

Artigo

Ácidos Linoleicos Conjugados (ALC) – Os Benefícios que Exercem sobre a Saúde Humana e as Principais Metodologias Analíticas Aplicadas para a sua Determinação em Leites

Gouvêa, M. M.; Franco, C. F. J.; Marques, F. F. C.;* Pereira Netto, A. D.

Rev. Virtual Quim., 2012, 4 (6), 653-669. Data de publicação na Web: 29 de novembro de 2012

<http://www.uff.br/rvq>

Conjugated Linoleic Acids (CLA) - The Benefits they Have on Human Health and the Main Analytical Methodologies Applied to its Determination in Milk

Abstract: The term conjugated linoleic acid (CLA) refers to a group of fatty acids with 18 carbon atoms and two conjugated double bonds that is naturally present in animal products such as milk and meat. In the last years, this nutrient has received great attention from researchers because of the biological activities assigned to it, especially the properties of anticancer, antidiabetic and the capacity to reduce body fat. This review aims to evaluate the real influences that CLA exerts on human health; to describe some methods used for its determination in milk, addressing parameters necessary for analysis such as extraction of lipids, transesterification reactions and identification by gas chromatography; and discuss some results concerning the CLA content in milk samples.

Keywords: Milk; CLA; cancer; transesterification; gas chromatography.

Resumo

O termo ácido linoleico conjugado (ALC) se refere a um grupo de ácidos graxos com 18 átomos de carbono e duas ligações duplas conjugadas que está naturalmente presente em produtos de origem animal, como o leite e a carne. Nos últimos anos, os ALC receberam grande atenção dos pesquisadores devido às atividades biológicas que lhe são atribuídas, especialmente as propriedades anticarcinogênica, antidiabética e por reduzir a gordura corporal.

Esta revisão teve como objetivo avaliar de maneira crítica as reais influências que os ALC exercem sobre a saúde humana; descrever algumas metodologias utilizadas para sua determinação em leites, abordando parâmetros indispensáveis à análise como extração lipídica, reações de transesterificação e identificação por cromatografia em fase gás; e avaliar alguns resultados obtidos a respeito do teor de ALC em amostras de leite.

Palavras-chave: Leite; ALC; câncer; transesterificação; cromatografia a gás.

* Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Campus do Valonguinho, CEP: 24020-150, Niterói-RJ, Brasil.

✉ flaviamarques@vm.uff.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20120050](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20120050)

Ácidos Linoleicos Conjugados (ALC) – Os Benefícios que Exercem sobre a Saúde Humana e as Principais Metodologias Analíticas Aplicadas para a sua Determinação em Leites

Marcos M. Gouvêa, Caroline F. J. Franco, Flávia F. de C. Marques,*
Annibal D. Pereira Netto

Universidade Federal Fluminense, Instituto de Química, Campus do Valonguinho, CEP: 24020-150, Niterói-RJ, Brasil.

* flaviamarques@vm.uff.br

Recebido em 10 de maio de 2012. Aceito para publicação em 12 de novembro de 2012

1. Introdução
2. Biossíntese dos ALC
3. Atividade biológica dos ALC
 - 3.1. Anticarcinogênese
 - 3.2. Redução da gordura corporal
 - 3.3. Outras propriedades
4. Determinação dos ALC em leite
 - 4.1. Extração lipídica
 - 4.2. Reação de transesterificação
 - 4.3. Identificação cromatográfica
 - 4.4. Teores de 9-*cis*, 11-*trans*- ALC reportados em diferentes países
5. Conclusões

1. Introdução

O leite é considerado um alimento muito importante para a alimentação de crianças e adultos devido à presença de diversos nutrientes essenciais para a saúde, como proteínas, vitaminas, lipídios, e também minerais, como o cálcio.¹

Com relação à fração lipídica, o leite industrializado pode ser classificado como

integral, quando contém aproximadamente 3,2 % de gordura; como desnatado com 0,3 %; e semidesnatado com valores entre 1,5 e 1,8 %, dependendo da marca e do produtor.²

A gordura do leite é essencialmente composta por triglicerídeos (triacilgliceróis - TAG), ou seja, ésteres formados por 3 ácidos graxos e glicerol. Estes ácidos graxos podem conter de 4 a 22 átomos de carbono e as cadeias formadas podem ser saturadas ou conter até 6 insaturações, sendo que, de modo geral, a configuração *cis* predomina

nestas ligações duplas.¹

Os ácidos graxos que apresentam três ou mais ligações duplas são chamados de poli-insaturados (PUFAs – *Polyunsaturated Fatty Acids*) e, do ponto de vista nutracêutico, são considerados “gorduras boas”, devendo estar inclusos na dieta alimentar para manter os níveis saudáveis de lipídios no sangue e a adequada coagulação sanguínea; além disso, também auxiliam a regular a pressão arterial, a controlar inflamações nos casos de infecções ou lesões, e o sistema de defesa imunológico.¹

No caso do leite bovino, há predominância de ácidos saturados, representando em média cerca de 80% dos ácidos graxos.

Em relação aos ácidos graxos insaturados, destacam-se os ácidos linoleicos conjugados (ALC), por apresentarem várias características benéficas à saúde. Estes ácidos graxos correspondem a um grupo de ácidos octadecadienoicos (C18:2), que apresentam ligações duplas conjugadas nas posições 9 e 11 ou 10 e 12 e geometria *cis* (c) e *trans* (t) variável (c,t; t,c; c,c; e t,t).³ Entre os possíveis isômeros, o 9c, 11t ALC e o 10t, 12c ALC (Figura 1) são os predominantes em leites, correspondendo a cerca de 75% a 90% do total de ALC presente neste alimento.⁴

A alta concentração do ácido linoleico (AL) e seus isômeros conjugados (ALC) conferem ao leite qualidades como atividades antiaterosclerótica,⁵ antibacteriana,⁶ antidiabética,⁷ de redução da gordura corporal e da incidência de doenças coronarianas, proteção contra o câncer,^{8,9} inibição de radicais livres e imunomodulação.^{10,11}

A quantidade de ALC produzida pelas glândulas mamárias dos animais produtores de leite depende de diversos fatores, como alimentação do gado (componentes do pasto), altitude e raça do animal. A alimentação é a mais importante para mudanças significativas na concentração de ALC, devido à modificação da microbiota ruminal (estomacal) e, por conseguinte, alterações nos parâmetros fermentativos. Assim, dependendo do rebanho estudado, é possível obter diferentes concentrações de ALC.¹² Vale ressaltar que além do leite, matriz de interesse deste trabalho, os óleos vegetais, os frutos do mar, os diferentes tipos de carne e os laticínios, também são boas fontes de ALC.¹³

Este trabalho teve como objetivo avaliar os reais efeitos positivos proporcionados pelo consumo de ALC e discutir as principais metodologias aplicadas à sua determinação.

