

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Ácido linoleico conjugado em cortes bovinos e laticínios: avaliação de metodologias analíticas para a quantificação dos isômeros conjugados majoritários.

Felipe Gomes Pinheiro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Ácido linoleico conjugado em cortes bovinos e laticínios: avaliação de metodologias analíticas para a quantificação dos isômeros conjugados majoritários.

Felipe Gomes Pinheiro

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Tit. Jorge Mancini Filho

São Paulo
2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Bibliotecas e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Pinheiro, Felipe Gomes
*654x Ácido linoléico conjugado em cortes bovinos e laticínios: avaliação de metodologias analíticas para a quantificação dos isômeros conjugados majoritários / Felipe Gomes Pinheiro. -- São Paulo, 2010.
52p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.
Orientador: Mancini Filho, Jorge

I. Carne bovina : Ciência dos alimentos. 2. Análise cromatográfica : Química. 3. Ácido graxo : Metabolismo I. T. II. Mancini Filho, Jorge, orientador.

641.362 CDD

Felipe Gomes Pinheiro

Ácido linoleico conjugado em cortes bovinos e laticínios: avaliação de metodologias analíticas para a quantificação dos isômeros conjugados majoritários.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Tit. Jorge Mancini Filho
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

DEDICATÓRIA

À minha mãe **Ana Maria Gomes** que sempre falou, por mais lúdico que soasse, que seu filho seria cientista.

Ao meu pai **Daniel Rodriguez de Carvalho Pinheiro** que, mesmo sabendo o quão árduo é este caminho, me ensinou que não há bônus sem ônus.

E aos meus irmãos, **Isabela e João Guilherme**, por todo apoio e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar saúde e capacidade de realizar este trabalho.

Ao meu orientador, Professor **Jorge**, pela oportunidade, orientação, paciência, confiança e pela incessante colaboração para a realização deste projeto.

Aos meus familiares pelo amor, pelas ligações para saber como eu estava, se minha casa não alagava com as fortes chuvas de São Paulo e do interesse pelo meu trabalho, mesmo sem entender nada. Principalmente pela insistente frase do meu avô “estudar, estudar e estudar pra ser doutor.” Continuo me esforçando!

Aos meus novos irmãos, **Francisco Leonardo e Vivianne**, por estarem sempre ao meu lado, nos momentos difíceis, como o período em que nenhum tinha bolsa, nas conquistas, nas besteiras e nos puxões de orelha. Vocês deram à essa conquista um valor maior.

À **Mariana**, pelo carinho, companheirismo, paciência e ajuda nesse momento tão importante e conturbado.

Aos amigos do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da FCF/USP, **Alexandre, Luciana, Cristiane, Cassiana, Natália, Paula, Claudimar, Mahyara, Emídio, Daiana, Michele, Gabriela, Lucas, Tatiane, Mariana Dutilh, Ariana, Bárbara, Liliane, Milena, Patrícia, Carol, Daniel, Cláudia, Michelle, Renato, João Paulo, Claudinéia, Tânia, Virgínia e Renata** pelo aprendizado, cervejas e papos furados.

Aos meus amigos **Aline Coelho, Tiago Olinda, Danilo, Beatriz, Gustavo, Rafaelly, Paulo Gean, Diego, Amanda, Saulo Rodrigo Lucas** (é o nome dele mesmo!), **Tiago Melo e Bruna**, por me encherem de orgulho da minha profissão.

Aos amigos **Ian, Helano, Bill, Andréa, Ray, Aline Mota, Fabrício** pela amizade de longa data mantida intacta mesmo com a distância.

Ao **Maurício Ricardo** pelas risadas garantidas.

Aos professores da Faculdade de Farmácia da UFC pelos ensinamentos tão importantes para a minha formação, em especial ao **Prof. Everardo Menezes** por ter me mostrado a beleza da pesquisa e ao **Prof. Carlos Couto** por ter me desafiado e mostrado que eu poderia ir mais longe.

A todos os colegas de laboratório (**Ana Mara, Claudimar, Eliane, Fernanda, Gabriela, Illana, Lucillia, Mahyara, Milessa, Paula**) pelo apoio e pelos momentos de descontração.

À **Lurdinha e Joana**, pela atenção, carinho e conselhos de mãezonas.

À técnica **Rosângela**, pelo auxílio na realização das análises.

Ao **Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP e à **Comissão de Pós-Graduação**, pela oportunidade de realizar este curso.

Ao **Cyted (Programa iberoamericano de Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo) rede 208RT0343 “Ácidos grasos isoméricos trans y cla: intervención interdisciplinaria tendientes a reducir el riesgo de enfermedades crónicas no transmisibles”**, pela oportunidade de fazer pesquisa junto à essa rede.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao **Edílson, Cléo e Mônica**, da Secretaria do Bloco 14, por todo o auxílio e atenção.

À **Elaine e Jorge**, da Secretaria de Pós-Graduação, pela atenção disponibilizada.

À **Maria Inês de Almeida Gonçalves**, do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear, pelas análises de RMN.

Aos professores das disciplinas que cursei durante o mestrado.

Aos professores que participaram da banca de qualificação e de defesa e também àqueles
que me ajudaram quando foi preciso.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1	Lipídeos Alimentares	2
2.1.1	Ácidos Graxos Saturados (AGS).....	3
2.1.2	Ácidos Graxos <i>Trans</i> (AGT).....	3
2.1.3	Ácidos Graxos Poliinsaturados.....	5
2.2	Ácido Linoleico Conjugado (CLA).....	7
2.2.1	Biossíntese	8
2.2.2	Ocorrência em Alimentos	10
2.2.3	Ações metabólicas.....	11
2.3	Aspectos Analíticos.....	13
2.3.1	Cromatografia gasosa.....	13
2.3.2	Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	16
3	OBJETIVOS	18
3.1	Objetivo geral.....	18
3.2	Objetivos específicos.....	18
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1	Material	19
4.2	Extração de lipídeos da carne.....	19
4.3	Extração de lipídeos do creme de leite e do iogurte	19
4.4	Extração de lipídeos do queijo.....	20
4.5	Métodos de Esterificação.....	20
4.5.1	Esterificação com trifluoreto de boro metanólico (BF ₃ /metanol)	21
4.5.2	Esterificação com metóxido de sódio metanólico (NaOCH ₃ /metanol)	21
4.5.3	Esterificação combinada com metóxido de sódio metanólico (NaOCH ₃ /metanol), seguida de trifluoreto de boro metanólico (BF ₃ /metanol)	21
4.6	Condições Cromatográficas	22

4.6.1	CLA01 (KRAMER et al., 1997)	22
4.6.2	CLA02 (CORDAIN et al., 2001).....	22
4.6.3	CLA03 (BAUBLITS et al., 2007).....	22
4.7	Ressonância Magnética Nuclear	22
4.8	Determinação da Gordura	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1	Resultado dos processos de esterificação para a amostra Tonalin® TG 80 da Cognis 24	
5.1.1	Métodos de esterificação.....	25
5.1.2	Métodos cromatográficos	27
5.2	Identificação e quantificação por Ressonância Magnética Nuclear do carbono.....	30
5.2.1	Cálculo da concentração do Tonalin FFA 80	30
5.2.2	Cálculo da concentração do Tonalin TG 80	31
5.3	Gravimetria das carnes	33
5.4	Perfil de ácidos graxos das carnes	34
5.5	Perfil de ácidos graxos das capas de gordura	36
6	CONCLUSÕES.....	42
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Perfil de ácidos Graxos do Tonalin TG 80 no laudo técnico.....	24
Tabela 2 Perfil de ácidos Graxos do Tonalin TG 80 pelo método CLA01	24
Tabela 3. Teor de gordura das carnes.....	33
Tabela 4 Perfil de ácidos graxos dos músculos em g/100 g de lipídeos	34
Tabela 5 Perfil de ácidos graxos dos músculos em mg/100 g de amostra	35
Tabela 6 Perfil de ácidos graxos das capas de gordura em g/100 g de lipídeos	36
Tabela 7 Teor de gordura dos laticíneos	39
Tabela 8 Perfil de ácidos graxos dos laticínios em g/100 g de lipídeos	39
Tabela 9 Perfil de ácidos graxos dos laticínios em g/100 g de amostra.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Hidrogenação de ácidos graxos. Adaptado de Mancini-Filho e Chemin (1996).	4
Figura 2 Competência metabólica na formação de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, ômega-6 e ômega-3. Adaptado de (RUSSO, 2009).....	6
Figura 3 Estrutura dos isômeros <i>t</i> -10, <i>c</i> -12 CLA; <i>c</i> -9, <i>t</i> -11 CLA e do <i>c</i> -9, <i>c</i> -11 ácido linoleico. Adaptado de Pariza, Park e Cook (2001).....	8
Figura 4 Vias metabólicas de biossíntese do ácido vacênico. Adaptado de Bauman e Griinari (2001).....	10
Figura 5 Mecanismo de esterificação ácida.....	15
Figura 6 Mecanismo de transesterificação ácida.....	15
Figura 7 Mecanismo de esterificação alcalina.....	15
Figura 8 Aumento na formação do estereoisômero <i>t</i> -9, <i>t</i> -11 a partir do <i>c</i> -9, <i>t</i> -11 CLA sob os diferentes métodos de esterificação. Esterificação alcalina (NaOCH ₃), mista (NaOCH ₃ + BF ₃) e ácida (BF ₃).....	25
Figura 10 Cromatograma padrão sigma 18919 adicionado de CLA pelo método CLA01.	27
Figura 11 Cromatograma Tonalin TG 80 esterificado com NaOCH ₃ pelo método CLA01.....	27
Figura 12 Cromatograma padrão sigma 18919 adicionado de CLA pelo método CLA02.	28
Figura 13 Cromatograma Tonalin TG 80 esterificado com NaOCH ₃ pelo método CLA02.....	28
Figura 14 Cromatograma padrão sigma 18919 pelo método CLA03.	29
Figura 15 Cromatograma Tonalin TG 80 esterificado com NaOCH ₃ pelo método CLA03.....	29
Figura 16 Espectro de RMN ¹³ C do Tonalin FFA 80.	30
Figura 17 Espectro de RMN ¹³ C do Tonalin TG 80.	31
Figura 18 Espectro de RMN ¹³ C do isômero isolado <i>c</i> -9, <i>t</i> -11 CLA.	32

LISTA DE ABREVIATURAS

AGS	Ácidos Graxos Saturados
AGT	Ácidos Graxos <i>Trans</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARA	Ácido Araquidônico
BF₃	Trifluoreto de Boro
CG	Cromatografia Gasosa
CLA	Ácido Linoleico Conjugado
DHA	Ácido Docosahexaenoico
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
FDA	Food and Drug Administration
HDL-c	<i>High Density Lipoprotein-cholesterol</i>
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
LA	Ácido Linoleico
LDL-c	<i>Low Density Lipoprotein-cholesterol</i>
LnA	Ácido Linolênico
PUFA	<i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>
RA	Ácido Rumênico
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
p.i.	Padrão Interno

TAG	Triacilgliceróis
TMS	Tetrametilsilano
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
VA	Ácido Vacênico
ω-3	Ômega 3
ω-6	Ômega 6

ABSTRACT

Conjugated linoleic acid in beef and dairy products: assessment of analytical methodologies for majority conjugated isomers quantification.

Conjugated linoleic acids (CLAs) are a group of geometric and positional isomers of linoleic acid which have been attributed to present anticarcinogenic, antidiabetic, antiaterogenic and body composition modulation effects. Major natural sources of CLA are ruminants milk and meat, since rumen microorganisms are able to produce CLAs and their precursors as intermediates of biohydrogenation. Before identification and quantification by gas chromatography (GC), the methylation procedure should be carefully decided to avoid isomerization of CLAs. Thus, the objective of this study was to critically evaluate analytical methods for characterizing conjugated linoleic acid isomers *c*-9, *t*-11 and *t*-10, *c*-12, by identifying the best method for esterification and the best gas chromatography programming for separation, identification and quantification of CLAs through quantification of CLAs in supplements, beef and dairy products. In order to accomplish this objective, the techniques of acid esterification with boron trifluoride methanol, alkaline esterification with methanolic sodium methoxide and mixed esterification using a combination of the two catalysts were employed in the methylation of a commercial sample of conjugated linoleic acid supplement in triacylglycerol form, the CLA Tonalin[®] TG 80, from Cognis. The methyl esters were identified in 3 chromatographic conditions CLA01, CLA02 and CLA03. CLA isomers *c*-9, *t*-11 and *t*-10, *c*-12 were also quantified in CLA Tonalin[®] TG 80 and FFA 80 by carbon 13 nuclear magnetic resonance (¹³C-NMR). The results indicated the alkaline esterification technique followed by chromatographic analysis by CLA03 method as the best method for analyzing five cuts of beef fractionated in muscle and fat layer, cream, full yoghurt and three types of cheese. The alkaline esterification method followed by GC separation method CLA03 proved to be the most suitable for safe quantification of fatty acid profile in foods that contain conjugated linoleic acid isomers, once the results agreed with the data available in the current literature.

Key Words: Conjugated Linoleic Acid, Gas Chromatography, Esterification, Beef, Dairy products.

RESUMO

Ácido linoleico conjugado em cortes bovinos e laticínios: Avaliação de Metodologias Analíticas para a quantificação dos Isômeros Conjugados majoritários.

Os ácidos linoleicos conjugados (CLAs) consistem de um grupo de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoleico aos quais tem sido atribuídos efeitos anticarcinogênico, antidiabético, antiaterogênico e modulador da composição corporal. As principais fontes naturais de CLA são o leite e a carne de ruminantes, uma vez que microorganismos ruminais são capazes de formar CLAs e seus precursores como intermediários da biohidrogenação. Para sua identificação e quantificação por cromatografia gasosa (CG) deve-se tomar cuidado ao decidir um procedimento apropriado de metilação, a fim de evitar a isomerização dos CLAs. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi de avaliar criticamente metodologias analíticas para caracterizar os isômeros conjugados *c*-9, *t*-11 e *t*-10, *c*-12 do ácido linoleico, identificando o melhor método para a esterificação e a melhor programação por cromatografia gasosa para a separação, identificação e quantificação dos CLAs através de sua análise em suplementos, cortes bovinos e laticínios. Para tanto, foram empregadas as técnicas de esterificação ácida com trifluoreto de boro metanólico, esterificação alcalina com metóxido de sódio metanólico e uma esterificação mista usando a combinação dos dois catalisadores na metilação de uma amostra comercial de suplemento de ácido linoleico conjugado na forma de triacilglicerol, o Tonalin® CLA TG 80, da Cognis. Os ésteres metílicos foram identificados sob três condições cromatográficas CLA01, CLA02 e CLA03. Também foram realizadas quantificações dos isômeros *c*-9, *t*-11 e *t*-10, *c*-12 CLA no Tonalin® CLA TG 80 e FFA 80 através de ressonância magnética nuclear do carbono 13 (¹³C-RMN). Os resultados obtidos permitiram decidir pelo emprego da técnica de esterificação alcalina, seguido da análise cromatográfica pelo método CLA03 para análise de cinco cortes bovinos fracionados em músculo e capa de gordura, creme de leite, iogurte integral e três tipos de queijo. O método de esterificação alcalina, seguido de separação por CG pelo método CLA03 mostrou-se o mais adequado para uma quantificação segura do perfil de ácidos graxos de alimentos que contenham os isômeros conjugados do ácido linoleico, uma vez que os resultados obtidos concordam com a literatura atual.

Palavras Chave: Ácido Linoleico Conjugado, Cromatografia Gasosa, Esterificação, Carnes, Laticínios.

1 INTRODUÇÃO

As alterações no estilo de vida nas últimas décadas trouxeram mudanças aos hábitos alimentares que, junto ao sedentarismo, acarretaram maior incidência de doenças crônicas não transmissíveis (GRUNDY, 2002; PARK e PARIZA, 2007). Estudos mostram a importância quantitativa e qualitativa dos lipídeos da dieta no desenvolvimento dessas doenças relacionadas principalmente à ingestão de ácidos graxos saturados (KENNEDY et al, 2009) e ácidos graxos *trans* (MICHA e MOZAFFARIAN, 2009). Entretanto, a origem desses ácidos graxos *trans* apresenta diferença nas consequências metabólicas de sua ingestão, um exemplo disso é o ácido linoleico conjugado.

Ácido linoleico conjugado refere-se genericamente a uma classe de isômeros dienoicos conjugados posicionais e geométricos do ácido linoleico (C18:2 ω -6) (PARIZA, PARK e COOK, 2001) aos quais tem sido atribuídos efeitos anticarcinogênico, antidiabético, antiaterogênico e modulador da composição corporal (BHATTACHARYA et al., 2006). As principais fontes naturais de CLA são o leite e a carne de ruminantes, uma vez que microorganismos ruminais são capazes de formar CLAs e seus precursores como intermediários da biohidrogenação (PARADIS et al., 2008).

