18:1n-9	209,20 ^a ±24,20	211,11 ^a ±10,83	205,58 ^a ±21,47	208,99 ^a ±15,43	180,15 ^b ±8,10
18:1n-7	2,07±0,35	2,11±0,23	2,11±0,20	2,10±0,22	2,01±0,19
18:2n-6t	10,55 ^{a,b} ±0,87	9,57 ^{a,c} ±1,75	10,04 ^{a,b} ±1,35	11,71 ^b ±1,66	8,05 ^c ±0,86
18:2n-6	12,05 ^a ±1,73	13,14 ^a ±1,67	16,02 ^b ±1,86	17,33 ^b ±2,46	16,27 ^b ±1,85
18:3n-3	3,19±0,32	3,19±0,30	2,91±0,43	3,36±0,60	3,02±0,39
18:2c9t11	7,58 ^{a,b} ±0,70	7,87 ^a ±0,74	6,79 ^{b,c} ±0,93	7,37 ^{a,b} ±0,78	6,42 ^c ±0,40
AGS	566,12 ^{a,b} ±23,90	608,43 ^{a,b} ±18,42	577,77 ^{a,b} ±21,41	624,16 ^b ±12,87	514,65 ^c ±11,87
AGMI	290,95 ^a ±24,45	297,79 ^a ±11,05	283,46 ^a ±21,74	290,46 ^a ±15,69	250,15 ^b ±8,29
AGPI	29,62±2,09	34,61±2,56	33,57±2,52	36,16±3,13	31,97±2,12

Continuação do anexo 15

n-6	18,84 ^a ±1,94	23,06 ^{a,b} ±2,42	24,95 ^{a,b} ±2,30	26,65 ^b ±2,97	22,51 ^{a,b} ±2,04
n-3	3,22±0,32	3,19±0,30	2,91±0,43	3,36±0,60	3,05±0,39
AGPI/AGS	0,05±0,001	0,06±0,002	0,06±0,002	0,06±0,003	0,06±0,002
n-6/n-3	6,10 ^a ±0,62	7,28 ^{a,b} ±0,72	9,31 ^b ±1,12	7,86 ^{a,b} ±1,14	7,51 ^{a,b} ±0,82

[†]Resultados expressos em percentagem como média±desvio padrão dos resultados das análises em triplicata de três diferentes lotes (n=9). AGS = Ácidos Graxos Saturados; AGMI =Ácidos graxos monoinsaturados; AGPI=ácidos graxos poliinsaturados. Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha são significamente diferentes entre si pelo teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade para razões e CLA (Ácido Linoléico Conjugado).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)