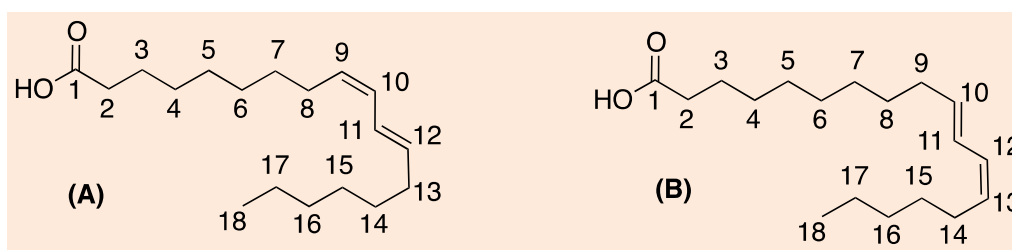


Figura 1. Estrutura molecular do 9-*cis*, 11-*trans* ALC (A) e do 10-*trans*, 12-*cis* ALC (B)

2. Biossíntese dos ALC

Os ALC presentes na carne e no leite de animais ruminantes possuem duas origens possíveis: (i) a partir da bio-hidrogenação parcial do ácido linoleico (via enzima *cis-trans* isomerase) no rúmen do animal ou (ii) a

partir da ação da enzima Δ^9 -desaturase, largamente presente em tecidos mamários e adiposos de animais ruminantes, sobre o ácido 11-*trans* octadecenoico (Figura 2).¹⁴⁻¹⁸

A primeira etapa da bio-hidrogenação consiste na isomerização do ácido 18:2 9-*cis*, 12-*cis* linoleico, presente na dieta do animal, por uma *cis-trans* isomerase, ao ácido 18:2 9-

cis, 11-*trans* linoleico (ou ácido rumênico). Na etapa seguinte, este é rapidamente reduzido (via redutase) para o ácido 18:1, 11-*trans* vacênico. A redução do ácido vacênico para ácido esteárico é a etapa mais lenta do processo de bio-hidrogenação; como consequência, este penúltimo intermediário acumula-se no rúmen e está, portanto, mais disponível para ser absorvido pela mucosa do animal e para ser usado como intermediário na síntese do ALC no tecido adiposo e, principalmente, nas glândulas mamárias. O ácido 18:2 9-*cis*, 11-*trans* linoleico formado através da bio-hidrogenação também é absorvido pelas glândulas mamárias, mas em menor proporção (0-10% em relação ao ácido 18:2, 9-*cis*, 12-*cis* linoleico inicialmente bio-hidrogenado).¹⁴⁻¹⁸

Semelhante à bio-hidrogenação do ácido linoleico, o ácido 18:3 9-*cis*, 12-*cis*, 15-*cis* linolênico ingerido, também sofre processo semelhante para formar o ácido 18:1, 11-*trans* vacênico (Figura 2).¹⁵

O mecanismo endógeno provavelmente representa a principal fonte de produção do 9-*cis*, 11-*trans* ALC pelos ruminantes. Os

outros isômeros do ácido linoleico, entre eles o 10-*trans*, 12-*cis* ALC, possivelmente são produzidos a partir da combinação da migração das ligações duplas e da ação de enzimas *cis-trans* isomerases no rúmen.¹⁶ Isso explica, em parte, o fato do 9-*cis*, 11-*trans* ALC ser o mais abundante no leite, representando mais de 80% da quantidade total.

O teor de ALC no leite pode ser aumentado com a administração de dietas enriquecidas com ácido linoleico, de forma a aumentar a produção do isômero conjugado desse ácido graxo pelo animal. No entanto, algumas dietas não enriquecidas com ácido linoleico, mas sim com a administração direta de outros ácidos graxos poli-insaturados, também são capazes de induzir o aumento da produção de ALC pelos ruminantes.¹⁶ Neste caso, a bio-hidrogenação dos ácidos poli-insaturados leva à produção de ácido 11-*trans* octadecenoico como intermediário, que pode ser convertido a ácidos linoleicos conjugados também pela ação da enzima Δ^9 -desaturase.

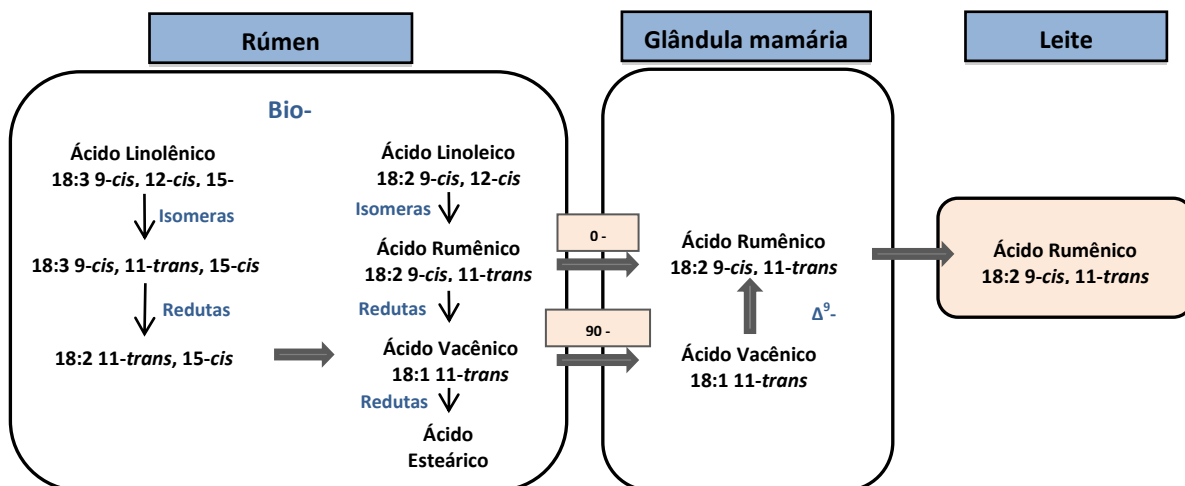


Figura 2. Esquema representativo de reações que ocorrem no rúmen e nas glândulas mamárias para a síntese do 9-*cis*, 11-*trans* ALC (adaptado de Leite e colaboradores)¹⁶

3. Atividade biológica dos ALC

3.1. Anticarcinogênese

Testes *in vitro* e *in vivo* mostraram um largo espectro funcional dos ácidos linoleicos conjugados. Em 1992, o trabalho desenvolvido por Shultz e colaboradores,¹⁹ sugeriu que os ALC eram capazes de reduzir o crescimento e a proliferação celular *in vitro* de células MCF-7, responsáveis pelo desenvolvimento de um tipo de câncer mamário. Testes realizados por Ip e colaboradores²⁰ em ratos revelaram que mesmo dietas com suplementação muito pequena de ALC (0,1%) eram suficientes para uma redução estatisticamente significativa de tumores de mama. Em 1994, um grupo também liderado por Ip,²¹ concluiu que os ALC preveniram o desenvolvimento de tumores de mama em ratos. Quatro anos mais tarde, Cesano e colaboradores mostraram que esses ácidos graxos também foram efetivos contra tumores prostáticos e evitaram a sua metástase em ratos.²²

Em oposição aos efeitos positivos observados nos testes *in vitro*¹⁹ e pela suplementação alimentar com ALC contra o câncer,²⁰ os estudos realizados com ácido linoleico por estes mesmos pesquisadores,²² sob as mesmas condições, mostraram que esta forma do ácido graxo apresenta função oposta ao da molécula na forma conjugada, ou seja, ocorre um efeito estimulatório para a proliferação celular, agravando o quadro clínico da doença. Isso reforça a ideia de que dietas ricas em gordura estão associadas a um prognóstico negativo na cura do câncer, o que torna o ALC um ácido graxo muito especial do ponto de vista da saúde humana.²²

Os ALC apresentam alguns mecanismos de ação que lhes permitem apresentar as já citadas atividades anticarcinogênicas. Eles são capazes de modular a proliferação celular através do bloqueio da síntese de DNA e da ação sobre proteínas do ciclo celular que regulam esse processo, como as proteínas

p16 e a p27. Alguns estudos mostraram que eles também reduzem a expressão da proteína Bcl-2, que inibe a apoptose, diminuindo a possibilidade da célula se dividir descontroladamente sem responder a um mecanismo de morte celular.²³