Para a determinação do perfil de ácidos graxos, a cromatografia gasosa mostra-se eficiente, para tanto, esses devem ser, primeiramente, convertidos em derivados apolares, voláteis, como ésteres metílicos. Entretanto, deve-se tomar cuidado ao se decidir por um procedimento apropriado de derivatização, particularmente se o analista está interessado também em determinar ácidos graxos conjugados, tais como CLAs, a fim de evitar sua isomerização (ALDAI et al., 2005).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi de avaliar criticamente metodologias analíticas para caracterizar os isômeros conjugados *c*-9, *t*-11 e *t*-10, *c*-12 do ácido linoleico, identificando o melhor método para a esterificação e a melhor programação por cromatografia gasosa para a separação, identificação e quantificação dos CLAs através de sua análise em suplementos, cortes bovinos e laticínios.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Lipídeos Alimentares

Os lipídeos são compostos solúveis em solventes orgânicos. Os lipídeos alimentares são chamados de gorduras (sólidos) ou óleos (líquidos) indicando o seu estado físico à temperatura ambiente (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2007). Os triacilgliceróis (TAG) correspondem cerca de 95% da composição lipídica da dieta, sendo o restante constituído por outras formas de lipídeos, como fosfolipídeos, ácidos graxos livres, colesterol e fitosteróis (VAZ, 2006). Os lipídeos servem como fonte de energia, além disso, fazem parte da estrutura das membranas celulares. São ligantes dos receptores de superfície das células e também agrupam substâncias que atuam como mediadores das funções celulares (MANCINI-FILHO, 1999).

Os óleos e as gorduras desempenham o papel de carreadores de nutrientes lipossolúveis, como as vitaminas A, D, E, K e carotenoides, auxiliando a absorção destes. Além de seus efeitos nutricionais, os óleos e gorduras proporcionam ao alimento uma melhoria de textura, aparência, sabor e palatabilidade (BADOLATO, 2000). Estudos em animais e humanos mostram uma correlação entre a ingestão de gordura na dieta com a liberação de endorfinas no cérebro, proporcionando uma sensação de bem estar. Este fato pode explicar a dificuldade que algumas pessoas possuem em diminuir a quantidade de gorduras em sua alimentação (HAUMANN, 1998).

Fatores relacionados ao estilo de vida, como a dieta, influenciam no desenvolvimento de vários tipos de enfermidades (PARK e PARIZA, 2007). Diversos estudos mostram a importância quantitativa e qualitativa dos lipídeos da dieta no desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis como doenças cardiovasculares (WARENSJÖ et al., 2008), hipertensão (HE, XU e VAN HORN, 2007), obesidade (OKERE et al., 2006), dislipidemias (LOIS, YOUNG e KUMAR, 2008), diabetes mellitus tipo 2 (HODGE, 2007) e câncer (CHAVARRO et al., 2008; SIERI et al., 2008), sendo que estas doenças estão associadas a maiores taxas de mortalidade no ocidente (DUFFY et al., 2006).

2.1.1 Ácidos Graxos Saturados (AGS)

A ingestão recomendada de ácidos graxos saturados deve ser menor que 10% da energia total diária consumida (WAHRBURG, 2004). As fontes alimentares mais expressivas são produtos de origem animal (manteiga, queijos, leite e carnes), produtos de origem vegetal, como o óleo de coco e óleo de palma, além de produtos industrializados (margarinas, biscoitos, sorvetes, *fast-foods* e outros). O ácido palmítico é o ácido graxo saturado mais abundante na dieta humana. Além deste, outros dois ácidos graxos saturados são encontrados com maior frequência na alimentação: o ácido esteárico e o mirístico (CHONG, SINCLAIR e GUYMER, 2006).

Os AGS, principalmente os que possuem mais de dez átomos de carbonos em sua cadeia, têm sido relacionados ao aumento da concentração sérica de colesterol total, considerado um fator de risco cardiovascular. Tem-se explorado os efeitos dos AGSs na supressão dos receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL-c) no fígado, os quais interferem no metabolismo de lipoproteínas podendo desencadear todo o processo aterosclerótico (FERNANDEZ e WEST, 2005; RUXTON et al., 2007).

2.1.2 Ácidos Graxos *Trans* (AGT)

A hidrogenação parcial de óleos é muito utilizada para produzir gorduras comestíveis com propriedades físicas e de textura específicas (SUNDRAM, FRENCH e CLANDININ, 2003). Neste processo, ocorre predominantemente a formação de AGT monoinsaturados. Entre estes, o principal componente é um isômero do ácido oleico: o ácido elaídico (C18:1 *trans*-9) (MITMESSER e CARR, 2005).

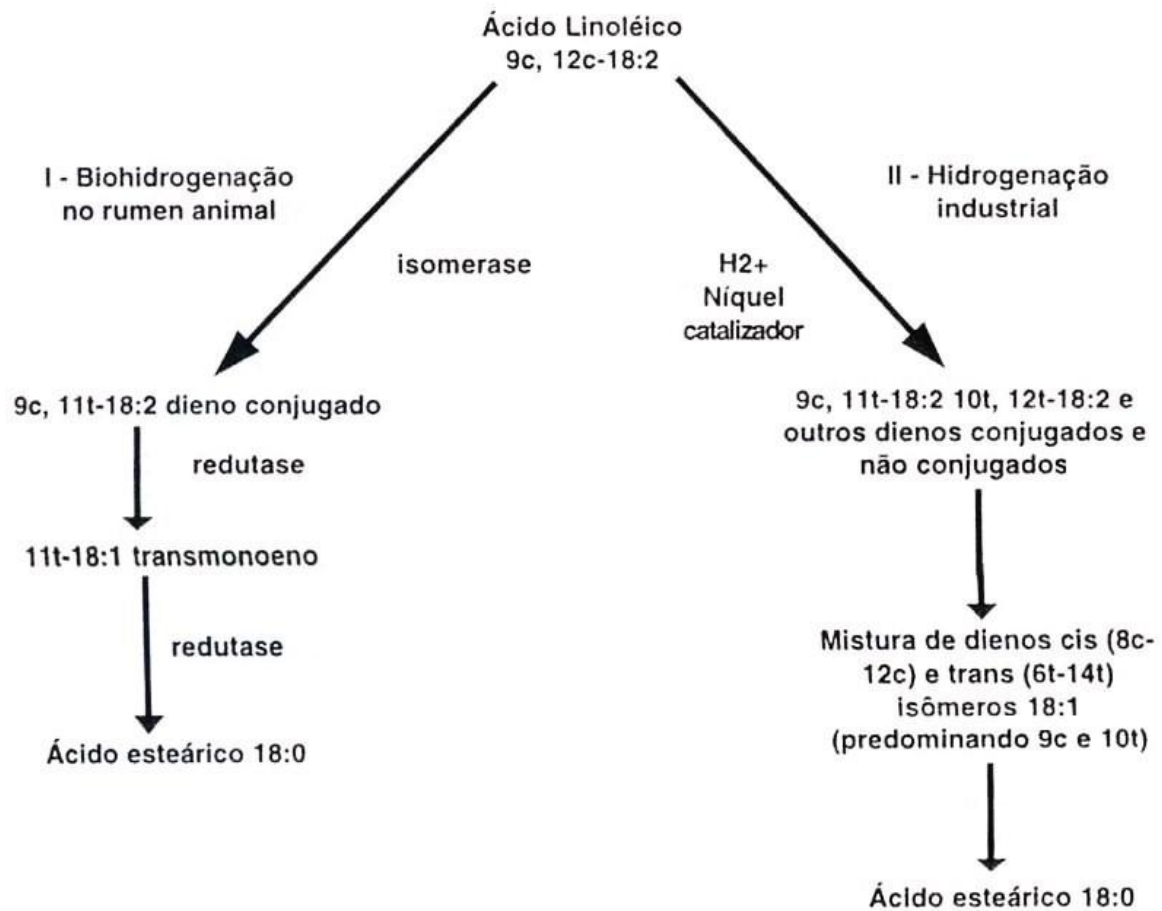


Figura 1 Hidrogenação de ácidos graxos. Adaptado de Mancini-Filho e Chemin (1996).

A gordura vegetal hidrogenada é utilizada no preparo de sorvetes cremosos, chocolates, pães recheados, molhos para salada, sobremesas cremosas, biscoitos recheados, alimentos com consistência crocante (*nuggets*, *croissants*, tortas), bolos industrializados, margarinas duras e alguns alimentos produzidos em redes de *fast-foods*.

Não há consenso na literatura em relação à quantidade máxima permitida de *trans* na dieta, no entanto, recomenda-se que a ingestão desse tipo de AG seja menor do que 1% das calorias totais da dieta (MOZAFFARIAN et al., 2006; WHO, 2003) uma vez que estes ácidos graxos elevam os níveis do LDL-c e reduzem os de lipoproteínas de alta densidade (HDL-c), aumentando assim a razão LDL/HDL. Paralelamente, a *American Heart Association* recomenda que a ingestão diária dos

ácidos graxos saturados e dos ácidos graxos *trans* seja menor que 10% do total das necessidades calóricas do organismo (LICHTENSTEIN et al., 2006).

Outro aspecto importante diz respeito aos isômeros *trans* do ácido linoleico, que competem no processo metabólico com ácidos graxos essenciais. Quando os ácidos graxos *trans* estão presentes em elevados teores, passam a ser substrato alternativo das dessaturases, resultando na formação de eicosanóides sem atividade biológica. Eles podem atuar também como inibidores destas enzimas (MANCINI-FILHO e CHEMIM, 1996; BADOLATO, 2000).

Com a finalidade de rotulagem nutricional o “Food and Drug Administration” (FDA) propôs como definição de ácidos graxos *trans*, ácidos graxos insaturados que contém uma ou mais duplas ligações isoladas (não conjugadas), na posição *trans*. Os ácidos graxos conjugados não são considerados *trans*, apesar de possuírem essa configuração, pois não apresentam efeito sobre a LDL-c como aquele observado com duplas ligações *trans* isoladas (FEDERAL REGISTER, 2003).

Na Dinamarca, a ordem nº 160 de 2003 que regula os teores de ácidos graxos *trans* em alimentos, não inclui na rotulagem nutricional os isômeros *trans* presentes naturalmente em gordura de origem animal (LETH et al., 2006).

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) determinou através da Resolução-RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003, que na rotulagem nutricional, deve também ser declarada a quantidade de gordura *trans* (BRASIL, 2003).

2.1.3 Ácidos Graxos Poliinsaturados

Ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) de cadeia longa têm 20 ou 22 átomos de carbono e quatro a seis duplas ligações *cis* com grupos metileno interrompidos, ordenados em ômega 6 (ω -6) ou ômega (ω -3). Os ácidos graxos de cadeia longa nutricionalmente mais importantes são: araquidônico (ARA; C20:4 ω -6), eicosapentaenóico (EPA; C20:5 ω -3) e ácido docosahexaenóico (DHA; C22:6 ω -3). Estão presentes no organismo como componentes dos fosfolipídeos de membrana em tecidos específicos, além de atuarem como precursores na síntese de diferentes biocompostos como prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Contribuem de

forma benéfica para a manutenção da saúde, particularmente pela redução da incidência de doenças cardiovasculares (SHAMIL e MOREIRA, 2004; VEACH, 2005; VISIOLI e HAGEN, 2007).

Os ácidos graxos α -linolênico (LnA) e linoleico (LA) não são produzidos endogenamente pelo organismo humano e são precursores dos eicosanoides associados ao desenvolvimento cerebral e da retina dos fetos (**Figura 2**). No sistema imunológico, diminuem a resposta à produção de interleucina-1 (IL-1) e 6 (IL-6) e do fator de necrose tumoral (TNF- α); no sistema cardiovascular, apresentam efeitos antitrombóticos, antiarrítmicos, aumentam o tempo de sangramento evitando a aderência plaquetária nas artérias; previnem a aterosclerose, diminuindo a taxa de colesterol total sérica, além da inibição da síntese hepática de triacilgliceróis (HJERKINN et al., 2005).

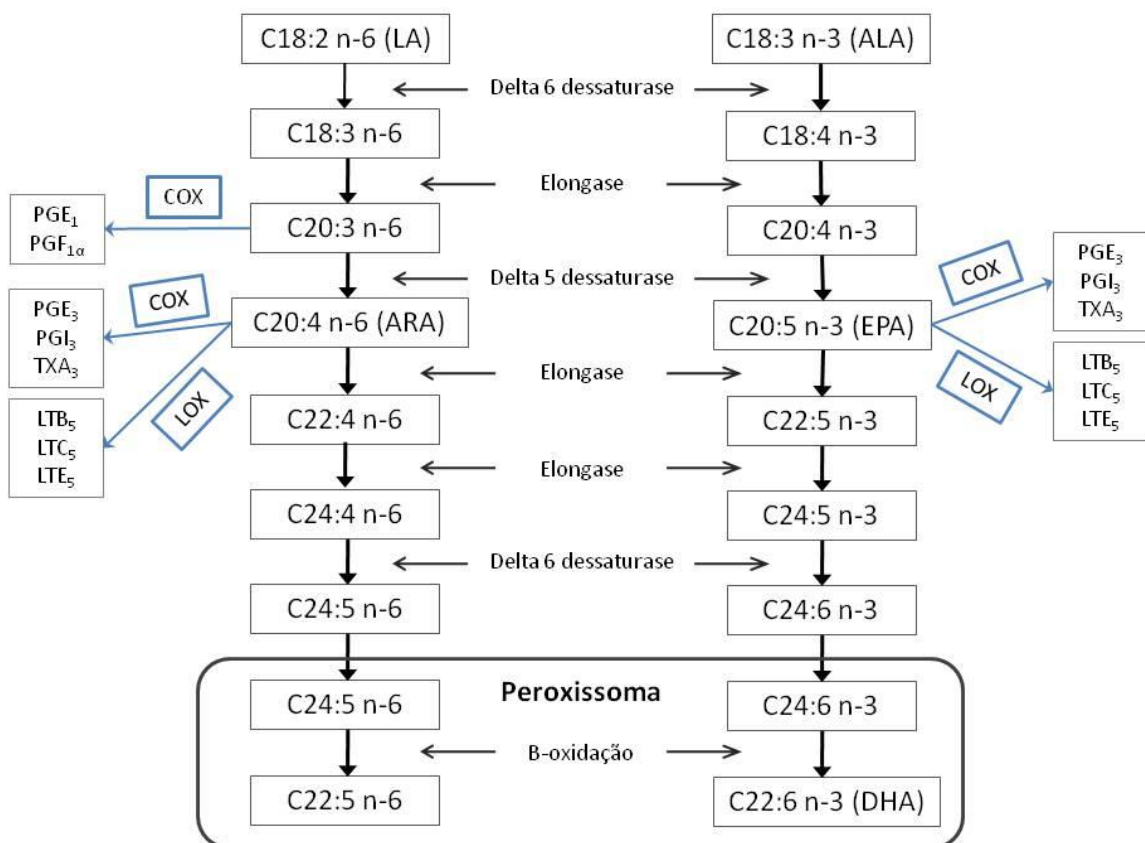


Figura 2 Competência metabólica na formação de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, ômega-6 e ômega-3. Adaptado de (RUSSO, 2009).

2.2 Ácido Linoleico Conjugado (CLA)

Nos anos 70, pesquisadores começaram a estudar a presença de agentes mutagênicos e carcinógenos em alimentos, na esperança de eventualmente usar este conhecimento na prevenção do câncer. Baseado em estudos que mostravam que a carne excessivamente assada contém agentes mutagênicos, Pariza e colaboradores (1985), na Universidade de Wisconsin-Madison, investigaram a correlação entre a formação de agentes mutagênicos, temperatura e tempo cocção, usando carne grelhada. Além dos agentes mutagênicos no extrato da carne, eles encontraram também um composto que teve atividade anti-mutagênica. Este composto foi identificado e chamado de ácido linoleico conjugado (CLA), baseado na sua semelhança com o ácido linoleico (PARK e PARIZA, 2007).

Ácido linoleico conjugado refere-se genericamente a uma classe de isômeros dienoicos conjugados posicionais e geométricos do ácido linoleico (C18:2 ω -6) como mostrado na **Figura 3** (PARIZA, PARK e COOK, 2001). As duplas ligações conjugadas nas configurações *c,t*; *t,c*; *c,c*; e *t,t* se encontram predominantemente nas posições 8 e 10, 9 e 11, 10 e 12, ou 11 e 13, sendo o isômero *cis*-9, *trans*-11 (ácido rumênico; RA), que representa mais de 90% do CLA consumido na dieta (PARIZA, 2002; BHATTACHARYA et al., 2006).