Os resultados obtidos com animais de laboratório e com testes *in vitro* são muito promissores, porém, quando aplicados a seres humanos, não foram observados com tanto sucesso. Um estudo realizado na Suécia durante três anos, por Larsson e colaboradores,²⁴ com mais de 61 mil mulheres saudáveis, avaliou o efeito do consumo de ALC presente em suas dietas, na prevenção contra o câncer de mama. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa entre o grupo que apresentava dieta rica em ALC e o grupo de controle. Os autores citam, ainda, que resultados semelhantes foram obtidos por outros pesquisadores na França. Apenas um grupo holandês obteve resultados ligeiramente consideráveis. Porém, neste caso foi utilizada uma quantidade média de ALC superior em relação aos outros dois, o que sugeriu aos autores suecos que a quantidade mínima necessária de ALC para que resultados significativos fossem obtidos, não foi alcançada em seus estudos.²⁴

Levando-se em consideração o valor mínimo de suplementação necessário para a obtenção de resultados significativos em ratos (0,1% ou 15 mg por dia), um adulto de 70 Kg deveria consumir 3000 mg de ALC por dia. No estudo realizado na Holanda, o consumo diário de ALC correspondeu a 200 mg, enquanto, no estudo sueco, esse valor foi de apenas 120 mg diários.²⁴ Esses parâmetros nos levam a concluir que ajustes quantitativos das substâncias estudadas devem ser feitos na metodologia aplicada para que resultados com maior relevância sobre a propriedade anticarcinogênica sejam obtidos.

3.2. Redução de gordura corporal

Uma propriedade muito interessante dos ALC chamou a atenção de diversos pesquisadores. A administração destes ácidos graxos através de dietas enriquecidas a roedores provocou uma considerável redução da sua gordura corporal, o que despertou o interesse econômico de introduzi-los no mercado como um agente emagrecedor em humanos. Atualmente, há várias marcas comerciais que vendem pílulas de ALC com essa finalidade, embora não sejam aprovadas pela ANVISA no Brasil (Resolução RE Nº 833, de 28 de março de 2007).²⁵ Assim como nos estudos feitos para a propriedade anticarcinogênica, apesar de excelentes resultados obtidos com animais de laboratório, os benefícios gerados pelo seu consumo por humanos ainda são muito controversos.

Em 2010, Racine e colaboradores²⁶ investigaram a influência da suplementação com ALC às dietas de 62 crianças obesas (incluindo o grupo de controle) entre 6 e 10 anos de idade. Este estudo mostrou que houve um efeito positivo para a modificação corporal dessa população. Entretanto, no ano seguinte, uma extensa revisão realizada por Onakpoya e colaboradores²⁷ mostrou que dietas enriquecidas com ALC não foram capazes de reduzir a gordura corporal de adultos com sobrepeso ou obesos de maneira clinicamente significativa. Esta publicação reforçou o trabalho realizado por Whigham e colaboradores,²⁸ que sugeriu que os ALC apenas proporcionam um efeito ligeiramente positivo sobre a composição lipídica corporal de humanos.

Navarro e colaboradores²⁹ estudaram os possíveis motivos que levariam às diferenças observadas entre os estudos realizados em animais e em humanos. Mais uma vez, houve o questionamento sobre as doses utilizadas. Para os roedores, a dose variou entre 210 e 250 mg por Kg de massa corporal, enquanto a dose administrada para humanos não ultrapassou a faixa de 20 a 97 mg por Kg de

massa corporal. Um indivíduo de 70 Kg deveria consumir, sob estas condições, uma quantidade total de aproximadamente 15 a 18 g de ALC por dia, um valor claramente muito alto.

Os mecanismos pelos quais os ALC promovem seus efeitos também foram abordados por este mesmo grupo de pesquisadores.²⁹ Os autores reportaram que os ALC são agentes inibitórios da lipogênese em tecido adiposo branco e há evidências de que células adiposas humanas deste tecido, ao contrário das células hepáticas, apresentam uma capacidade muito reduzida de sintetizar ácidos graxos, quando comparadas com as mesmas células de roedores. Sendo assim, a gordura proveniente da alimentação é a principal fonte de ácidos graxos para a síntese de triacilgliceróis no tecido adiposo branco. Portanto, este mecanismo proposto para a ação que os ALC exercem sobre a inibição da deposição de gordura seria pouco relevante no metabolismo humano de estocagem lipídica.²⁹

Outro mecanismo proposto neste mesmo trabalho,²⁹ e que é mais aceito para a ação dos ALC, diz respeito ao aumento da oxidação de gorduras na mitocôndria e no peroxissomo das células hepáticas. Os roedores são muito sensíveis aos fatores que levam à proliferação de peroxissomos (induzidos indiretamente pelos ALC), enquanto primatas são relativamente insensíveis. Caso esta seja a principal via de ação dos ALC para reduzir a gordura corporal, o uso destes ácidos graxos para esta finalidade pode ser extremamente limitado.

Assim, nos estudos feitos para avaliar a capacidade dos ALC de redução de gordura corporal, apesar de excelentes resultados obtidos com animais de laboratório, os benefícios gerados pelo seu consumo por humanos ainda é muito controverso.

3.3. Outras propriedades

Além das já citadas características anticarcinogênicas e redutora de gordura corporal, outras propriedades são atribuídas ao consumo de ácidos linoleicos conjugados, como por exemplo, atividade antiaterosclerótica, antidiabética e anti-inflamatória. Entretanto, Raff e colaboradores não observaram alterações dos níveis de LDL (lipoproteínas de baixa densidade ou *Low Density Lipoproteins*), HDL (lipoproteínas de alta densidade ou *High Density Lipoproteins*), triacilgliceróis e dos fatores inflamatórios no plasma, assim como das concentrações de glicose e de insulina de homens jovens dinamarqueses que receberam dietas enriquecidas com ALC.³⁰

Estudos semelhantes utilizando o 9-*cis*, 11-*trans* ALC, realizados por Moloney e colaboradores³¹, mostraram que a atividade antidiabética mediada pela redução de fatores inflamatórios em tecido adiposo branco pode ser efetiva em ratos e camundongos. Por outro lado, o trabalho desenvolvido por Poirier e colaboradores³² mostrou que a administração apenas do 10-*trans*, 12-*cis* ALC causa um efeito oposto, ocorrendo um aumento da atividade inflamatória local, levando a um quadro de resistência insulínica nos animais estudados.

Como no estudo feito em jovens dinamarqueses³⁰ foi utilizada uma mistura de ácidos linoleicos conjugados composta por quantidades quase equivalentes do 9-*cis*, 11-*trans* ALC e do 10-*trans*, 12-*cis* ALC, os resultados negativos obtidos podem ter sido mascarados pela contraposição dos efeitos entre os dois ácidos graxos.

Por fim, alguns estudos também reportaram a possibilidade dos ALC, especialmente o 9-*cis*, 11-*trans*, acentuarem a resposta imunológica em ratos.³³⁻³⁵ Porém, pesquisas com essa perspectiva são escassas em seres humanos.

4. Determinação dos ALC em leite

A determinação de ácidos graxos em alimentos requer o pré-tratamento da amostra para que os analitos sejam extraídos e convertidos a uma forma adequada para identificação e quantificação, de acordo com a técnica instrumental adotada. As etapas envolvidas na análise estão descritas no fluxograma a seguir (Figura 3), e foram explicadas mais detalhadamente nos tópicos seguintes, enfatizando-se as condições necessárias para a determinação dos ALC em leites.

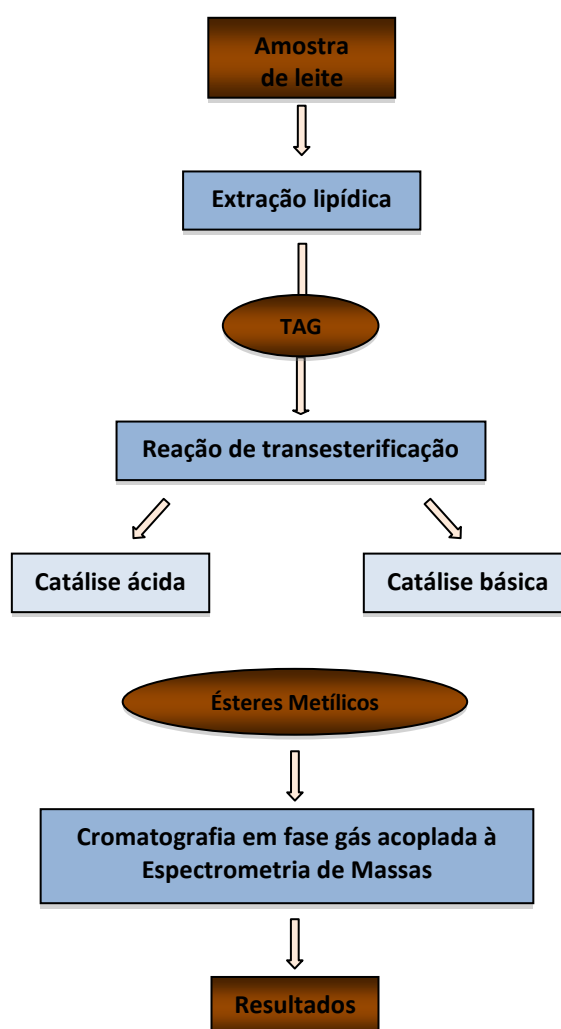


Figura 3. Fluxograma representativo das etapas envolvidas na determinação de ácidos graxos em leites

4.1. Extração lipídica

A primeira etapa que deve ser realizada para se determinar ácidos linoleicos conjugados, bem como qualquer outro ácido graxo em leites, é a extração da porção lipídica do alimento. Porém, é importante que este procedimento seja adequado, pois alguns deles podem levar à isomerização das ligações duplas.³⁶

Muitos pesquisadores optam por adotar procedimentos clássicos que são tradicionalmente utilizados para a extração de lipídios, como aquele descrito por Folch e colaboradores em 1957, no qual é utilizada a mistura clorofórmio:metanol 2:1 (v/v).³⁷

Entretanto, nos anos seguintes, várias metodologias alternativas foram propostas para esta finalidade por diferentes pesquisadores (Tabela 1). Algumas são extremamente trabalhosas como o procedimento realizado por Leite e colaboradores,¹⁶ em que uma extensa sequência de extrações com isopropanol seguida por hexano deve ser feita. Ainda há uma etapa de resfriamento, duas de secagem e uma de evaporação, de forma que o gasto de solventes é muito grande e cada procedimento pode levar horas para ser feito.

Também existem os procedimentos padronizados, como o ISO 2001.³⁸ As extrações previstas por esse método são realizadas em ampolas de separação, utilizando soluções de amônia e sulfato de sódio, além de etanol, éter etílico e pentano. A grande vantagem desse tipo de procedimento é o fato de ser um método internacionalmente estabelecido e que, portanto, pode ser aplicado nos trabalhos sem ser um dos focos principais da pesquisa.

4.2. Reação de transesterificação

Como os ácidos graxos são encontrados nos alimentos como TAG e, em menor

quantidade, como ácidos graxos livres; a fim de determiná-los por cromatografia em fase gás, principal técnica utilizada para determinação dos ALC em amostras de alimentos, é necessário converter os TAG a ácidos graxos livres e em substâncias com maior volatilidade.³⁹⁻⁴¹

Os métodos de derivatização mais comuns envolvem a transesterificação dos TAG, e a esterificação dos ácidos graxos livres, a ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG ou *fatty acid methyl esters - FAME*). Estes são mais facilmente volatilizados que os TAG ou que os ácidos graxos que os compõem.

Alguns fatores devem ser levados em consideração quando se deseja realizar as reações de transesterificação. Condições de reação como o tempo e, principalmente, a temperatura são fundamentais para a correta obtenção dos ésteres metílicos. Se a temperatura e o tempo não forem ideais, os TAG não serão completamente derivatizados, podendo ocorrer a formação de produtos de degradação dos ácidos graxos e a perda dos mais leves por volatilização.

Um grande problema em relação à transesterificação em meio ácido, por exemplo, é a possibilidade de isomerização dos *cis,trans* ALC a seus correspondentes isômeros *trans,trans* ALC, ou ainda, conversão a derivados metoxilados em posições alílicas. A temperatura elevada é o principal fator que influencia na geração desses produtos de degradação, uma vez que, mesmo em tempos de reação muito longos, as reações realizadas a baixas temperaturas não causam a degradação dos ALC na mesma proporção.³

A concentração dos reagentes também é muito importante. Geralmente, utiliza-se um excesso de álcool (metanol) para garantir que a reação sempre proceda no sentido de formação dos produtos desejados. As reações de transesterificação necessariamente demandam a utilização de um catalisador, que pode ser uma substância de caráter ácido ou básico, e a classificação da reação é feita justamente com base no tipo de

catalisador utilizado (Figura 4).

Em geral, este processo de transesterificação é uma sequência de três reações consecutivas, na qual mono e diacilgliceróis são formados como intermediários. Para uma transesterificação estequiometricamente completa, é necessária uma proporção molar 3:1 de

álcool por triacilglicerol. Entretanto, devido ao caráter reversível da reação, o agente transesterificante (álcool) geralmente é adicionado em excesso, contribuindo, assim, para aumentar o rendimento do éster, bem como permitir a sua separação do glicerol formado.⁴²

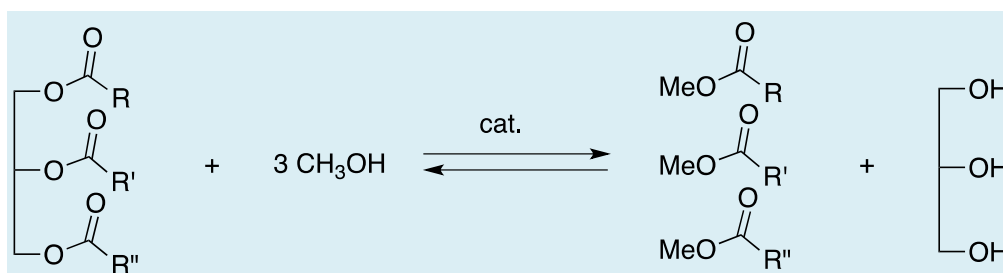


Figura 4. Reação de transesterificação de TAG

Os produtos da reação são uma mistura de ésteres, glicerol, álcool, catalisador (ácido ou básico) e tri-, di- e monoacilgliceróis (caso a reação não tenha sido completa). O glicerol pode ser separado por decantação ou centrifugação.⁴³ A melhor maneira de retirar

os demais interferentes do meio de reação é extrair os analitos da mistura. Isso geralmente é feito através de uma extração líquido-líquido com solventes pouco polares ou apolares, principalmente hexano.^{16,45,48,49,54}

Tabela 1. Procedimentos descritos na literatura para a extração lipídica de amostras de leite