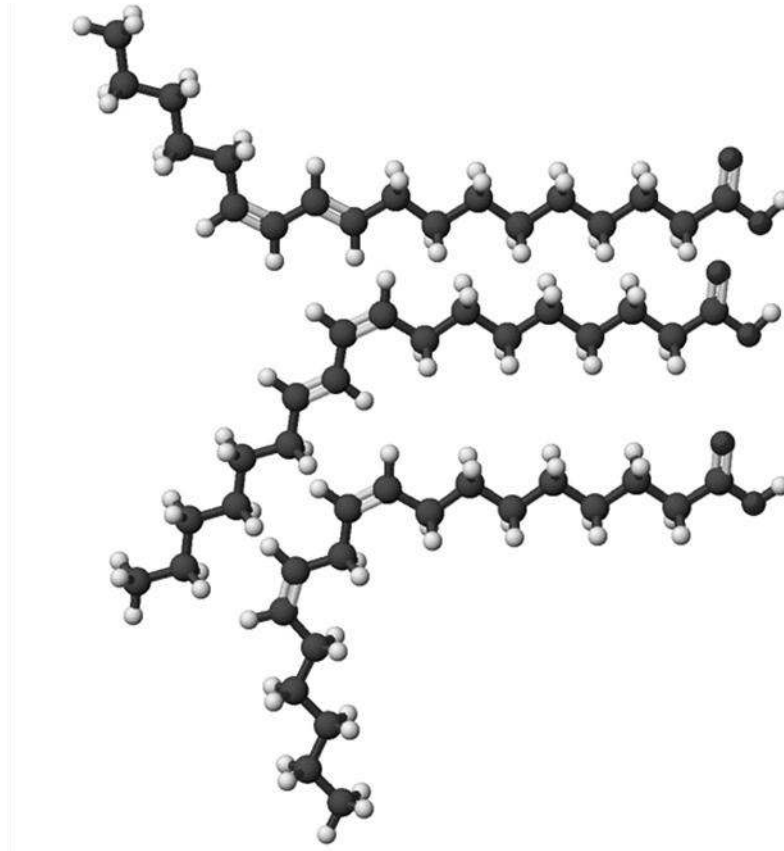


Figura 3 Estrutura dos isômeros *t*-10, *c*-12 CLA; *c*-9, *t*-11 CLA e do *c*-9, *c*-11 ácido linoleico. Adaptado de Pariza, Park e Cook (2001).

2.2.1 Biossíntese

A excessiva alteração dos lípides no rúmen é marcada pela diferença entre o perfil de ácidos graxos da dieta e o perfil dos ácidos graxos que saem do rúmen, uma vez que a composição lipídica das forragens é composta prioritariamente por glicolípides e fosfolípides, nos quais os ácidos graxos predominantes são o linoleico e o linolênico, e a composição de oleaginosas usadas em rações consiste predominantemente de triacilgliceróis que contém ácido oleico e linoleico (BAUMAN et al., 2000, JENKINS et al., 2008). Entretanto, o perfil de ácidos graxos de produtos de origem bovina apresenta predominantemente o ácido palmítico, o esteárico e o oleico (PARADIS et al., 2008; SARRIÉS et al., 2009).

Em um estudo realizado por Booth e Kon. (1935), foi detectada a presença de ácidos graxos com duplas ligações conjugadas na gordura do leite. Kepler et al. (1966) detectou a presença de um intermediário *trans* do ácido linoleico estudando o

mecanismo de biohidrogenação pela bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens*. Uma década depois, Parodi (1977) mostrou que o RA é o principal isômero CLA na gordura do leite. A seqüência de biohidrogenação do ácido linoleico (C18:2) envolve a isomerização a *c*-9, *t*-11 CLA, seguida pela redução a *t*-11 C18:1 e C18:0 (GRIINARI et al., 2000). Outras bactérias podem converter o ácido linoleico em CLAs, como *Lactobacillus*, *Propionibacterium* and *Bifidobacterium* spp (ALDAI et al., 2005).

A formação dos CLAs a partir do ácido linoleico pelo *B. fibrisolvens* no rúmen já estava bem estabelecida, porém não era suficiente para justificar a presença de diferentes isômeros no leite ou carne (KHANAL e DHIMAN, 2004).

Banni et al. (1996) observou que ovelhas leiteiras que apenas pastavam e possuíam um alto aporte de LnA e baixo de LA, apresentavam uma alta concentração de ácido rumênico na gordura do leite. Já em dietas com baixos teores de LA e ricas em PUFAs, segundo Griinari et col. (1998), como óleo de peixe e forragem, observam-se uma elevada concentração de CLAs, mesmo estes não sendo intermediários da biohidrogenação de ácidos graxos poliinsaturados. Contudo, o ácido vacênico (VA) é intermediário de vários PUFAs, estando disponível para a absorção. Desta forma, foi proposto que, parte dos CLAs presentes nos tecidos, tem origem endógena (GRIINARI et al., 1998). Esta síntese endógena do *cis*-9, *trans*-11 CLA acontece pela dessaturação do *trans*-11 C18:1 pela enzima Δ^9 -dessaturase, predominante nas glândulas mamárias e tecido adiposo (BAUMAN et al., 2000) o que pode ser visto na **Figura 4**. Griinari et al. (2000) examinou o potencial de síntese endógena de CLAs a partir do VA. O ácido vacênico foi infundido no estômago de bovinos e avaliada a formação de CLAs no leite. Após três dias, o conteúdo de CLAs no leite teve um aumento de 31%, indicando um mecanismo de síntese endógena nas glândulas mamárias.

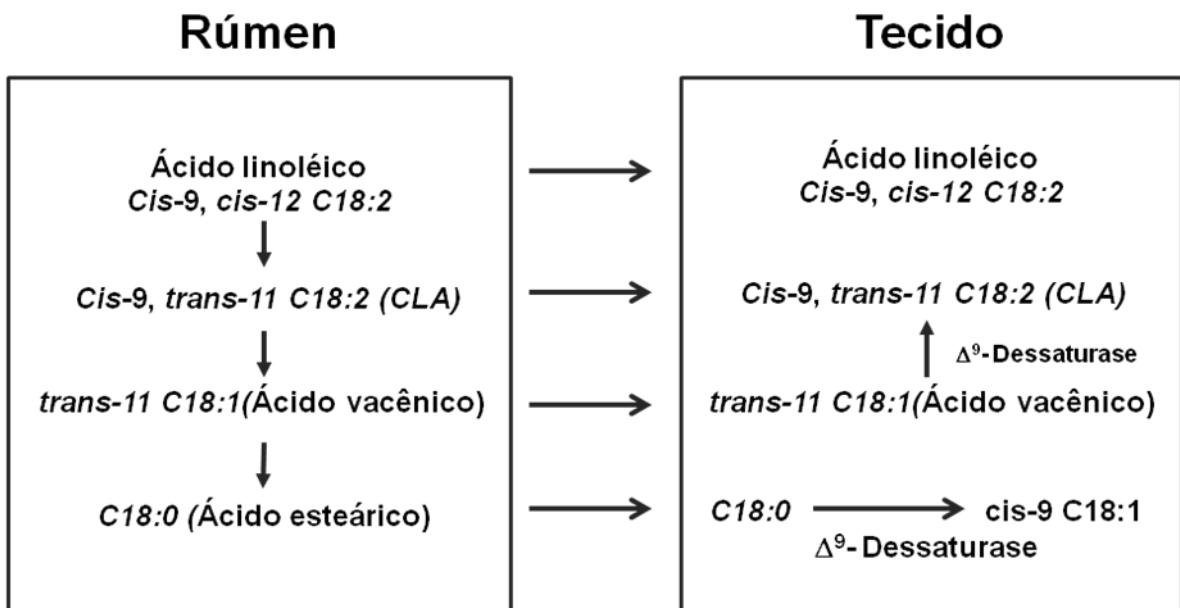


Figura 4 Vias metabólicas de biossíntese do ácido vacênico. Adaptado de Bauman e Griinari (2001).

Os CLAs são quimicamente sintetizados pela isomerização alcalina do ácido linoleico, C18:2 ω -6, ou óleos ricos neste ácido graxo (óleos de girassol ou açafrão) com o uso de diferentes solventes e circunstâncias (KRAMER et al., 2004). Por exemplo, os CLAs produzidos tipicamente para finalidades experimentais consistem nos isômeros *c*-9, *t*-11 (40.8 - 41.1%), no *t*-10, *c*-12 (43.5-44.9%) e no *t*-9, *t*-11 e *t*-10, *t*-12 (4.6-10%). Deve-se notar que algumas preparações comerciais de CLAs contêm isômeros adicionais com duplas ligações conjugadas nas posições 8.10 ou 11.13 (PARIZA, PARK e COOK, 2001).

2.2.2 Ocorrência em Alimentos

Produtos de origem animal contribuem significativamente no total de nutrientes da nossa dieta (BAUMAN et al., 2000). A carne é definida como a musculatura dos animais usada como alimento. Na prática, esta definição está restrita a poucas dúzias das 3000 espécies de mamíferos, mas frequentemente, estão amplamente incluídos, além da musculatura, órgãos como fígado, rins, cérebro e outros tecidos comestíveis (LAWRIE, 2005). A carne é considerada um alimento de alto valor nutricional por apresentar proteínas de alto valor biológico além de micronutrientes como vitaminas A, B₆, B₁₂, D e E e minerais, como ferro, zinco e selênio (BIESALKI, 2005; WILLIAMSON et al., 2005). Apesar de seu

importante papel nutricional, pouco se sabe sobre as possíveis diferenças entre carnes de diferentes espécies, raças e músculos. Existem diferenças no conteúdo de proteínas auxiliares, de aminoácidos livres, de ácidos graxos e de várias outras substâncias em suas características (LAWRIE, 2005).

A gordura está presente em carnes na membrana (como fosfolipídios), gordura intramuscular e gordura subcutânea. O teor lipídico varia muito, dependendo do corte e da forma de limpeza (SCOLLAN et al., 2005). Estudos mostram a redução no consumo de certos tipos de carnes, como bovina e suína, refletindo a percepção individual de risco à saúde (MCCARTHY e HENSON, 2005). Nos últimos 15 anos, suas características nutricionais foram encobertas por fatores negativos de sua composição, como o alto conteúdo de ácidos graxos saturados, colesterol e a associação da carne vermelha ao câncer; estes têm sido apontados como fatores que influenciam na escolha dos consumidores (WALKER et al., 2005; SCOLLAN et al., 2006; FONSECA e SALAY, 2008).

2.2.3 Ações metabólicas

Os efeitos benéficos da suplementação com CLAs incluem a inibição da carcinogênese induzida quimicamente em diversos modelos de roedores, redução da aterosclerose em coelhos e *hamsters*, estimulação do crescimento de ratos e porcos, aumento da perda de gordura corporal de ratos, *hamsters*, porcos, cães e seres humanos (PARIZA, PARK e COOK, 2001).

Segundo Bhattacharya et al. (2006), os benefícios à saúde dos CLAs foram atribuídos principalmente a dois de seus isômeros: *c-9*, *t-11* e *t-10*, *c-12*. A maior parte das atividades de CLAs resulta da interação entre seus dois isômeros principais. Estes isômeros mostraram efeitos sinérgicos, independentes, ou antagônicos (PARK e PARIZA, 2007).

Trabalhos experimentais têm demonstrado que os CLAs apresentam algumas atividades, como inibidores da proliferação e indutores da morte de várias células tumorais de linhagens derivadas de câncer de mama, próstata, adenocarcinoma de pulmão e hepatoma (YAMASAKI et al., 2005).

Estudos com animais sugerem uma redução no aparecimento precoce de lesões ateroscleróticas quando suplementados com CLAs, embora, em sua maioria, a redução das lesões tenha sido modesta. Grande parte desses trabalhos utilizou a mistura quimicamente preparada de isômeros de CLAs (MCLEOD et al., 2004).

Alguns estudos demonstraram que a diminuição da gordura corporal é um efeito da suplementação com CLAs em animais (PARIZA, PARK e COOK, 2001; WANG e JONES, 2004). Vários mecanismos de ação foram propostos em consequência dos estudos feitos em culturas de células ou modelos animais, sugerindo que os CLAs poderiam modificar o metabolismo de energia. Outro estudo mostra que há diminuição na ingestão alimentar. Entretanto, as alterações foram pequenas, e assim não se pode explicar a diminuição na deposição de gordura. Desta forma, não há um consenso geral entre os pesquisadores (ZABALA et al., 2006). Nesses estudos, o efeito antiobesidade foi confirmado em ratos suplementados com CLAs. Este efeito foi marcante principalmente nos ratos suplementados com *t*-10, *c*-12 CLA. (AKAHOSHI, et al., 2003; ZABALA, et al., 2006).

Tratamentos com *t*-10, *c*-12 CLA, em animais, mostraram que eles alteram a composição corporal, reduzindo a deposição de lipídeos em adipócitos e aumentando a massa magra do organismo. Entretanto, outros trabalhos com *t*-10, *c*-12 CLA apontam que este é indutor de hiperinsulinemia em ratos (GRANLUND et al., 2005).

Segundo Park et al. (1999), os músculos esqueléticos dos ratos suplementados com CLAs (*c*-9, *t*-11 e *t*-10, *c*-12 numa proporção de 50% cada) apresentaram uma atividade elevada da carnitina palmitoil transferase (CPT). Baseado nestes resultados, foi proposto que o mecanismo fisiológico, na redução da gordura corporal nos ratos pelo CLA, envolveu a inibição do armazenamento de gordura nos adipócitos, a elevada β -oxidação no músculo esquelético e um aumento na massa do músculo esquelético.

A maior parte dos estudos com humanos não demonstram uma alteração na composição corporal (BHATTACHARYA et al., 2006) Em estudo com mulheres obesas, Sahin, Uyanik e Inanc (2008) mostrou que a suplementação com 1,8 g de CLA por dia durante oito semanas não apresentou redução da gordura corporal ou

aumento de massa muscular. Larsen et al. (2006) mostrou que a suplementação com 3,4g de CLA por dia durante um ano não preveniu a recuperação de peso em mulheres obesas após perda de peso.

Devido ao uso indiscriminado de CLAs por praticantes de atividade física que buscam aumento de massa muscular e redução da gordura corporal, a ANVISA publicou em 29.03.2007, a resolução RE nº 833, que determina a apreensão, em todo território nacional, de todos os lotes do produto Ácido Linoleico Conjugado (CLA). Nenhuma empresa no Brasil tem autorização da ANVISA para fabricar, importar ou comercializar esse produto (ANVISA, 2007).

2.3 Aspectos Analíticos

2.3.1 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (CG) tem sido o método escolhido para a análise de ácidos graxos há meio século. Alguns anos depois da primeira separação de ácidos graxos por James e Martin (1952), a CG tem sido largamente aplicada como ferramenta para pesquisas na área de ácidos graxos e representa hoje um dos avanços mais significativos no estudo da importância dos ácidos graxos dietéticos para a saúde humana (SEPPÄNEN-LAAKSO e HILTUNEN, 2002).

A cromatografia gasosa mostra-se eficiente para a análise do perfil de ácidos graxos de fontes variadas devido a sua rapidez, resolução e sensibilidade. Os ácidos graxos devem ser, primeiramente, convertidos em derivados apolares, voláteis, como ésteres metílicos. Entretanto, deve-se tomar cuidado ao se decidir por um procedimento apropriado de derivatização, particularmente se o analista está interessado também em determinar ácidos graxos conjugados, tais como CLAs. O melhor método ou combinação dos métodos dependerá quase inteiramente da natureza da amostra a ser analisada (ALDAI et al., 2005).

Na avaliação dos ácidos graxos em alimentos, três etapas analíticas são críticas para se obter resultados fidedignos e poder se interpretar o significado dos lípidos na alimentação, os quais estão elucidados a seguir.

A extração dos lipídeos dos alimentos é considerada uma etapa fundamental na avaliação dos ácidos graxos. O método de extração dos lipídeos totais mais

comumente usado baseia-se nas diferenças de solubilidade dos lipídeos nos solventes: água e metanol (fase aquosa) e clorofórmio (fase orgânica). Os lipídeos, por apresentarem maior coeficiente de partição em solventes orgânicos, são mais solúveis em clorofórmio (MARTINS et al., 2002).