Procedimentos de extração	Ref.
10 mL de leite + 100 mL de clorofórmio:metanol (2:1 v/v) + agitação por 30 min. + filtração + 25 mL de solução aquosa saturada de NaCl + secagem da fase de clorofórmio com Na ₂ SO ₄ anidro + evaporação dos solventes sob pressão reduzida (procedimento modificado por Christie (1989) ³⁷)	37
100 mL de leite + 80 mL de etanol, 20 mL de NH ₄ OH, 100 mL de Et ₂ O + 100 mL de pentano + 2 x 100 mL de Na ₂ SO ₄ 0,70 mol L ⁻¹ + 10 g de Na ₂ SO ₄ anidro + filtração + evaporação dos solventes sob pressão reduzida	38
15 mL de leite + 25 mL de isopropanol + 3 x 20 mL de hexano + 10 mL Na ₂ SO ₄ 0,5 mol L ⁻¹ + resfriamento a -20 °C por 20 min. + centrifugação a 2500 rpm a 5 °C por 5 min. + evaporação do solvente + 5 mL CH ₂ Cl ₂ + secagem com Na ₂ SO ₄ anidro + secagem sob N ₂ até o resíduo apresentar peso constante	16
1,5 mL de leite + 3,6 mL de isopropanol + 5,4 mL de hexano + filtração + lavagem com 2,5 mL de hexano:isopropanol (3:2 v/v) + evaporação dos solventes sob N ₂ + ressuspensão do extrato em 10 mL de diclorometano:metanol (10:1 v/v)	45
4 mL de leite + 8 mL de acetonitrila + agitação por 20 min. + resfriamento a -18 °C por 24 h + secagem da fase orgânica com 1 g de Na ₂ SO ₄ anidro	54

4.2.1. Transesterificação básica

As reações em meio básico representam o método mais utilizado para a conversão dos TAG em ésteres metílicos. Entre elas, destacam-se as reações com KOH/MeOH e NaOCH₃/MeOH.

A primeira etapa da transesterificação básica consiste na reação da base com o

álcool, produzindo um alcoóxido e o catalisador protonado (A). O ataque nucleofílico do alcoóxido ao grupo carbonílico do TAG gera um intermediário tetraédrico (B), a partir do qual são formados o éster metílico e o correspondente ânion do diacilglicerol, que desprotona o catalisador (C). Os diacilgliceróis e os monoacilgliceróis sofrem o mesmo mecanismo de reação, levando à formação dos ésteres metílicos e, na última etapa, o glicerol (D) (Figura 5).⁴⁴

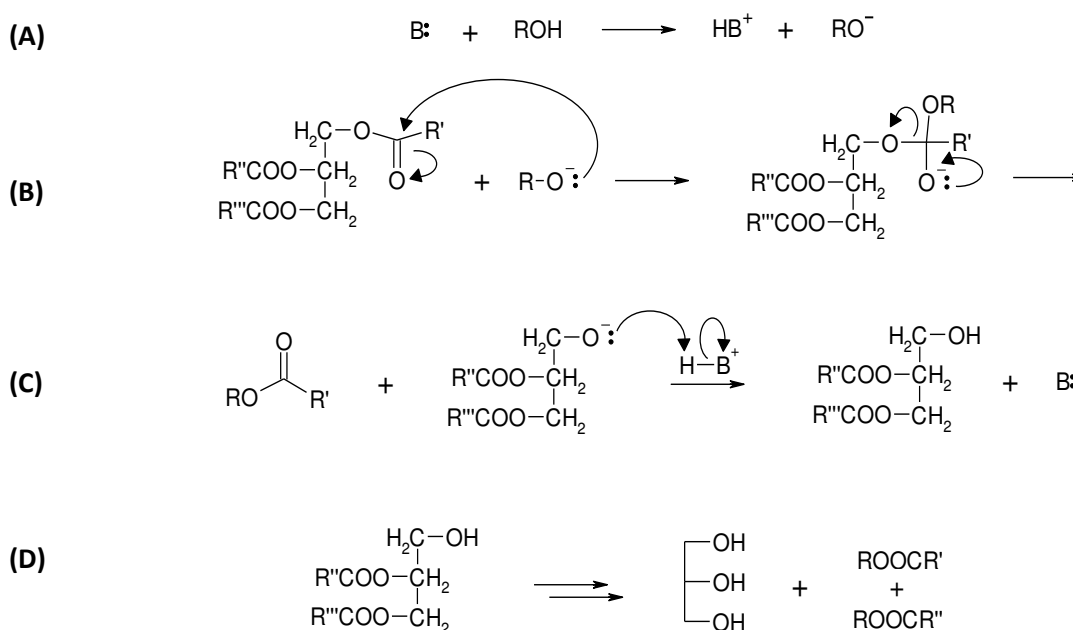


Figura 5. Mecanismo de reação da transesterificação via catálise básica

Em 2010, Nunes e colaboradores⁴⁵ descreveram um método muito trabalhoso, no qual é utilizado NaOCH₃ como catalisador. Nesta metodologia, o extrato contendo os lipídios deve ser seco com um suave fluxo de N₂ e dissolvido em hexano. Em seguida, esta solução em hexano é adicionada a uma solução de metanol contendo NaOCH₃ e esta mistura é aquecida em banho-Maria a 80 °C, sob fluxo de N₂ e agitação por 10 min. Após a solução atingir a temperatura ambiente, uma solução de metanol contendo HCl é adicionada, e a mistura é novamente aquecida nas mesmas condições anteriores.

Após a adição de uma solução de NaCl, os ésteres metílicos formados são extraídos com hexano seguido por centrifugação e, finalmente, a solução é evaporada e os analitos são ressuspensos em um volume adequado de hexano.

Uma reação com KOH como catalisador foi padronizada na ISO 2002.⁴⁶ Esta reação é feita a frio e é apenas adequada para extratos de gordura que possuam índice de acidez em ácido oleico inferior a 4,0. Devido à sua simplicidade, é ideal para análises rápidas e de rotina.

Vários pesquisadores adaptaram esses

tipos de reações de derivatização de acordo com sua conveniência.^{16,47} A principal ressalva que sempre é feita em relação aos catalisadores básicos é a possibilidade de não ocorrer a completa metilação dos ácidos graxos, o que pode levar a erros de quantificação.

Outro inconveniente que merece destaque é a necessidade do álcool e do extrato lipídico serem anidros. Isso se deve ao fato da água provocar a ocorrência de uma reação de saponificação paralela. A consequente formação de sabão reduz o rendimento da reação de transesterificação e dificulta a separação dos ésteres metílicos do glicerol. A reação em meio básico também requer que o conteúdo de ácidos graxos livres seja pequeno. Caso a matriz lipídica contenha alto teor de água e de ácidos graxos livres, o procedimento mais indicado para realizar a reação de transesterificação é via catálise ácida.⁴³

4.2.2. Transesterificação ácida

Metodologias alternativas foram propostas por outros pesquisadores utilizando catalisadores ácidos, como as reações com HCl/MeOH, H₂SO₄/MeOH e BF₃/MeOH.

Conforme mostra a Figura 6, o mecanismo da transesterificação ácida consiste na protonação do grupo carbonílico, levando à formação de um carbocátion (A). Após o ataque nucleofílico do álcool, um intermediário tetraédrico é formado (B). Em seguida, o acilglicerol correspondente é eliminado e o novo éster é formado, regenerando-se o catalisador ácido (C). O diacilglicerol sofre as mesmas reações anteriores, levando primeiramente à formação do monoacilglicerol e, na última etapa, o glicerol, além de mais duas moléculas de éster transesterificado (D).⁴⁴

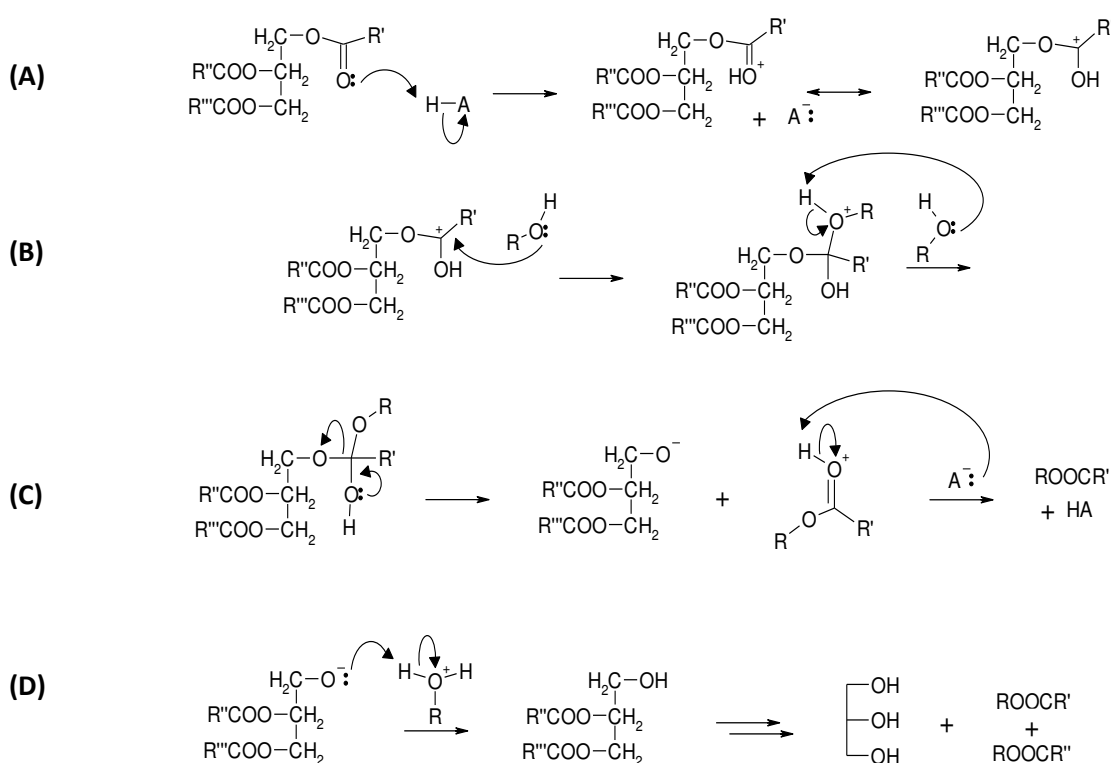


Figura 6. Mecanismo de reação da transesterificação via catálise ácida

Moltó-Puigmartí e colaboradores⁴⁸ avaliaram a eficiência do ácido clorídrico como catalisador. Uma solução de HCl/MeOH foi adicionada a uma certa quantidade de solução-padrão dos ALC e a mistura foi mantida à temperatura ambiente por 30 min. ou a 80°C por 30 ou 60 min. para reação. Neste estudo, a metilação da solução-padrão foi satisfatória em temperatura ambiente, porém o mesmo não ocorreu com o extrato do leite. Então, procedeu-se a reação em temperatura elevada e o que se observou, além da completa metilação dos ácidos graxos, foi a geração de produtos de degradação dos ALC.

O mesmo não ocorreu no trabalho de O'Fallon e colaboradores⁴⁹, que realizaram um procedimento semelhante, porém com BF₃ como catalisador e temperatura de reação de 55 °C por 90 min. Os resultados confirmaram o que foi observado pelos grupos de Park³ (em 2002) e de Luna⁵⁰ (em 2008), quando H₂SO₄ foi utilizado como catalisador.

As reações de transesterificação em meio ácido, portanto, mostraram-se mais eficientes para a completa metilação dos ácidos graxos do que as reações catalisadas por substâncias básicas. Porém, deve-se ter muito cuidado com as condições de reação para que não ocorra a degradação dos analitos.

Além disso, esse procedimento é o mais indicado para ser aplicado a extratos lipídicos de alimentos, devido ao alto conteúdo de água que apresentam.

4.3. Identificação cromatográfica

Devido à complexidade da matriz leite e à semelhança estrutural dos isômeros ALC, a principal técnica utilizada para determiná-los e quantificá-los em amostras biológicas, após

a transesterificação, é a cromatografia em fase gás acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) ou com detecção por ionização de chama (CG/DIC).^{37,49,51,52} Esta técnica tornou-se, desde 1952, a principal ferramenta para determinação e quantificação de ácidos graxos em diversas matrizes.⁵¹

Dentre as diferentes fases estacionárias empregadas nas colunas capilares de sílica fundida utilizadas nos sistemas de cromatografia em fase gás, as fases de alta polaridade de polisiloxano de cianopropila são as que proporcionam a maior seletividade e poder de resolução na separação dos isômeros de ALC. Na maior parte das análises, o gás Hélio é utilizado como gás de arraste.^{16,37,49,51,52,53}

A sensibilidade e a seletividade que podem ser obtidas nas determinações dos ésteres metílicos por CG/EM e CG/DIC permitem determinações precisas dos ALC em amostras de leite, com boa reprodutibilidade, alcançando baixos limites de detecção e de quantificação. No caso da determinação por CG/EM, a confirmação espectrométrica das estruturas também proporciona uma investigação mais detalhada dos isômeros.^{51,53}

Em particular, no acoplamento CG/EM, os ALC ou os éteres metílicos são ionizados pela fonte de ionização por elétrons (IE) a 70 eV. Após ionização, os íons de peso molecular destes ésteres são pouco estáveis e não são usados como base para determiná-los e quantificá-los. Os íons apropriados para estes fins são fragmentos mais estáveis, como por exemplos os íons de *m/z* 67, 81, 95 para os ALC.⁵¹

Na Tabela 2, estão listadas algumas condições cromatográficas utilizadas para identificação e quantificação dos ALC em amostras de alimentos.

Tabela 2. Condições cromatográficas para determinação dos ALC e outros ésteres metílicos em diferentes amostras de alimento

Amostras	Fases Estacionárias (dimensões)	Gás de Arraste (Vazão)	Acoplamento/ Detecção
Leite bovino ¹⁶	100% polisiloxano de cianopropila (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm)	He (1,66 mL min ⁻¹)	CG/EM
Óleo de peixe, canola, alfafa, carne ⁴⁹	100% polisiloxano de cianopropila (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm)	He (0,50 mL min ⁻¹)	CG/DIC
Tecido de peixe ⁵¹	(50%-cianopropil)-metilpolisiloxano (60 m x 0,25 mm x 0,25 µm)	He (1,00 mL min ⁻¹)	CG/EM e CG/DIC
Leite bovino ⁵²	100% polisiloxano de cianopropila (100 m x 0,25 mm x 0,20 µm)	He (1,00 mL min ⁻¹)	CG/EM
Óleo de girassol, sebo e óleo de fígado de bacalhau ⁵³	100% polisiloxano de cianopropila (50 m x 0,25 mm x 0,20 µm)	He (1,00 mL min ⁻¹)	CG/EM e CG/DIC

4.4. Teores do ALC 9-*cis*, 11-*trans* em leites reportados em diferentes países

O teor de ALC em leite geralmente é reportado como um valor percentual em relação à quantidade total de lipídios que compõe a amostra. Desse modo, reduz-se a ocorrência de erros que levariam a valores absolutos equivocados, e elimina-se a necessidade de ajustar a metodologia para que se obtenha uma recuperação máxima do ácido graxo, como usualmente deve ser feito para outros analitos.

Na Figura 4, estão descritos os teores do 9-*cis*, 11-*trans* ALC em leites UHT (*Ultra Heat Treatment* ou Temperatura Ultra-Alta de Pasteurização) obtidos em diversos países.^{16,54}

O leite UHT é o tipo de leite mais comercializado e usado no mundo inteiro. Este produto é considerado comercialmente

estéril, ou seja, um produto que não contém micro-organismos capazes de se desenvolverem nas condições normais de estocagem e comercialização. O processo de pasteurização pode causar variações nos níveis de ALC encontrados nos diferentes tipos de leite (cru, pasteurizado e ultra pasteurizado - UHT).^{16,55}

Este fato foi comprovado por Leite e colaboradores¹⁶, os quais investigaram o efeito do processo de pasteurização, determinando o teor de ALC em amostras de leite cru, pasteurizado e UHT, que foram respectivamente: 1,56 ± 0,05 %; 1,40 ± 0,04 % e 1,26 ± 0,04 %. As altas temperaturas utilizadas no processo foram consideradas a principal causa da degradação ou isomerização dos ALC no leite UHT.