Para análises da composição de ácidos graxos, os lípides complexos devem ser pré-tratados, de modo que os ácidos graxos livres e esterificados estejam disponíveis para a determinação. Os ácidos graxos são convertidos em derivados menos polares e voláteis por vários métodos de derivatização. A formação de ésteres alquílicos (os ésteres de metil, de etil, propil ou butil) é o tipo de padrão mais usado na análise de ácidos graxos, em particular na preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos. A preparação dos derivados de ésteres metílicos de ácidos graxos é realizada em uma reação simples, porém torna-se mais complicada quando a derivatização é de ácidos graxos conjugados. A presença de uma ligação conjugada nos ácidos graxos faz com que estes não sejam viáveis para as técnicas mais comuns de esterificação empregadas para a análise do ácido graxo, como por catalisador ácido. Por exemplo, os CLAs podem ser facilmente isomerizados pelo trifluoreto de boro (BF_3), mudando, assim, o perfil dos isômeros originais (ALDAI, 2005). A metilação por catalisador alcalino é reconhecidamente melhor para esterificação destes lipídeos, quando o catalisador ácido pode causar a isomerização dos CLAs (CHRISTIE, SÉBÉDIO e JUANEDA, 2001).

Geralmente, não há nenhum método ótimo em todas as situações e para todos os tipos de amostras. Os pesquisadores devem saber a natureza de sua amostra e selecionar o método apropriado (PARK et al., 2002).

A metilação por catalisadores ácidos vem sendo extensivamente utilizada para análises de ácidos graxos conjugados em leites e outros produtos. Dentre os catalisadores utilizados por vários grupos incluem-se o HCl /metanol, o BF_3 /metanol, e o H_2SO_4 /metanol. Alguns autores reconhecem que a isomerização de ácidos graxos conjugados ocorre durante a metilação por catalisadores ácidos e recomendam que as reações com BF_3 /metanol ou HCl /metanol sejam feitas a temperatura ambiente para a redução desta isomerização. O metóxido de sódio (NaOCH_3) vem sendo utilizado como catalisador na metilação, mas os ácidos graxos livres não são metilados sob estas condições (KRAMER et al., 1997). Na **Figura 5**

podemos observar que cada passo da reação é reversível, no entanto, com excesso de álcool, o equilíbrio é deslocado e a reação pode ser considerada completa (AUED-PIMENTEL, 2007).

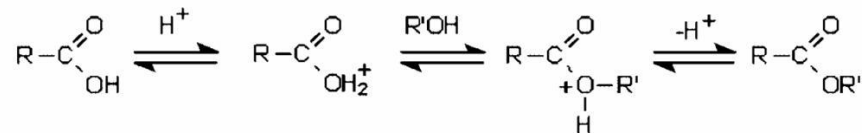


Figura 5 Mecanismo de esterificação ácida.

Com o intuito de abreviar o tempo de reação, pode ser feita uma transesterificação direta que envolve catalisadores alcalinos ou ácidos, tendo os lipídeos com um único reagente. A reação ocorre, por exemplo, para ácidos graxos ligados por ligação éster, ou seja, triacilgliceróis e fosfolipídeos, em um processo no qual o álcool de origem, isto é, o glicerol, seja deslocado do lipídeo por outro álcool em excesso molar sob condição anidra (ALDAI et al., 2005).

A transesterificação ocorre com refluxo e na presença de catalisadores ácidos (HCl, H₂SO₄, BF₃), como mostrado na **Figura 6**, ou básicos (NaOH, KOH, metóxido de sódio) em que todos os passos são reversíveis, e, novamente na presença de excesso de álcool, o equilíbrio é deslocado para a formação do novo éster (AUED-PIMENTEL, 2007).

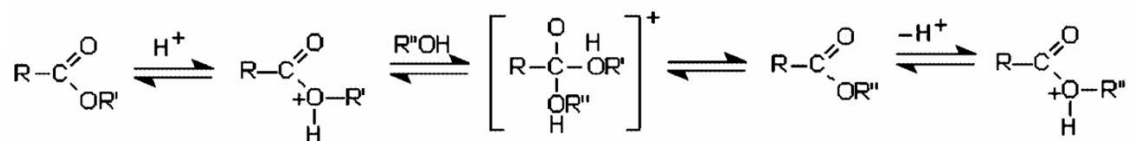


Figura 6 Mecanismo de transesterificação ácida.

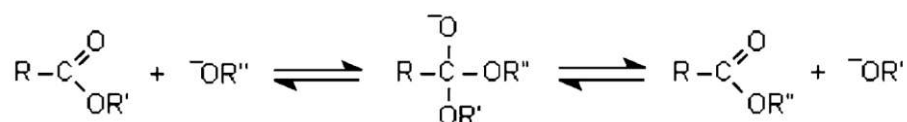


Figura 7 Mecanismo de esterificação alcalina.

A transesterificação em meio básico (**Figura 7**) ocorre em condições de temperatura mais amenas e tempo reduzido. Entretanto, os ácidos graxos livres não

são susceptíveis ao ataque nucleofílico de alcoóis ou bases, e, portanto, não ocorre a esterificação em condições de catálise básica. A reação de transesterificação ocorre satisfatoriamente com excesso de álcool e na ausência de água. O emprego de KOH metanólico não é recomendado devido à ocorrência de hidrólise e formação de ácido graxo livre. Este hidróxido é substituído, com vantagem, por alcoolatos formados pela reação de metal alcalino com sódio ou potássio e álcool (ex: metóxido de sódio) (BOBBIO e BOBBIO, 2003).

2.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectrometria de ressonância magnética nuclear é uma das ferramentas mais valiosas para a determinação estrutural de compostos orgânicos, contribuindo para o estabelecimento do esqueleto da molécula. Para a obtenção dos espectros de ressonância, submete-se a amostra a um campo magnético externo, de forma que determinados núcleos, que apresentam um movimento magnético nuclear (núcleos com número de massa ímpar como ^1H , ^{13}C , ^{31}P , por exemplo), possam entrar em ressonância com a radiofrequência aplicada, absorvendo a energia eletromagnética em frequências características para cada núcleo, conforme sua vizinhança química. Os dados obtidos com este método espectroscópico são muito importantes para a elucidação estrutural de praticamente todas as classes de produtos naturais. Os espectros de RMN de próton (RMN ^1H) e de carbono (RMN ^{13}C) são os mais utilizados, e a sua interpretação permite caracterizar o número e o tipo de átomos de H e C, em função da localização e do desdobramento dos sinais correspondentes à absorção da energia eletromagnética. A grande variedade de técnicas disponíveis de RMN permite identificar a proximidade espacial ou mesmo a conectividade de alguns átomos em particular, auxiliando dessa maneira, na montagem das diferentes partes da molécula (SIMÕES et al., 1999).

A espectroscopia da ressonância magnética nuclear é uma das técnicas analíticas mais poderosas disponíveis ao químico orgânico. O campo elevado de instrumentos RMN de 400-600 megahertz já está disponível em muitos laboratórios químicos modernos. Aparelhos mais modernos de RMN apresentam uma elevada sensibilidade e definição utilizando *softwares* especiais podendo executar diversas análises espectrais de correlação diferente. A espectroscopia de RMN do próton e do carbono de moléculas orgânicas permitiu a realização de estudos estruturais,

cinéticos, e do equilíbrio dos compostos individuais, puros ou em misturas. (LIE KEN JIE, 2001). A análise RMN mostra-se precisa para a análise de ácidos graxos puros que dão base às análises de composição lipídica de margarinas, manteiga, óleo de peixe, sementes, e óleos vegetais. Em particular, a espectroscopia ^{13}C RMN, com sua escala de deslocamento químico mais larga, mostrou-se útil em fornecer um aprofundamento no conhecimento da natureza da mistura lipídica qualitativa e quantitativamente (PAJUNEN, KOSKELA e HOPIA, 2008).

3 OBJETIVOS

Tendo em vista a importância biológica dos isômeros conjugados do ácido linoleico (CLAs) e frente às dificuldades analíticas na identificação dos mesmos, este projeto teve como objetivos:

3.1 Objetivo geral

Avaliar criticamente metodologias analíticas para caracterizar os isômeros conjugados *c*-9, *t*-11 e *t*-10, *c*-12 do ácido linoleico.

3.2 Objetivos específicos

1. Identificar o melhor método para a esterificação dos CLAs em produtos comerciais;
2. Identificar a melhor programação por cromatografia gasosa para a separação e identificação dos CLAs em produtos comerciais;
3. Avaliar produtos comerciais que contenham isômeros do ácido linoleico na sua composição;
4. Analisar os CLAs em cortes bovinos e laticínios.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Amostras

Foi analisada uma amostra comercial de suplemento de ácido linoleico conjugado, o Tonalin[®] CLA TG 80, da Cognis, quatro cortes bovinos (alcatra, fraudinha, maminha e picanha) fracionados em músculo e capa de gordura, creme de leite, iogurte integral e três tipos de queijo (mussarela, prato e provolone) que foram adquiridos no comércio da cidade de São Paulo.

4.2 Extração de lipídeos da carne

Os lipídeos das carnes foram extraídos a frio com clorofórmio:metanol (2:1) pelo método de Folch, Lees e Stanley (1957). Foram pesados 2 gramas de músculo ou 1 grama de capa de gordura, em triplicata, e homogeneizadas com 10 mL de metanol por 1 minuto, em seguida adicionou-se 20 mL de clorofórmio e homogeneizou por mais 2 minutos. Após isso, a mistura foi filtrada a vácuo em funil de buchner, e o resíduo homogeneizado novamente com 30 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1) por 3 minutos. A mistura foi filtrada novamente e lavada com 30 mL de uma mistura de clorofórmio:metanol (2:1). A mistura foi transferida para uma proveta e foi adicionado $\frac{1}{4}$ do volume de uma solução de cloreto de potássio ($KCl_{(aq)}$) 0,88%; a mistura foi agitada e deixada em repouso para a separação das fases. A fase aquosa foi descartada e na fração apolar, foi adicionada $\frac{1}{4}$ do volume de uma solução de metanol: água (1:1), seguida de agitação e repouso para a separação das fases. A fração polar foi descartada e a apolar filtrada em sulfato de sódio anidro ($Na_2SO_{4(s)}$) em um balão e evaporado em rotaevaporador. A gordura foi ressuspensa em 5 mL para posterior análise gravimétrica e esterificação.

4.3 Extração de lipídeos do creme de leite e do iogurte

Os lipídeos do creme de leite e do iogurte foram extraídos pelo método 996.06 da AOAC (2002). Foi pesada uma quantidade do queijo homogeneizado e triturado contendo de 50 - 100 mg de gordura. Em seguida, foi adicionado 50 mg de ácido pirogálico, 1 mL de padrão interno (p.i.) e algumas pérolas de vidro. Foi

adicionado 1 mL de etanol, 1 mL de água e 2 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH) 30%, misturando-se bem entre as adições. A mistura foi levada ao *shaker* 70 - 80°C, sob agitação moderada por 20 minutos, com agitação no Vortex a cada 5 minutos e então foi resfriada até temperatura ambiente. Foi adicionado 12 mL de éter etílico nos tubos, seguido de agitação por 1 minuto. Adicionou-se mais 12 mL de éter de petróleo, com agitação por mais 1 minuto. Os tubos foram centrifugados a 600 g por 5 minutos até a fase superior estar clara. A fase superior foi transferida para um balão e evaporada em rotaevaporador. A gordura foi ressuspensa em 5 mL de clorofórmio para posterior análise gravimétrica e esterificação.

4.4 Extração de lipídeos do queijo

Os lipídeos dos queijos foram extraídos pelo método 996.06 da AOAC (2002). Foi pesada uma quantidade do queijo homogenizado e triturado contendo de 50 - 100 mg de gordura. Em seguida, foi adicionado 50 mg de ácido pirogálico, 1 mL de p.i. e algumas pérolas de vidro. Foi adicionado 1 mL de etanol, 1 mL de água e 2 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH) 30%, misturando-se bem entre as adições. A mistura foi levada ao *shaker* 70 - 80°C, sob agitação moderada por 20 minutos, com agitação no Vortex a cada 10 minutos e então foi resfriada até temperatura ambiente. Após adição de 5 mL de ácido clorídrico (HCl) 12 M, a mistura foi levada ao banho fervente por mais 20 minutos, agitando em Vortex a cada 10 minutos. As amostras foram novamente resfriadas até temperatura ambiente. Foi adicionado 12 mL de éter etílico nos tubos, seguido de agitação por 1 minuto. Adicionou-se mais 12 mL de éter de petróleo, com agitação por mais 1 minuto. Os tubos foram centrifugados a 600 g por 5 minutos até a fase superior estar clara. A fase superior foi transferida para um balão e evaporada em rotaevaporador. A gordura foi ressuspensa em 5 mL de clorofórmio para posterior análise gravimétrica e esterificação.

4.5 Métodos de Esterificação

Foram testados três métodos de esterificação descritos a seguir.

4.5.1 Esterificação com trifluoreto de boro metanólico (BF₃/metanol)

Foram dissolvidos 50 mg de lipídeos em 1 mL de tolueno em tubo de ensaio com tampa de rosca, adicionados de 3 mL de trifluoreto de boro metanólico anidro 14% e aquecido a 50°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,1 mL de ácido acético glacial e 5 mL de água. Os ésteres metílicos foram extraídos duas vezes com 5 mL de hexano e retirados com pipeta de Pasteur. Após filtração em sulfato de sódio anidro, o hexano foi evaporado em rotaevaporador. A amostra foi ressuspensa em hexano para análise por cromatografia gasosa (CHRISTIE, SÉBÉDIO e JUANÉDA, 2001).

4.5.2 Esterificação com metóxido de sódio metanólico (NaOCH₃/metanol)

Foram dissolvidos 50 mg de lipídeos em 1 mL de tolueno em tubo de ensaio com tampa de rosca, adicionados de 2 mL de metóxido de sódio metanólico anidro 0,5 M e aquecido a 50°C por 10 minutos. Em seguida, adicionaram-se 0,1 mL de ácido acético glacial e 5 mL de água. Os ésteres metílicos foram extraídos duas vezes com 5 mL de hexano e retirados com pipeta de Pasteur. Após filtração em sulfato de sódio anidro, o hexano foi evaporado em rotaevaporador. A amostra foi ressuspensa em hexano para análise por cromatografia gasosa (CHRISTIE, SÉBÉDIO e JUANÉDA, 2001).

4.5.3 Esterificação combinada com metóxido de sódio metanólico (NaOCH₃/metanol), seguida de trifluoreto de boro metanólico (BF₃/metanol)

Foram dissolvidos 50 mg de lipídeos em 1 mL de tolueno em tubo de ensaio com tampa de rosca, adicionado de 2 mL de metóxido de sódio metanólico anidro 0,5 M e aquecido a 50°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 3 mL de trifluoreto de boro metanólico anidro 14% e aquecido a 50°C por mais 10 minutos. Foi adicionado 0,1 mL de ácido acético glacial e 5 mL de água. Os ésteres metílicos foram extraídos duas vezes com 5 mL de hexano e retirados com pipeta de Pasteur. Após filtração em sulfato de sódio anidro, o hexano foi evaporado em rotaevaporador. A amostra foi ressuspensa em hexano para análise por cromatografia gasosa (CHRISTIE, SÉBÉDIO e JUANÉDA, 2001).

4.6 Condições Cromatográficas

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás GC-17A, da marca Shimadzu, equipado com injetor automático AOC-20 e Workstation Class-GC10. A coluna capilar de sílica fundida utilizada será uma SP-2560 (biscianopropil polisiloxana) de 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 μm de espessura do filme da fase estacionária. Foram utilizadas três condições cromatográficas:

4.6.1 CLA01 (KRAMER et al., 1997)

A coluna foi aquecida a 70°C por 4 minutos, seguida de aquecimento de 13°C/min até 175°C e mantida a essa temperatura por 27 minutos. Posteriormente foi aquecida a 4 °C/min até 215°C e a temperatura mantida por 31 minutos. As temperaturas do injetor e do detector eram respectivamente de 250 e 275°C, fluxo de Hélio de 1 mL/min e *split* de 1/50.

4.6.2 CLA02 (CORDAIN et al., 2001)

A coluna foi aquecida a 100°C por 4 minutos, seguida de aquecimento de 10°C/min até 175°C e mantida a essa temperatura por 30 minutos. Posteriormente, foi aquecida a 5°C/min até 220°C e a temperatura mantida por 15,9 minutos. As temperaturas do injetor e do detector eram respectivamente de 215 e 250°C, fluxo de Hélio de 1 mL/min e *split* de 1/50.

4.6.3 CLA03 (BAUBLITS et al., 2007)

A coluna foi aquecida a 162°C por 32 minutos, seguida de aquecimento de 1,4°C/min até 195°C e mantida a essa temperatura por 15 minutos. Posteriormente, foi aquecida a 2°C/min até 235°C e a temperatura mantida por 5 minutos. A temperatura do injetor e do detector era de 250°C, fluxo de Hélio de 1 mL/min e *split* de 1/50.

4.7 Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância de carbono do isômero isolado *cis*-9, *trans*-11 CLA, do Tonalin® CLA TG 80 e FFA 80, foram obtidos em espectrômetro Bruker DPX

300 equipado com um probe de 5 mm multinuclear a 25°C, operado a 75,5 MHz para os espectros de RMN ^{13}C . As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (0,6 mL) e injetadas em tubo de RMN. Foi utilizado tetrametilsilano (TMS), como padrão de referência. A quantificação foi feita a partir da relação entre a média de áreas de carbonos isolados pela área do pico de cada isômero.

4.8 Determinação da Gordura

A determinação de gordura foi realizada por gravimetria. De cada extrato lipídico, foi tomada uma alíquota de 1,5 mL, que foi adicionada em vidro relógio previamente tarado. O solvente foi evaporado em capela de exaustão, e, em seguida, os vidros relógios contendo o lipídeo foram secos em estufa a 105°C, até peso constante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultado dos processos de esterificação para a amostra Tonalin® TG 80 da Cognis

Laudo técnico que acompanha o produto:

Tabela 1 Perfil de ácidos Graxos do Tonalin TG 80 no laudo técnico

Ácidos Graxos	Especificações (%)	Laudo Cognis
C14:0	0	0
C16:0	<4	1,2
C18:0	<4	2,7
C18:1	10-20	13,0
C18:2 c-9,c-12	<3	0,2
c-9,t-11 CLA	37,5-42	40,0
t-10,c-12 CLA	37,5-42	39,0
Total CLA	78-84	81,4

Tabela 2 Perfil de ácidos Graxos do Tonalin TG 80 pelo método CLA01

CLA01.MET	NaOCH ₃ Média ± Desvio	Mista Média ± Desvio	BF ₃ Média ± Desvio
C16:0	1,27 ± 0,02	1,27 ± 0,01	1,25 ± 0,00
C18:0	2,55 ± 0,03 ^b	2,55 ± 0,01 ^b	2,35 ± 0,03 ^a
C18:1	13,56 ± 0,08 ^b	13,57 ± 0,04 ^b	12,79 ± 0,27 ^a
C18:2	0,25 ± 0,01 ^a	0,29 ± 0,04 ^a	0,28 ± 0,05 ^a
C18:2 (9c,11t)	40,28 ± 0,05 ^a	40,14 ± 0,04 ^a	40,83 ± 0,10 ^b
C18:2 (10t,12c)	40,37 ± 0,09 ^a	40,60 ± 0,03 ^a	40,41 ± 0,18 ^a
C18:2 (9t,11t)	0,98 ± 0,02 ^a	1,31 ± 0,03 ^b	1,67 ± 0,02 ^c
Total CLA	81,63 ± 0,15 ^a	82,05 ± 0,07 ^a	82,91 ± 0,27 ^b

Média seguida de mesma letra não difere significativamente, segundo ANOVA, seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.1.1 Métodos de esterificação

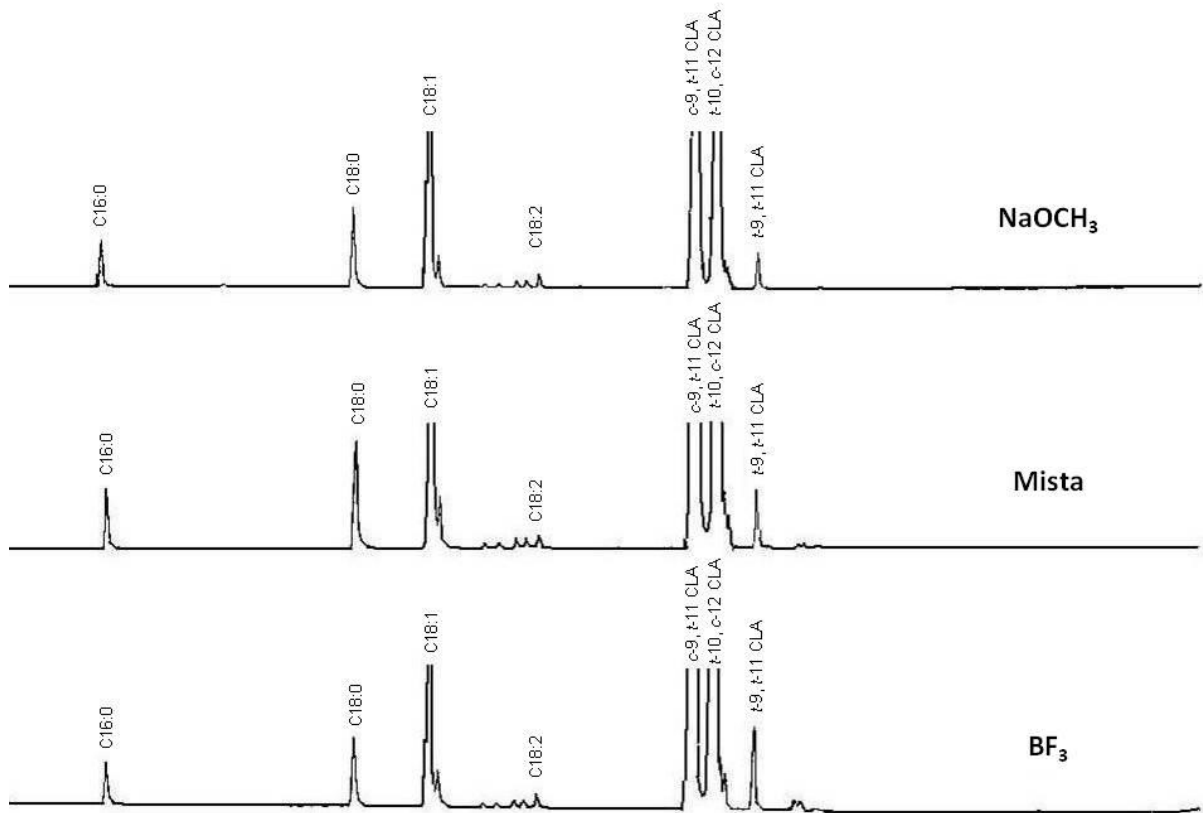


Figura 8 Aumento na formação do estereoisômero t-9,t-11 a partir do c-9,t-11 CLA sob os diferentes métodos de esterificação. Esterificação alcalina (NaOCH₃), mista (NaOCH₃ + BF₃) e ácida (BF₃).

A primeira etapa antes da análise cromatográfica de lipídeos é a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos (CHRISTIE, DOBSON e ADLOF, 2007). Neste processo, a composição dos ácidos graxos conjugados pode ser bastante afetada pelo catalisador usado na metilação (KRAMER et al., 1997).

Desde sua introdução como um método rápido da preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, o BF₃ vem sendo largamente utilizados como um bom catalisador para a transesterificação (ALDAI et al., 2005), porém alguns estudos mostram que o BF₃ deve ser evitado quando é necessário analisar ácidos graxos com duplas ligações conjugadas, pois este pode alterar sua configuração,

convertendo isômeros *cis, trans* ou *trans, cis* em isômeros *trans, trans* como mostrado na **Tabela 2** e **Figura 8** (KRAMER et al., 1997; YAMASAKI et al., 1999; PARK et al., 2002; ALDAI et al., 2005). A esterificação utilizando apenas o NaOCH₃/metanol não provoca a isomerização dos ácidos graxos conjugados, porém não é capaz de metilar ácidos graxos livres (KRAMER et al., 1997). Esta esterificação deve se dar em condições estritamente anidras, pois a presença de água causa saponificação (ALDAI et al., 2005). Devido às limitações destes catalisadores, a combinação dos dois vem sendo sugerida, pois todos os ácidos graxos são esterificados, tendo uma redução na formação de estereoisômeros (KRAMER et al., 1997). Estes dados puderam ser confirmados nas análises fazendo uso destes três métodos de esterificação, onde foi possível observar a maior formação do isômero *trans, trans* na esterificação com o BF₃, quando comparado à esterificação com NaOCH₃. Já pelo método de esterificação mista, estes teores variaram, entre os métodos com apenas um dos catalisadores.

5.1.2 Métodos cromatográficos

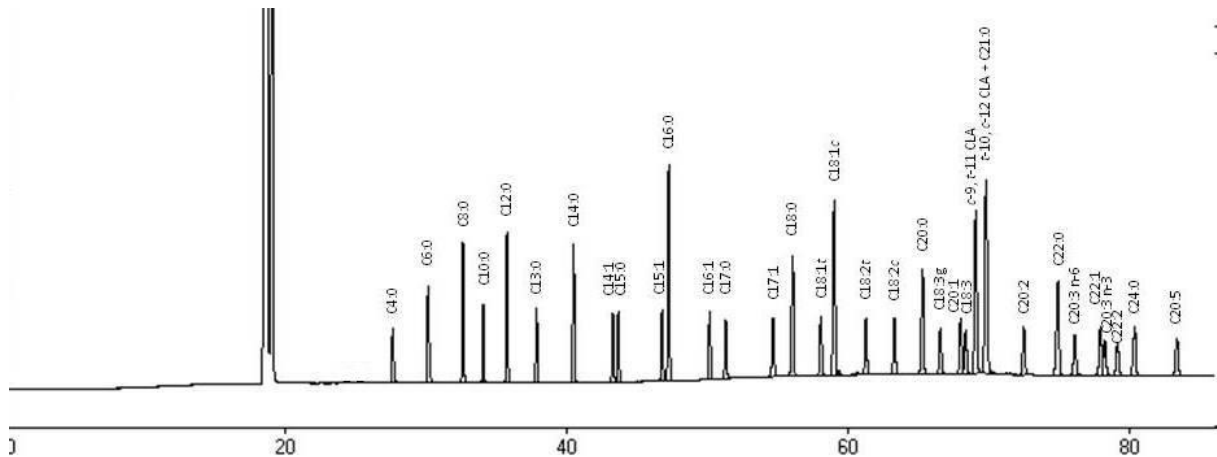


Figura 9 Cromatograma padrão sigma 18919 adicionado de CLA pelo método CLA01.

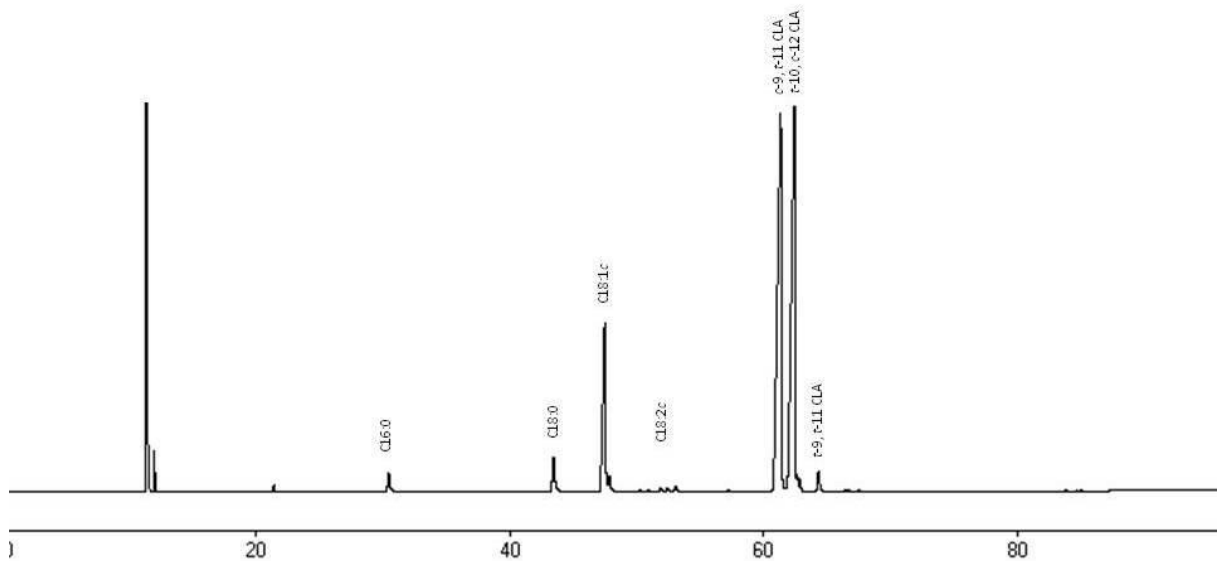


Figura 10 Cromatograma Tonalin TG 80 esterificado com NaOCH_3 pelo método CLA01.

Usando uma programação de temperatura de 70 - 215°C (CLA01) foi possível obter uma boa separação de ácidos graxos de cadeia curta (C4:0) a ácidos poliinsaturados de cadeia longa. Entretanto, Houve uma sobreposição do C21:0 e *t*-10,*c*-12 CLA.

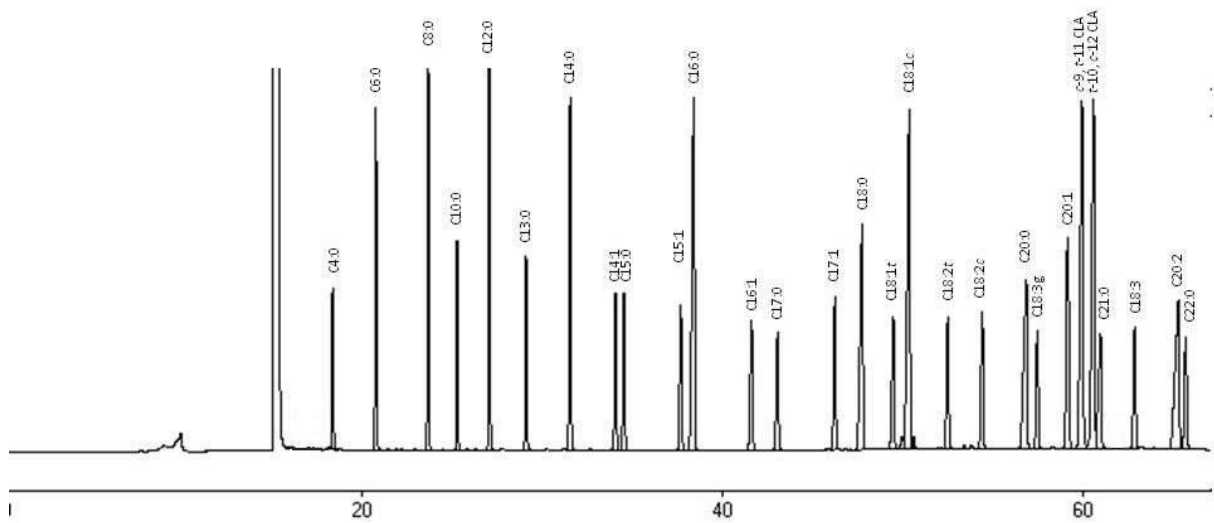


Figura 11 Cromatograma padrão sigma 18919 adicionado de CLA pelo método CLA02.

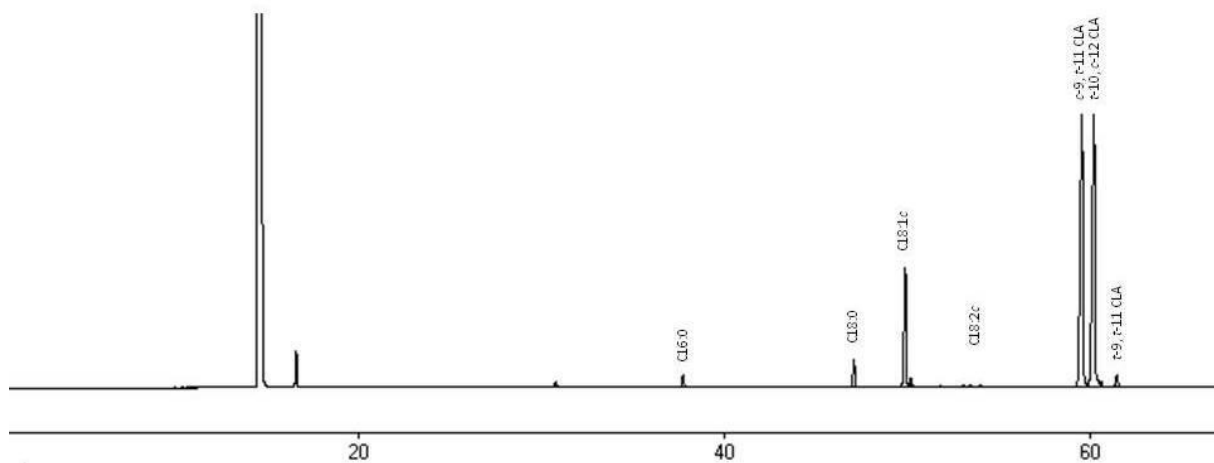


Figura 12 Cromatograma Tonalin TG 80 esterificado com NaOCH_3 pelo método CLA02.