Como exposto anteriormente, a concentração de ALC presente no leite depende de diversos fatores, que podem

estar relacionados tanto ao modo de criação do gado, quanto a fatores geográficos do local da coleta.⁵⁶ Em relação à criação do gado, variáveis como alimentação (pastoral, ração, celeiro, mista), genótipo do animal e fase de lactação devem ser consideradas. Para os fatores geográficos, estação do ano, localização geográfica e perfil climático do local da coleta do leite são pontos relevantes.⁵⁶

Os dados apresentados na Figura 7 expõem claramente a relação entre os fatores descritos acima e o teor de ALC encontrado no leite UHT nos diferentes locais de coleta. Deste modo, podemos concluir que as pequenas variações observadas entre os teores de ALC nas diferentes localidades

são reflexo dos fatores geográficos e dos diferentes modos de criação adotados em cada local. De qualquer modo, o percentual médio de ALC no leite UHT corresponde a 0,87% na porção lipídica do leite.

No Brasil, os resultados obtidos em um trabalho realizado por Gouvêa e colaboradores⁵⁴, com amostras de leite UHT comercializadas nos supermercados das cidades de Niterói e Rio de Janeiro, indicaram uma percentagem média de 0,66 % de ALC em relação à quantidade total de lipídio do leite UHT.⁵⁴ Este valor é superior ao encontrado nos Estados Unidos (0,45 %), contudo é um pouco inferior aos encontrados em outros países (Figura 7).

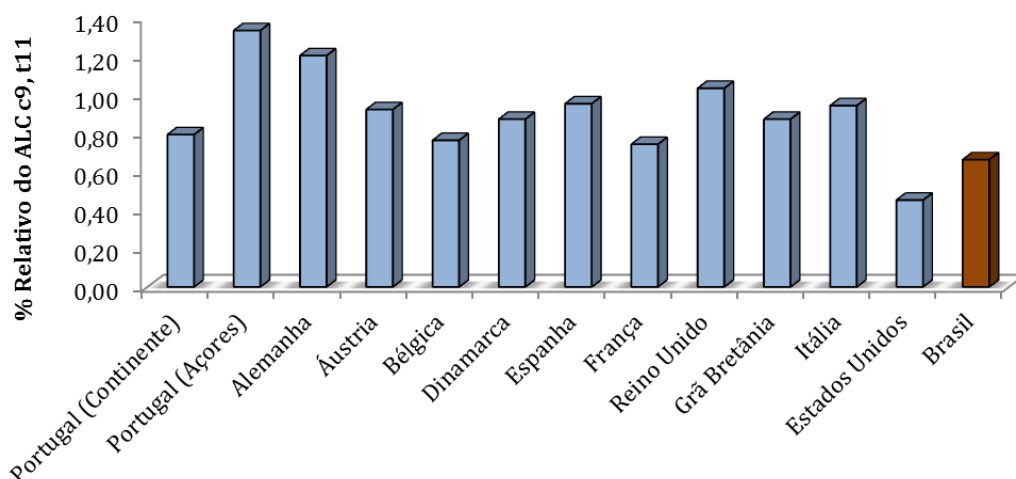


Figura 7. Percentuais relativos do 9-*cis*, 11-*trans* ALC em relação à quantidade total de lipídio de leites provenientes de diversos países (dados retirados do trabalho de Leite e colaboradores¹⁶ e Gouvêa e colaboradores⁵⁴)

5. Conclusões

A maior parte das publicações parece ser pouco conclusiva em relação às reais influências (positivas) que os ALC exercem

sobre a saúde humana, pois os resultados obtidos são divergentes. Os bons resultados obtidos com animais de laboratório não conseguem ser reproduzidos quando aplicados nos ensaios clínicos com humanos.

Os autores destes trabalhos convergem na opinião de que as metodologias dos estudos devem ser revisadas e melhoradas, e que

novos estudos devem ser realizados com prazo de execução mais estendidos para que conclusões definitivas possam ser tiradas em relação ao consumo de ALC como um suplemento benéfico à saúde humana.

Embora haja metodologias bem estabelecidas para extração e transesterificação de ácidos graxos, a determinação e a quantificação exata e precisa destes ácidos em amostras de alimentos, especialmente no leite, exige um controle mais severo destas metodologias, o que torna o procedimento mais complexo.

Desse modo, há uma grande necessidade de se realizar trabalhos relevantes nessa área, que possam proporcionar determinações mais simples, rápidas e baratas, mas que ao mesmo tempo sejam sensíveis, seletivas e não degradem os ácidos linoleicos conjugados.

O teor do isômero 9-*cis*, 11-*trans* ALC em leites UHT reportado em diferentes localidades diferem muito pouco entre si, tendo um percentual médio de 0,87 % na porção lipídica do leite. As pequenas variações observadas entre os teores de ALC nos diferentes países podem ser reflexo dos fatores geográficos e dos diferentes modos de criação adotados em cada local.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, PROPPI-UFF (auxílio à pesquisa na modalidade Jovens Pesquisadores), FAPERJ (processo E-26/111.794/2010) e MAPA (processo 578782-2008-1) pelo apoio financeiro. Agradecimentos também para o CNPq e a FAPERJ pelas bolsas concedidas.

Referências Bibliográficas

¹ Silva, M. H. L.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2001. [\[Link\]](#)

² Sítio da Associação Brasileira de Produtores de Leite. Instrução Normativa nº 51, de 18 de setembro de 2002 (MAPA) – Regulamento técnico de identidade e qualidade de leite pasteurizado. Disponível em: <http://www.leitebrasil.org.br/legislacao.htm>. Acesso em: 22/11/2012.

³ Park, S. J.; Park, C. W.; Kim, S. J.; Kim, J. K.; Kim, Y. R.; Park, K. A.; Kim, J. O.; Ha, Y. L. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 989. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

⁴ Chilliard, Y.; Ferlay, A.; Doreau, M. *Livest Prod Sci.* **2001**, *70*, 31. [\[CrossRef\]](#)

⁵ Kritchevsky, D.; Tepper, S.A.; Wright, S.; Czarnecki, S. K.; Wilson, T. A.; Nicolosi, R. J. *Lipids* **2004**, *39*, 611. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

⁶ Whigham, L. D.; Cook, M. E.; Atkinson, R. L. *Pharm. Res.* **2000**, *42*, 503. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

⁷ Fernandes, S. A. A.; *Tese de Doutorado*, Escola Superior de Agricultura, Brasil, 2004.