Usando uma programação de temperatura de 100 - 220°C (CLA02), por um tempo mais curto foi possível obter uma boa separação de ácidos graxos de cadeia curta (C4:0), ácidos da família C18. Entretanto, o tempo de corrida não foi suficiente para a identificação de todos os ácidos poliinsaturados de cadeia longa.

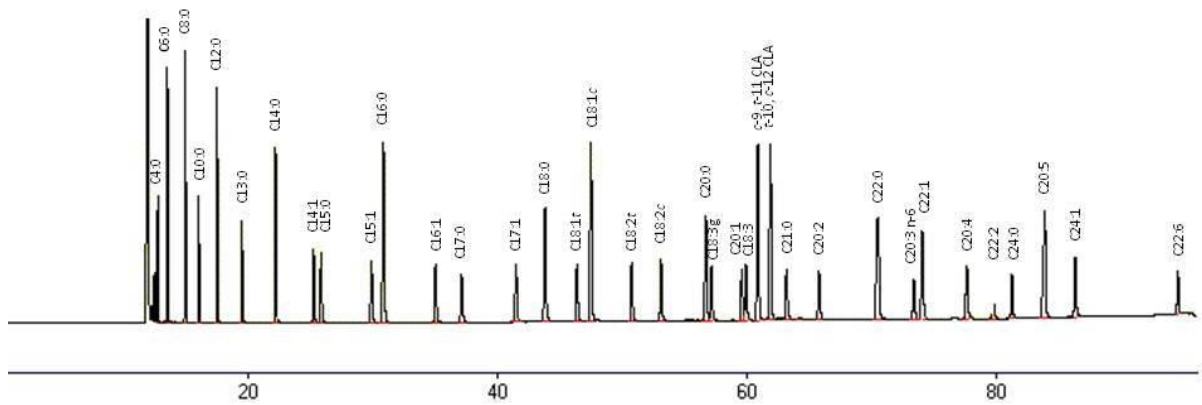


Figura 13 Cromatograma padrão sigma 18919 pelo método CLA03.

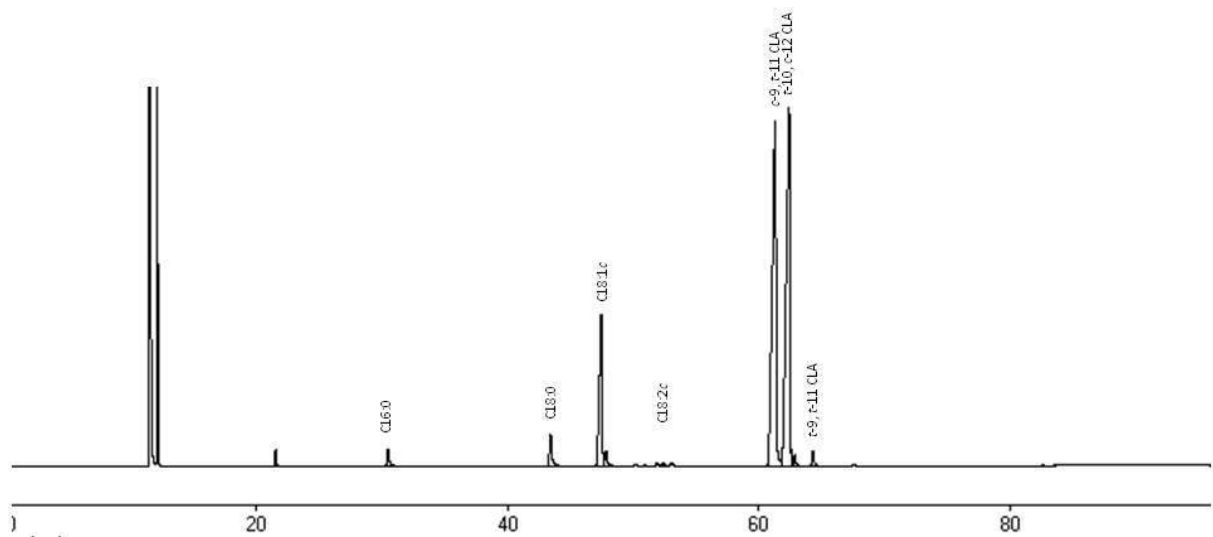


Figura 14 Cromatograma Tonalin TG 80 esterificado com NaOCH_3 pelo método CLA03.

Usando uma programação de temperatura de 162 - 235°C (CLA03), foi possível obter uma separação de ácidos graxos de cadeia curta (C4:0) a ácidos poliinsaturados de cadeia longa com uma boa separação na região dos isômeros *cis* e *trans* do C18:1, C18:2 e CLAs, foco do estudo, sem que houvessem sobreposições.

Dessa forma, para as análises das carnes, foram utilizados os métodos de esterificação alcalina e condições cromatográficas segundo método de Baublits et al. (2007).

5.2 Identificação e quantificação por Ressonância Magnética Nuclear do carbono

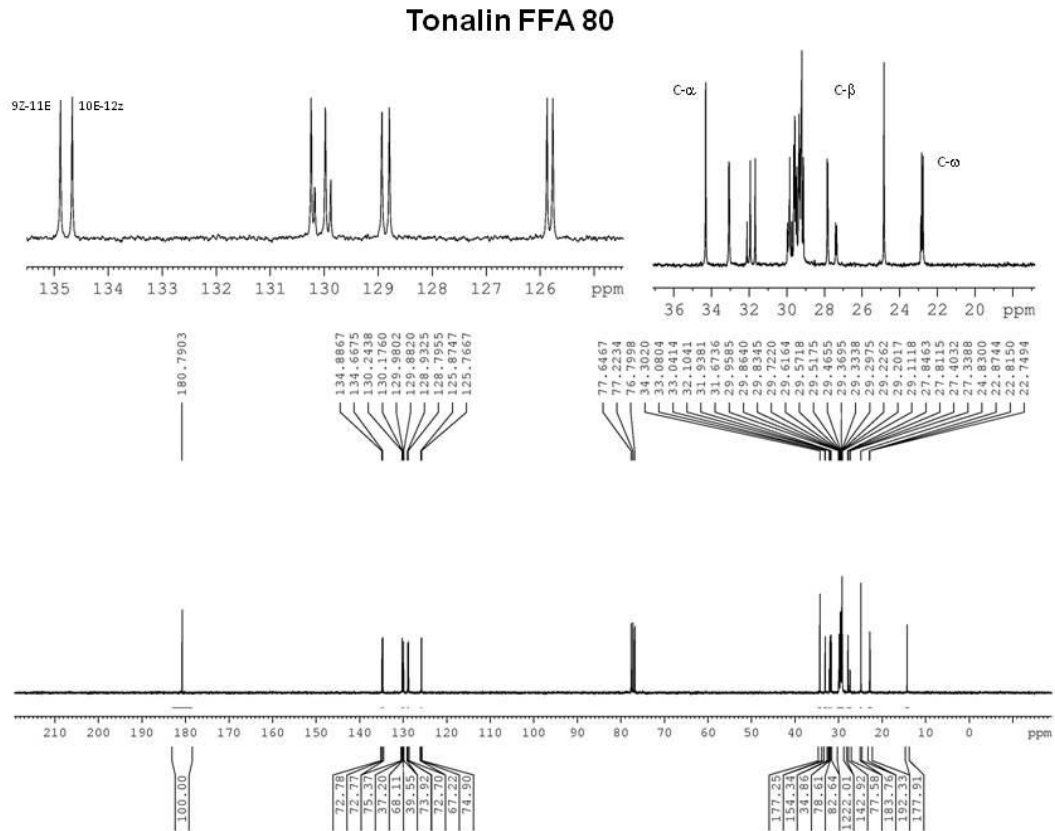


Figura 15 Espectro de RMN ^{13}C do Tonalin FFA 80.

5.2.1 Cálculo da concentração do Tonalin FFA 80

$$\text{Área do Carbono total} = \frac{\text{Área do C-}\alpha + \text{Área do C-}\beta + \text{Área do C-}\omega}{3}$$

3

$$\text{Área do Carbono total} = \frac{177,2493 + 183,7570 + 177,9068}{3} = 179,6377$$

3

Percentual em massa de 9z,11e – CLA no Tonalin FFA 80

$$\% = \frac{\text{Área do 9z-11E}}{\text{Área do carbono total}} \times 100$$

$$\% = \frac{72,7780}{179,6377} \times 100 = 40,51\%$$

Percentual em massa de 10e,12z - CLA no Tonalin FFA 80

$$\% = \frac{72,7661}{179,6377} \times 100 = 40,51\%$$

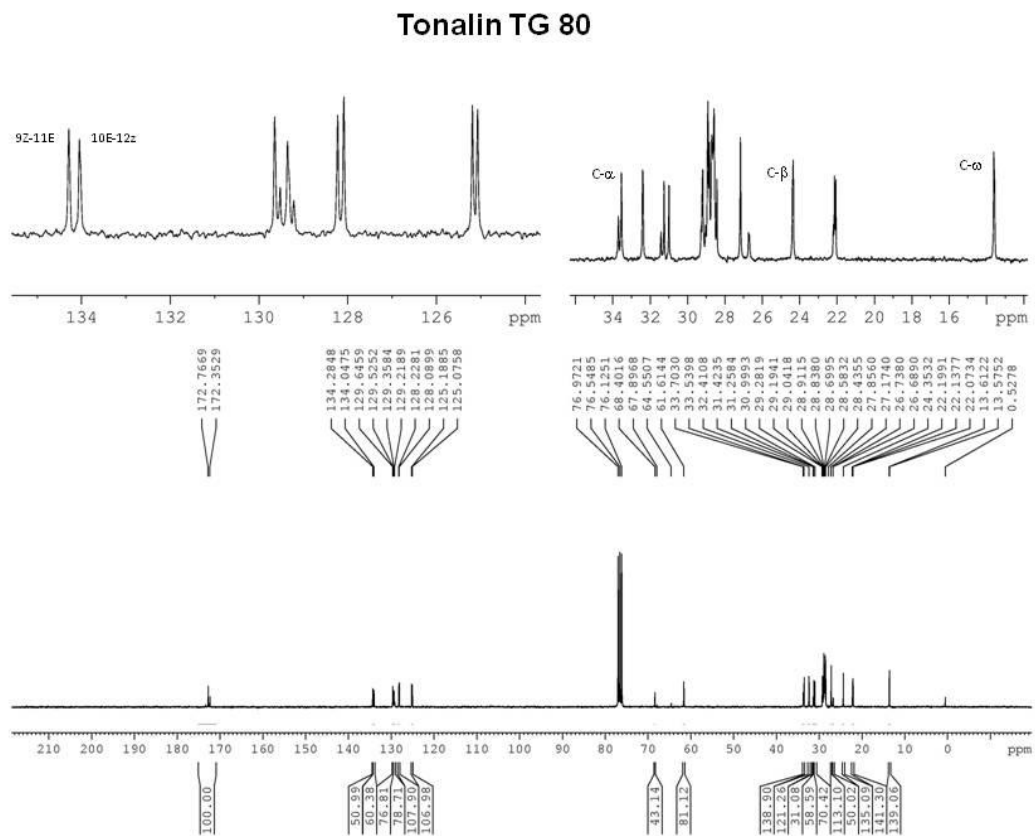


Figura 16 Espectro de RMN ¹³C do Tonalin TG 80.

5.2.2 Cálculo da concentração do Tonalin TG 80

$$\text{Área do Carbono total} = 138,8955 + 135,0948 + 139,0550 = 137,6818$$

3

Percentual em massa de 9z,11e – CLA no Tonalin TG 80

$$\% = \frac{50,9922}{100} \times 100 = 37,04\%$$

137,6818

Percentual em massa de 10e,12z - CLA no Tonalin TG 80

$$\% = \frac{60,3780}{100} \times 100 = 43,85\%$$

137,6818

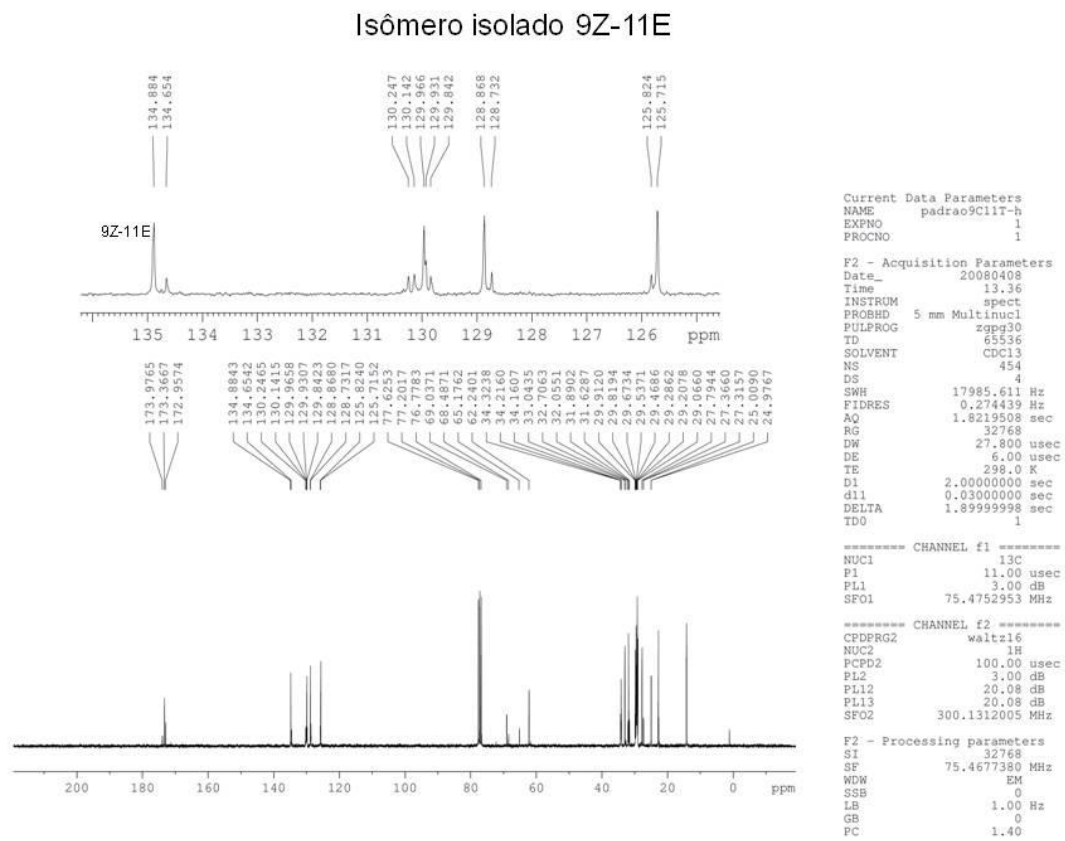


Figura 17 Espectro de RMN ^{13}C do isômero isolado c-9,t-11 CLA.

A identificação dos isômeros pode ser feita com base em outros trabalhos encontrados da literatura (DAVIS, MCNEILL, CASWELL, 1998; LIE KEN JIE, 2001). Os valores encontrados pela análise de RMN ^{13}C , a partir do Tonalin FFA 80 foram equivalentes aos encontrados por cromatografia gasosa, já os valores encontrados a partir do Tonalin TG 80 encontram-se um pouco deslocados, porém esta ainda é uma excelente ferramenta para a identificação destes isômeros.

5.3 Gravimetria das carnes

Tabela 3. Teor de gordura das carnes

	Alcatra	Cupim	Fraudinha	Maminha	Picanha
	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio
Músculo	2,60 ± 0,60 ^{ab}	2,98 ± 0,11 ^{abc}	8,23 ± 0,37 ^d	2,78 ± 0,44 ^{abc}	2,81 ± 0,84 ^{bc}
Capa de gordura	44,79 ± 0,88 ^b	41,27 ± 2,96 ^{ab}	67,87 ± 0,28 ^d	61,81 ± 3,24 ^c	57,76 ± 1,03 ^c

Média seguida de mesma letra não difere significativamente, segundo ANOVA, seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$)

Os teores de gordura intramusculares encontrados neste trabalho estão compatíveis com os relatados no estudo de SCOLLAN et al., (2006) onde estes teores estão em torno de 2 - 5% em cortes magros, como no caso do presente estudo em que o músculo e a capa de gordura foram avaliados separadamente. Os teores de gordura na capa de gordura variaram entre 44,8 - 67,9%, estes valores encontram-se abaixo do valor encontrado por ENSER et al., (1996) de 70%.

5.4 Perfil de ácidos graxos das carnes

Tabela 4 Perfil de ácidos graxos dos músculos em g/100 g de lipídeos

	Alcatra	Cupim	Fraudinha	Maminha	Picanha
	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio
C10:0	0,00 ± 0,00 ^b	0,23 ± 0,02 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,05 ± 0,04 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
C12:0	0,20 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,08 ^a	0,16 ± 0,04 ^a	0,09 ± 0,16 ^a
C14:0	7,70 ± 0,12 ^a	3,93 ± 0,11 ^c	4,55 ± 0,06 ^b	3,13 ± 0,01 ^d	3,70 ± 0,12 ^c
C16:0	46,87 ± 0,29 ^a	26,41 ± 0,25 ^c	27,91 ± 0,27 ^b	26,22 ± 0,27 ^c	26,30 ± 0,84 ^c
C18:0	20,80 ± 0,59 ^a	18,31 ± 0,29 ^b	16,31 ± 0,20 ^c	17,27 ± 0,89 ^{bc}	13,98 ± 0,50 ^d
C20:0	0,20 ± 0,00 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,04 ± 0,07 ^b	0,13 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
C22:0	0,00 ± 0,00 ^b	0,22 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,30 ± 0,07 ^a	0,15 ± 0,14 ^a
Σ AGS	78,63 ± 0,24 ^a	53,08 ± 0,53 ^a	50,69 ± 37,16 ^a	49,12 ± 1,19 ^a	46,29 ± 0,55 ^a
C14:1	2,67 ± 0,12 ^a	0,61 ± 0,03 ^d	0,95 ± 0,03 ^c	0,59 ± 0,04 ^d	1,19 ± 0,07 ^b
C16:1	8,39 ± 0,24 ^a	3,45 ± 0,16 ^d	3,97 ± 0,04 ^c	3,47 ± 0,07 ^d	5,07 ± 0,10 ^b
C17:1	1,20 ± 0,03 ^a	0,73 ± 0,14 ^c	0,73 ± 0,01 ^c	0,83 ± 0,11 ^b	1,03 ± 0,04 ^{ab}
C18:1	4,24 ± 0,33 ^d	34,91 ± 2,49 ^c	40,30 ± 0,14 ^a	37,37 ± 0,37 ^c	38,77 ± 0,63 ^b
C20:1	0,92 ± 0,12 ^a	0,83 ± 0,04 ^a	0,45 ± 0,39 ^a	0,98 ± 0,07 ^a	0,92 ± 0,19 ^a
Σ AGM	17,42 ± 0,18 ^b	41,34 ± 2,64 ^{ab}	46,67 ± 27,36 ^a	44,94 ± 0,32 ^a	48,04 ± 0,14 ^a
C18:2 C	1,87 ± 0,02 ^b	2,37 ± 0,15 ^{ab}	1,52 ± 0,05 ^b	3,44 ± 0,55 ^a	3,08 ± 0,86 ^a
Σ AGP	1,87 ± 0,02 ^b	2,78 ± 0,26 ^{ab}	1,76 ± 1,78 ^b	4,36 ± 0,77 ^a	3,53 ± 1,01 ^{ab}
C18:1 T	0,00 ± 0,00 ^a	1,36 ± 2,35 ^a	0,19 ± 0,02 ^a	0,45 ± 0,59 ^a	1,46 ± 0,57 ^a
C18:2 T	0,61 ± 0,01 ^a	0,50 ± 0,03 ^a	0,16 ± 0,16 ^{bc}	0,46 ± 0,14 ^{ac}	0,15 ± 0,14 ^b
Σ AGT	0,61 ± 0,01 ^a	1,86 ± 2,33 ^a	0,34 ± 0,33 ^a	0,91 ± 0,53 ^a	1,60 ± 0,71 ^a
CLA	1,48 ± 0,02 ^a	0,94 ± 0,01 ^a	0,53 ± 0,03 ^{bc}	0,67 ± 0,03 ^{ac}	0,54 ± 0,06 ^b

Média seguida de mesma letra não difere significativamente, segundo ANOVA, seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 5 Perfil de ácidos graxos dos músculos em mg/100 g de amostra

	Alcatra	Cupim	Fraudinha	Maminha	Picanha
	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio
C10:0	0,00 ± 0,00 ^b	7,04 ± 0,43 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	1,50 ± 1,31 ^b	0,00 ± 0,00 ^b
C12:0	5,24 ± 1,37 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	8,05 ± 6,97 ^a	4,80 ± 0,95 ^a	4,17 ± 7,22 ^a
C14:0	200,50 ± 54,12 ^b	118,71 ± 6,57 ^{bc}	382,69 ± 2,19 ^a	96,41 ± 13,74 ^c	143,02 ± 43,24 ^{bc}
C16:0	1219,05 ± 320,02 ^b	797,11 ± 26,77 ^b	2345,63 ± 20,70 ^a	808,87 ± 121,19 ^b	1013,45 ± 290,09 ^b
C18:0	537,74 ± 126,19 ^b	552,72 ± 19,96 ^b	1371,12 ± 40,35 ^a	534,43 ± 97,18 ^b	542,00 ± 169,01 ^b
C20:0	5,10 ± 1,26 ^a	4,90 ± 0,12 ^a	3,38 ± 5,85 ^a	4,14 ± 0,71 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
C22:0	0,00 ± 0,00 ^b	6,63 ± 0,46 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^b	9,20 ± 2,47 ^a	6,96 ± 6,52 ^{ab}
Σ AGS	2041,67 ± 520,70 ^b	1601,80 ± 41,46 ^b	4261,47 ± 80,53 ^a	1516,47 ± 240,86 ^b	1793,27 ± 549,31 ^b
C14:1	69,93 ± 20,54 ^a	18,52 ± 1,33 ^b	79,55 ± 1,17 ^a	18,16 ± 1,71 ^b	45,85 ± 12,67 ^a
C16:1	218,96 ± 61,44 ^b	104,20 ± 6,35 ^c	333,54 ± 2,22 ^a	106,81 ± 13,43 ^c	196,02 ± 58,09 ^{bc}
C17:1	31,26 ± 8,73 ^b	22,25 ± 4,43 ^b	61,44 ± 0,48 ^a	25,44 ± 4,72 ^b	39,58 ± 11,13 ^b
C18:1	108,71 ± 21,10 ^c	1055,56 ± 109,03 ^b	3388,02 ± 51,64 ^a	1151,34 ± 160,88 ^b	1506,86 ± 479,35 ^b
C20:1	24,44 ± 8,72 ^a	25,27 ± 1,43 ^a	37,80 ± 32,73 ^a	29,94 ± 3,44 ^a	34,47 ± 9,62 ^a
Σ AGM	453,31 ± 120,50 ^c	1249,64 ± 119,52 ^b	3923,16 ± 75,97 ^a	1383,87 ± 185,59 ^b	1862,28 ± 574,93 ^b
C18:2 C	48,56 ± 13,02 ^c	71,61 ± 6,25 ^c	128,10 ± 1,99 ^a	105,72 ± 21,45 ^{ab}	114,89 ± 35,62 ^{ab}
Σ AGP	48,56 ± 13,02 ^c	84,04 ± 9,51 ^b	147,62 ± 33,73 ^{ab}	134,16 ± 29,81 ^{ab}	132,31 ± 45,01 ^{ab}
C18:1 T	0,00 ± 0,00 ^a	39,35 ± 68,16 ^a	15,72 ± 2,13 ^a	12,23 ± 15,07 ^a	60,28 ± 35,27 ^a
C18:2 T	15,78 ± 4,19 ^a	15,19 ± 1,43 ^a	13,28 ± 13,50 ^a	14,24 ± 5,74 ^a	6,71 ± 6,43 ^a
Σ AGT	15,78 ± 4,19 ^a	54,55 ± 67,10 ^a	28,99 ± 15,51 ^a	26,47 ± 11,09 ^a	66,99 ± 41,69 ^a
CLA	38,55 ± 10,44 ^b	28,45 ± 1,14 ^{ab}	44,93 ± 3,32 ^{ac}	20,66 ± 3,35 ^{ab}	20,90 ± 6,93 ^c

Média seguida de mesma letra não difere significativamente, segundo ANOVA, seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.5 Perfil de ácidos graxos das capas de gordura

Tabela 6 Perfil de ácidos graxos das capas de gordura em g/100 g de lipídeos

	Alcatra	Cupim	Fraudinha	Maminha	Picanha
	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio
C10:0	0,00 ± 0,00 ^d	0,27 ± 0,02 ^a	0,16 ± 0,00 ^b	0,08 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^d
C12:0	0,14 ± 0,00 ^b	0,13 ± 0,00 ^b	0,20 ± 0,00 ^a	0,16 ± 0,04 ^{ab}	0,00 ± 0,00 ^c
C14:0	4,96 ± 0,01 ^b	3,90 ± 0,11 ^c	4,70 ± 0,04 ^{bc}	3,96 ± 0,72 ^c	7,37 ± 0,04 ^a
C16:0	30,64 ± 0,06 ^b	24,70 ± 0,07 ^d	23,72 ± 0,17 ^e	26,27 ± 0,31 ^c	44,31 ± 0,20 ^a
C18:0	13,50 ± 0,37 ^c	25,65 ± 0,05 ^a	10,12 ± 0,21 ^d	13,76 ± 2,32 ^c	19,16 ± 0,22 ^b
C20:0	0,15 ± 0,00 ^b	0,24 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,00 ^b	0,15 ± 0,01 ^b	0,24 ± 0,00 ^a
C22:0	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,18 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Σ AGS	51,25 ± 0,32 ^c	58,68 ± 0,11 ^b	41,30 ± 0,56 ^e	46,41 ± 1,43 ^d	74,86 ± 0,48 ^a
C14:1	1,83 ± 0,09 ^b	0,42 ± 0,01 ^c	1,86 ± 0,02 ^b	1,31 ± 0,59 ^b	3,30 ± 0,00 ^a
C16:1	5,73 ± 0,16 ^b	2,76 ± 0,01 ^c	5,21 ± 0,02 ^b	0,90 ± 0,04 ^d	10,51 ± 0,45 ^a
C17:1	0,77 ± 0,01 ^d	0,67 ± 0,01 ^e	1,15 ± 0,01 ^c	3,69 ± 0,02 ^a	1,98 ± 0,01 ^b
C18:1	33,72 ± 0,15 ^b	33,36 ± 0,15 ^b	46,30 ± 0,67 ^a	39,80 2,04	3,69 ± 0,02 ^c
C20:1	0,64 ± 0,01 ^a	0,67 ± 0,00 ^a	0,88 ± 0,02 ^a	0,56 ± 0,97 ^a	1,02 ± 0,03 ^a
Σ AGM	43,83 ± 0,39 ^c	37,89 ± 0,14 ^d	55,40 ± 0,67 ^a	48,16 ± 2,47 ^b	20,50 ± 0,48 ^e
C18:2 C	1,12 ± 0,03 ^a	1,57 ± 0,02 ^a	1,20 ± 0,06 ^a	1,98 ± 1,35 ^a	1,92 ± 0,00 ^a
Σ AGP	1,12 ± 0,03 ^a	1,57 ± 0,02 ^a	1,20 ± 0,06 ^a	2,28 ± 1,88 ^a	1,92 ± 0,00 ^a
C18:1 T	3,59 ± 0,07 ^a	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	1,40 ± 0,24 ^b	0,00 ± 0,00 ^c
C18:2 T	0,42 ± 0,00 ^b	0,78 ± 0,07 ^a	0,54 ± 0,06 ^b	0,51 ± 0,10 ^b	0,82 ± 0,00 ^a
Σ AGT	4,01 ± 0,07 ^a	0,78 ± 0,07 ^c	0,54 ± 0,06 ^c	1,91 ± 0,34 ^b	0,82 ± 0,00 ^c
CLA	0,94 ± 0,03 ^b	1,09 ± 0,01 ^b	1,55 ± 0,01 ^{ab}	1,24 ± 0,50 ^b	1,90 ± 0,01 ^a

Média seguida de mesma letra não difere significativamente, segundo ANOVA, seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 7 Perfil de ácidos graxos das capas de gordura em g/100 g de amostra

	Alcatra	Cupim	Fraudinha	Maminha	Picanha
	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio
C10:0	0,00 ± 0,00 ^d	0,27 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,00 ^b	0,06 ± 0,02 ^c	0,00 ± 0,00 ^d
C12:0	0,06 ± 0,00 ^b	0,13 ± 0,00 ^a	0,14 ± 0,00 ^a	0,11 ± 0,03 ^a	0,00 ± 0,00 ^c
C14:0	2,24±0,03 ^a	3,90±0,11 ^a	3,19±0,04 ^a	2,97±1,20 ^a	4,00±1,04 ^a
C16:0	13,84±0,13 ^b	24,70±0,07 ^a	16,11±0,14 ^{ab}	19,60±6,02 ^{ab}	24,04±6,30 ^{ab}
C18:0	6,10±0,20 ^b	25,65±0,05 ^a	6,87±0,15 ^b	10,12±2,61 ^b	10,49±2,56 ^b
C20:0	0,07 ± 0,00 ^b	0,24 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,00 ^b	0,11 ± 0,04 ^b	0,10 ± 0,09 ^b
C22:0	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,11 ^a	0,00 ± 0,00 ^a
Σ AGS	23,16±0,34 ^e	58,68±0,11 ^a	28,05±0,40 ^d	34,48±2,39 ^c	46,76±0,17 ^b
C14:1	0,83±0,04 ^{ab}	0,42±0,01 ^b	1,26±0,01 ^{ab}	1,01±0,62 ^{ab}	1,77±0,50 ^a
C16:1	2,59±0,06 ^b	2,76±0,01 ^{ab}	3,54±0,01 ^{ab}	3,63±1,61 ^{ab}	5,57±1,73 ^a
C17:1	0,35 ± 0,01 ^b	0,67 ± 0,01 ^{ab}	0,78 ± 0,01 ^{ab}	0,68 ± 0,23 ^{ab}	1,06 ± 0,30 ^a
C18:1	15,23±0,17 ^{ab}	33,36±0,15 ^a	31,44±0,45 ^{ab}	16,33±13,52 ^{ab}	9,90±13,16 ^b
C20:1	0,29 ± 0,01 ^b	0,67 ± 0,00 ^a	0,60 ± 0,01 ^a	0,52 ± 0,17 ^a	0,52 ± 0,21 ^a
Σ AGM	19,28±0,22 ^c	37,89±0,14 ^a	37,63±0,45 ^a	22,56±0,10 ^b	12,81±0,34 ^d
C18:2 C	0,50±0,01 ^b	1,57±0,02 ^a	0,81±0,04 ^{ab}	1,39±0,81 ^{ab}	1,05±0,26 ^{ab}
Σ AGP	0,50±0,01 ^a	1,57±0,02 ^a	0,81±0,04 ^a	1,58±1,25 ^a	1,20±0,00 ^a
C18:1 T	1,62±0,04 ^a	0,00±0,00 ^c	0,00±0,00 ^c	0,91±0,18 ^b	0,26±0,44 ^c
C18:2 T	0,19±0,00 ^c	0,78±0,07 ^a	0,37±0,04 ^{bc}	0,37±0,14 ^{bc}	0,44±0,13 ^b
(AGT	1,81±0,04 ^a	0,78±0,07 ^c	0,37±0,04 ^d	1,28±0,15 ^b	0,51±0,00 ^d
CLA	0,43±0,02 ^a	1,09±0,01 ^a	1,05±0,01 ^a	0,95±0,55 ^a	1,02±0,29 ^a

Média seguida de mesma letra não difere significativamente, segundo ANOVA, seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os ácidos graxos saturados predominantes foram o ácido mirístico (C14:0), o ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0), monoinsaturados palmitoleico (C16:1) e oleico (C18:1) e poliinsaturado o ácido linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12). Estes resultados estão de acordo com estudos de (SCOLLAN et al., 2006; ALFAIA et al., 2009; FERNANDES et al., 2009).

Os ácidos graxos *trans* encontrados nos músculos ficaram entre 0,3% na fraudinha e 1,86% no cupim, sendo o isômero predominante o ácido vacênico (*t*-11 C18:1), um precursor do ácido rumênico. Estes resultados estão próximos aos valores apresentados por SARRIÉS, et al. (2009) em que os teores variaram de 1,57 - 8,0% e abaixo dos relatados por ALFAIA et al. (2009), nos quais a autora mostrou teores em torno de 3,2% de AGT na gordura intramuscular. Na capa de gordura, os teores ficaram entre 0,54% na fraudinha e 4,01% na alcatra.