⁸ Ha, Y. L.; Grimm, N. K.; Pariza, M. W. *Carcinogenesis* **1987**, *8*, 1881. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

⁹ Ip, C.; Briggs, S. P.; Haegele, A.D.; Thompson, H. J.; Storkson, J.; Scimeca, J. A. *Carcinogenesis* **1996**, *17*, 1045. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

¹⁰ Miller, C. C.; Park, Y.; Pariza, M. W.; Cook, M. E. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *198*, 1107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

¹¹ Cook, M. E.; Pariza, M. *Int. Dairy J.* **1998**, *8*, 459. [\[CrossRef\]](#)

¹² Biondi L.; Valvo M. A.; Di Gloria, M.; Tenghi, E. S.; Galofaro V.; Priolo A. *Small Ruminant Research.* **2008**, *75*, 17. [\[CrossRef\]](#)

¹³ Chin, S. F.; Liu, W.; Storkson, J. M.; Ha, Y. L.; Pariza, M. W. *J. Food. Compos. Anal.* **1992**, *5*, 185. [\[CrossRef\]](#)

¹⁴ Lock A. L.; Garnsworthy P. C. *Livest Prod Sci.* **2003**, *79*, 47. [\[CrossRef\]](#)

¹⁵ Griinari, J. M.; Corl, B. A.; Lacy, S. H.; Chouinard, P. Y.; Nurmela, K. V. V.; Bauman, D. E. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 2285. [\[PubMed\]](#)

¹⁶ Leite, J.; Lima, E.; Baptista, J. *Lait* **2007**, *87*, 167. [\[CrossRef\]](#)

¹⁷ Costa, E.; Queiroga, R. C. R. E.; Pereira, R. A. G. *R. Bras. Zootec.* **2006**, *35* (supl.), 1829. [\[CrossRef\]](#)

¹⁸ Fernie C. E. Em *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*; Frank D. G., ed.;

- Scottish Crop Research Institute: Reino Unido, 2003, 1581. [CrossRef]
- ¹⁹ Shultz, T. D.; Chew, B. P.; Seaman, W. R. *Anticancer Res.* **1992**, *12*, 2143. [PubMed]
- ²⁰ Ip, C.; Singh, M.; Thompson, H. J. *Cancer Res.* **1994**, *54*, 1212. [PubMed]
- ²¹ Ip, C.; Chin, S. F.; Scimeca, J. A. *Cancer Res.* **1991**, *51*, 6118. [PubMed]
- ²² Cesano, A.; Visonneau, S.; Scimeca, J. A.; Kritchevsky, D.; Santoli, D. *Anticancer Res.* **1998**, *18*, 1429. [PubMed]
- ²³ Kelley, N. S.; Hubbard, N. E. Erickson, K. L. *J. Nutr.* **2007**, *137*, 2599. [PubMed]
- ²⁴ Larsson, S. C.; Bergkvist, L.; Wolk, A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2009**, *90*, 556. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁵ Sítio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RE Nº 833, de 28 de março de 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2007/re_833_07.pdf>. Acesso em: 08 janeiro 2012.
- ²⁶ Racine, N. M.; Watras, A. C.; Carrel, A. L. *Am. J. Clin. Nutr.* **2010**, *91*, 1157. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁷ Onakpoya, I. J.; Posadzki, P. P.; Watson, L. K.; Davies, L. A.; Ernst, E. *Eur. J. Nutr.* **2012**, *51*, 127. [PubMed]
- ²⁸ Whigham, L. D.; Watras, A. C.; Schoeller, D. A. *Am. J. Clin. Nutr.* **2007**, *85*, 1203. [PubMed]
- ²⁹ Navarro, V.; Fernández-Quintela, A.; Churrua, I.; Portillo, M. P. *J. Physiol. Biochem.* **2006**, *62*, 137. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁰ Raff, M.; Tholstrup, T.; Basu, S.; Nonboe, P.; Sørensen, M. T.; Straarup, E. M. *J. Nutr.* **2008**, *138*, 509. [PubMed]
- ³¹ Moloney, F.; Toomey, S.; Noone, E.; Nugent, A.; Allan, B.; Loscher, C. E.; Roche, H. M. *Diabetes* **2007**, *56*, 574. [CrossRef] [PubMed]
- ³² Poirier, H.; Shapiro, J. S.; Kim, R. J.; Lazar, M. A. *Diabetes* **2006**, *55*, 1634. [CrossRef] [PubMed]
- ³³ Ramírez-Santana, C.; Castellote, C.; Castell, M.; Rivero, M.; Rodríguez-Palmero, M.; Franch, A.; Pérez-Cano, F. J. *J. Nutr.* **2009**, *139*, 76. [PubMed]
- ³⁴ Sugano, M.; Tsujita, A.; Yamasaki, M.; Yamada, K.; Ikeda, I.; Kritchevsky, D. *Nutr. Biochem.* **1997**, *8*, 38. [CrossRef]
- ³⁵ Yamasaki, M.; Kishihara, K.; Mansho, K.; Ogino, Y.; Kasai, M.; Sugano, M.; Tachibana, H.; Yamada, K. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* **2000**, *64*, 2159. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁶ Tonial, I. B.; Matsushita, M.; Souza, N. E.; Perini, J. A. L.; Morais, D. R.; Bani, F. A.; Visentainer, J. V. *Arch. Latinoam. Nutr.* **2009**, *59*, 78. [PubMed]
- ³⁷ Folch, J.; Lees, M.; Sloane Stanley, G. H. *Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497. [PubMed]
- ³⁸ ISO 2001 International Standard ISO 14156-IDF 172:2001.
- ³⁹ Christie, W. W., The AOCS Lipid Library Page. Disponível em: <<http://lipidlibrary.aocs.org/topics/gcoftg/index.htm>>. Acesso em: 23 abril 2012.
- ⁴⁰ Ruiz-Samblás, C.; Cuadros-Rodríguez, L.; González-Casado, A.; Rodríguez-García, F. P. *Anal. Methods.* **2012**, *4*, 753. [CrossRef]
- ⁴¹ Fasciotti, M.; Pereira Netto, A. D. *Talanta* **2010**, *81*, 1116. [CrossRef]
- ⁴² Geris, R.; Santos, N. A. C.; Amaral, B. A.; Maia, I. S.; Castro, V. D.; Carvalho, J. R. M. *Quim. Nova* **2007**, *5*, 1369. [CrossRef]
- ⁴³ Ma, F.; Hanna, M. A. *Bioresour. Technol.* **1999**, *70*, 1. [CrossRef]
- ⁴⁴ Shuchardt, U.; Sercheli, R.; Vargas, R.M.; J. *Braz. Chem. Soc.* **1998**, *9*, 199. [CrossRef]
- ⁴⁵ Nunes, J. C.; Torres, A. G. *J. Food Compos. Anal.* **2010**, *23*, 782. [CrossRef]
- ⁴⁶ ISO 2002 International Organization for Standardization. ISO 15304:2002.
- ⁴⁷ Simionato, J. I.; Garcia, J. C.; dos Santos, G. T.; Oliveira, C. C.; Visentainer, J. V.; de Souza, N. E. *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 520. [CrossRef]
- ⁴⁸ Moltó-Puigmartí, C.; Castellote, A. I.; López-Sabater, M. C. *Anal. Chim. Acta.* **2007**, *602*, 122. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁹ O'Fallon, J. V.; Busboom, J. R.; Nelson, M. L.; Gaskins, C. T. *J. Anim. Sci.* **2007**, *85*, 1511. [PubMed]
- ⁵⁰ Luna, P.; Juárez, M.; Fuente, M. A. *J. Chromatogr. A.* **2008**, *1204*, 110. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵¹ Dodds, E. D.; McCoy, M. R.; Rea, L. D.; Kennish, J. M. *Lipids* **2005**, *40*, 419. [CrossRef] [PubMed]

⁵² He, S.; Ma, Y.; Wang, J.; Li, Q.; Yang, X.; Tang, S.; Li, H. J. *Food Compos.* **2011**, *24*, 223. [[CrossRef](#)]

⁵³ Thurnhofer, S.; Vetter, W. J. *Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8896. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁵⁴ Gouvêa, M. M; Franco, C. F. J; Marques, F. F. de C; Pereira Netto, A. D. *Resumos do 16^a*

Encontro Nacional de Química Analítica, Campos do Jordão, Brasil, 2011.

⁵⁵ Precht, D.; MolKentin, J. *Milchwissenschaft.* **2000**, *55*, 687. [[CrossRef](#)]

⁵⁶ Vera, L. G. D; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de Açores, Portugal, 2010.