Os teores de CLAs, presentes nas carnes, encontrados neste estudo ficaram entre 0,53% na fraudinha e 1,48% na alcatra. Já nas capas de gordura, os teores encontrados foram de 0,94% na alcatra e 1,90% na picanha. Estes valores encontram-se mais elevados que no estudo de MARKS et al., 2004, em que os teores ficaram entre 0,68 - 0,90% e ALFAIA et al. (2009) de 0,26-0,58%. O ácido rumênico foi o principal isômero detectado em todos os cortes, uma vez que este é produzido tanto na biohidrogenação ruminal, quanto por síntese endógena a partir do ácido vacênico (ALFAIA et al., 2009). Os teores nas capas de gorduras foram mais elevados, pois o tecido adiposo é um sítio de síntese endógena dos CLAs (GRIINARI et al., 2000). Esta variação pode acontecer pelo fato de as amostras terem sido adquiridas no comércio local, sem que houvesse o controle da dieta do gado, uma vez que vários estudos mostram a variação destes teores pela dieta (DHIMAN, NAM e URE, 2005; FRENCH et al., 2003; NUERNBERG et al., 2007).

Tabela 7 Teor de gordura dos laticíneos

Creme de Leite	logurte	Queijo Mussarela	Queijo Prato	Queijo Provolone
Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio
15,30 ± 0,88 ^c	6,90 ± 0,99 ^d	28,77 ± 0,20 ^b	35,29 ± 0,42 ^a	30,40 ± 0,27 ^b

Média seguida de mesma letra não difere significativamente, segundo ANOVA, seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 8 Perfil de ácidos graxos dos laticínios em g/100 g de lipídeos

	Creme de Leite	logurte	Queijo Mussarela	Queijo Prato	Queijo Provolone
	Media ± Desvio	Media ± Desvio	Media ± Desvio	Media ± Desvio	Media ± Desvio
C10:0	1,37 ± 0,05 ^b	2,14 ± 0,66 ^b	1,81 ± 0,08 ^b	2,28 ± 0,08 ^a	2,48 ± 0,03 ^a
C12:0	2,91 ± 0,01 ^b	3,19 ± 0,27 ^{ab}	2,55 ± 0,04 ^c	3,24 ± 0,03 ^a	3,49 ± 0,01 ^a
C14:0	11,89 ± 0,03 ^d	12,11 ± 0,07 ^c	11,05 ± 0,15 ^e	12,51 ± 0,04 ^b	13,07 ± 0,02 ^a
C16:0	34,34 ± 0,12 ^a	35,07 ± 0,64 ^a	33,25 ± 0,46 ^b	34,28 ± 0,08 ^a	34,18 ± 0,02 ^{ab}
C18:0	13,94 ± 0,11 ^a	12,94 ± 0,28 ^c	13,36 ± 0,18 ^{bc}	13,41 ± 0,04 ^b	11,83 ± 0,00 ^d
C20:0	0,17 ± 0,00 ^a	0,15 ± 0,01 ^b	0,16 ± 0,00 ^{ab}	0,18 ± 0,00 ^a	0,16 ± 0,00 ^{ab}
C22:0	0,06 ± 0,01 ^a	0,00 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^b	0,05 ± 0,02 ^a	0,00 ± 0,00 ^b
Σ AGS	66,41 ± 0,20 ^{ab}	66,58 ± 0,54 ^{ab}	64,59 ± 1,82 ^b	68,04 ± 1,32 ^a	67,82 ± 0,97 ^a
C14:1	1,08 ± 0,00 ^e	2,44 ± 0,03 ^a	1,22 ± 0,02 ^d	1,74 ± 0,01 ^b	1,32 ± 0,00 ^c
C16:1	2,09 ± 0,01 ^c	2,12 ± 0,04 ^{bc}	2,28 ± 0,03 ^a	2,16 ± 0,01 ^b	2,23 ± 0,00 ^a
C17:1	0,29 ± 0,00 ^c	0,25 ± 0,01 ^e	0,41 ± 0,00 ^a	0,27 ± 0,00 ^d	0,37 ± 0,00 ^b
C18:1	25,61 ± 0,25 ^a	24,24 ± 0,42 ^b	25,45 ± 0,48 ^a	22,08 ± 0,35 ^c	22,76 ± 0,06 ^c
C20:1	0,55 ± 0,01 ^b	0,46 ± 0,01 ^d	0,59 ± 0,01 ^a	0,44 ± 0,01 ^d	0,49 ± 0,00 ^c
Σ AGM	29,63 ± 0,24 ^a	29,51 ± 0,47 ^a	29,95 ± 0,43 ^a	26,68 ± 0,37 ^b	27,18 ± 0,07 ^b
C18:2 C	1,99 ± 0,02 ^b	2,27 ± 0,06 ^a	1,02 ± 0,01 ^d	1,68 ± 0,02 ^c	1,09 ± 0,00 ^d
C20:2	0,06 ± 0,00 ^b	0,12 ± 0,01 ^a	0,07 ± 0,00 ^b	0,06 ± 0,00 ^b	0,07 ± 0,00 ^b
C20:4	0,11 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^c	0,02 ± 0,02 ^c	0,10 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,00 ^b
Σ AGP	2,21 ± 0,02 ^b	2,56 ± 0,10 ^a	1,20 ± 0,03 ^d	1,89 ± 0,01 ^c	1,29 ± 0,01 ^d
C18:1t	0,24 ± 0,03 ^b	0,03 ± 0,05 ^b	2,60 ± 0,57 ^a	2,23 ± 0,73 ^a	2,34 ± 0,01 ^a
C18:2 t	0,50 ± 0,09 ^a	0,49 ± 0,01 ^b	0,51 ± 0,01 ^a	0,38 ± 0,00 ^b	0,22 ± 0,02 ^c
Σ AGT	0,75 ± 0,06 ^b	0,52 ± 0,04 ^b	3,10 ± 0,56 ^a	2,61 ± 0,74 ^a	2,56 ± 0,01 ^a
CLA	1,00 ± 0,02 ^b	0,83 ± 0,02 ^c	1,15 ± 0,01 ^a	0,77 ± 0,00 ^d	1,15 ± 0,00 ^a

Média seguida de mesma letra não difere significativamente, segundo ANOVA, seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 9 Perfil de ácidos graxos dos laticínios em g/100 g de amostra

	Creme de Leite	logurte	Queijo Mussarela	Queijo Prato	Queijo Provolone
	Media ± Desvio	Media ± Desvio	Media ± Desvio	Media ± Desvio	Media ± Desvio
C10:0	0,21 ± 0,01 ^c	0,15 ± 0,04 ^c	0,52 ± 0,02 ^b	0,81 ± 0,03 ^a	0,75 ± 0,01 ^a
C12:0	0,45 ± 0,03 ^d	0,22 ± 0,03 ^e	0,73 ± 0,02 ^c	1,14 ± 0,01 ^a	1,06 ± 0,01 ^b
C14:0	1,82 ± 0,11 ^d	0,84 ± 0,12 ^e	3,18 ± 0,07 ^c	4,41 ± 0,05 ^a	3,97 ± 0,04 ^b
C16:0	5,26 ± 0,32 ^c	2,42 ± 0,35 ^d	9,57 ± 0,20 ^b	12,10 ± 0,14 ^a	10,39 ± 0,10 ^b
C18:0	2,13 ± 0,14 ^c	0,89 ± 0,14 ^d	3,84 ± 0,08 ^b	4,73 ± 0,05 ^a	3,59 ± 0,03 ^b
C20:0	0,03 ± 0,00 ^b	0,01 ± 0,00 ^c	0,05 ± 0,00 ^a	0,06 ± 0,00 ^a	0,05 ± 0,00 ^a
C22:0	0,01 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,00 ± 0,00 ^c	0,02 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^c
Σ AGS	10,16 ± 0,61 ^d	4,59 ± 0,64 ^e	19,45 ± 0,65 ^c	25,07 ± 0,57 ^a	21,83 ± 0,43 ^b
C14:1	0,17 ± 0,01 ^d	0,17 ± 0,02 ^d	0,35 ± 0,01 ^c	0,61 ± 0,01 ^a	0,40 ± 0,00 ^b
C16:1	0,32 ± 0,02 ^c	0,15 ± 0,02 ^d	0,66 ± 0,01 ^b	0,76 ± 0,01 ^a	0,68 ± 0,01 ^b
C17:1	0,04 ± 0,00 ^d	0,02 ± 0,00 ^e	0,12 ± 0,00 ^a	0,09 ± 0,00 ^c	0,11 ± 0,00 ^b
C18:1	3,92 ± 0,19 ^c	1,67 ± 0,26 ^d	7,32 ± 0,09 ^b	7,79 ± 0,13 ^a	6,92 ± 0,06 ^b
C20:1	0,08 ± 0,00 ^c	0,03 ± 0,00 ^d	0,17 ± 0,00 ^a	0,15 ± 0,00 ^b	0,15 ± 0,00 ^b
Σ AGM	4,53 ± 0,23 ^c	2,04 ± 0,31 ^d	8,62 ± 0,07 ^b	9,42 ± 0,14 ^a	8,26 ± 0,07 ^b
C18:2 C	0,30 ± 0,02 ^{bc}	0,16 ± 0,02 ^d	0,29 ± 0,00 ^c	0,59 ± 0,01 ^a	0,33 ± 0,00 ^b
C20:2	0,01 ± 0,00 ^b	0,01 ± 0,00 ^b	0,02 ± 0,00 ^a	0,02 ± 0,00 ^a	0,02 ± 0,00 ^a
C20:4	0,02 ± 0,00 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	0,01 ± 0,01 ^a	0,03 ± 0,00 ^{ab}	0,02 ± 0,00 ^a
Σ AGP	0,34 ± 0,02 ^c	0,18 ± 0,03 ^d	0,35 ± 0,01 ^{bc}	0,67 ± 0,01 ^a	0,39 ± 0,00 ^b
C18:1t	0,04 ± 0,00 ^b	0,00 ± 0,00 ^c	0,75 ± 0,16 ^a	0,79 ± 0,26 ^a	0,71 ± 0,01 ^a
C18:2 t	0,08 ± 0,01 ^b	0,03 ± 0,01 ^c	0,15 ± 0,00 ^a	0,14 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^b
Σ AGT	0,11 ± 0,01 ^b	0,04 ± 0,00 ^b	0,89 ± 0,16 ^a	0,92 ± 0,26 ^a	0,78 ± 0,01 ^a
CLA	0,15 ± 0,01 ^c	0,06 ± 0,01 ^d	0,33 ± 0,01 ^a	0,27 ± 0,00 ^b	0,35 ± 0,00 ^a

Média seguida de mesma letra não difere significativamente, segundo ANOVA, seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os valores encontrados nas análises gravimétricas estão de acordo com os rótulos dos produtos e pelos valores apresentados por apresentados por MENDIS, CRUZ-HERNANDEZ e RATNAYAKE (2008).

Assim como nas carnes os principais ácidos graxos encontrados nestas amostras foram os ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), palmitoleico (C16:1), oleico (C18:1) e linoleico (C18:2 *cis*-9, *cis*-12).

A concentração dos AGT de 0,52-3,10%, abaixo dos valores relatados por MENDIS, CRUZ-HERNANDEZ e RATNAYAKE (2008) que foram de 4,2 - 7,8%.

Os teores de CLA encontrados nos laticínios estão de acordo com os apresentados por MENDIS, CRUZ-HERNANDEZ e RATNAYAKE (2008) que mostraram valores que variaram entre 0,5 - 0,9%, assim como no estudo de BHARATHAN et al.(2008) que, suplementando vacas leiteiras com óleo de peixe, obteve valores de CLA entre 0,61-1,68%.

6 CONCLUSÕES

O método de esterificação alcalina mostrou-se o mais adequado para uma quantificação segura do perfil de ácidos graxos de alimentos que contenham os isômeros conjugados do ácido linoleico.

As condições cromatográficas CLA03 mostrou-se a mais adequada para a análise do perfil de ácidos graxos de carnes, expondo uma boa separação na região dos isômeros do ácido oleico e linoleico.

A ressonância magnética nuclear do carbono 13 mostrou-se como uma boa ferramenta para a identificação e quantificação dos CLAs.

Os ácidos palmítico, esteárico e oleico são os ácidos graxos predominantes nos músculos, capas de gordura e laticínios.

Os teores de ácido linoleico conjugado foram elevados, tendo as capas de gordura uma quantidade maior destes isômeros, uma vez que o tecido adiposo é um sítio de síntese endógena de CLAs.

A variação destes teores pode ser dada possivelmente pela diferença nas dietas dos animais, uma vez que os alimentos foram adquiridos no comércio e a dieta dos animais desconhecida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKAHOSHI, A.; KOKA, K.; OHKURA-KAKU, S.; KANEDA, N.; GOTO, C.; SANO, H.; IWATA, T.; YAMAUCHI, Y.; TSUTSUMI, K.; SUGANO, M. Metabolic effects of dietary conjugated linoleic acid (CLA) isomers in rats. **Nutrition Research**, v. 23, n. 12, p. 1691-1701, 2003.
- ALDAI, N.; MURRAY, B. E.; NAJERA, A. I.; TROY, D. J.; OSORO, K. Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 7, p. 1073-1083, 2005.
- ALFAIA, C.P.M.; ALVES, S.P.; MARTINS, S.I.V.; COSTA, A.S.H.; FONTES, C.M.G.A.; LEMOS, J.P.C.; BESSA, R.J.B.; PRATES, J.A.M. Effect of the feeding system on intramuscular fatty acids and conjugated linoleic acid isomers of beef cattle, with emphasis on their nutritional value and discriminatory ability. **Food Chemistry**, v.114, p.939–946, 2009.
- ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde, Resolução - RE nº 833, de 29 de março de 2007, disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2007/300307_2.htm. Acesso em: 02 de abril de 2007.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**, Arlington, Official Method. n. 996.06, cap. 41, p. 20-24A, 2002.
- AUED-PIMENTEL, S. **Avaliação de procedimentos analíticos para a determinação de lipídios e ácidos graxos em produtos alimentícios**. São Paulo, 2007. 230p. [Tese de Doutorado – Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo].
- BADOLATO, E.S.G. **Aspectos analíticos da determinação de ácidos graxos trans em margarinas e gordura vegetais hidrogenadas**. São Paulo, 2000, 3p., [Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo]
- BANNI, S.; CARTA, G.; CONTINI, M. S.; ANGIONI, E.; DEIANA, M.; DESSI, M. A.; MELIS, M. P.; CORONGIU, F. P. Characterization of conjugated diene fatty acids

- in milk, dairy products, and lamb tissues. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 7, n. 3, p. 150-155, 1996.
- BAUBLITS, R.T.; POHLMAN, F.W.; BROWN-JR., A.H.; JOHNSON, Z.B.; PROCTOR, A. Injection of conjugated linoleic acid into beef strip loins. **Meat Science**, v. 75, p. 84–93, 2007.
- BAUMAN D. E., BAUMGARD L. H., CORL B. A., GRIINARI J. M. Biosynthesis of CLA in ruminants. **Proc. Am. Soc. Anim. Sci.**, p.1-15, 2000.
- BAUMAN, D.E.; GRIINARI, J.M. Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. **Livestock Production Science**, v.70, p. 15–29, 2001.
- BHARATHAN, M.; SCHINGOETHE, D.J.; HIPPEN, A.R.; KALSCHEUR, K.F.; GIBSON, M.L.; KARGES, K. Conjugated linoleic acid increases in milk from cows fed condensed corn distillers solubles and fish oil. **J. Dairy Sci.**, v.91, p.2796-2807, 2008.
- BHATTACHARYA, A.; BANU, J.; RAHMAN, M.; CAUSEY, J.; FERNANDES, G. Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease. **J Nutr Biochem**, v. 17, n. 12, p. 789-810, 2006.
- BIESALSKI, H. K. Meat as a component of a healthy diet - are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? **Meat Science**, v. 70, n. 3, p. 509-524, 2005.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. Lipídios. In: **Introdução à Química de Alimentos**. São Paulo: Varela; 2003. p. 139 – 74.
- BOOTH, R. G.; KON, S. A. A study of seasonal variation in butter fat: A seasonal spectroscopic variation in the fatty acid fraction. **Biochem J**, v. 29, n. 1, p. 133-7, 1935.
- BRASIL. Resolução-RDC n.360, de 23 dez. 2003. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. **Diário Oficial da União**, Brasília, n.251, 26 dez. 2003. Seção 1, p.33-34.
- CHAVARRO, J. E.; STAMPFER, M. J.; CAMPOS, H.; KURTH, T.; WILLETT, W. C.; MA, J. A prospective study of trans-fatty acid levels in blood and risk of prostate cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 17, n. 1, p. 95-101, 2008.

- CHONG, E. W.; SINCLAIR, A. J.; GUYMER, R. H. Facts on fats. **Clin Experiment Ophthalmol**, v. 34, n. 5, p. 464-71, 2006.
- CHRISTIE, W. W.; DOBSON, G.; ADLOF, R. O. A practical guide to the isolation, analysis and identification of conjugated linoleic acid. **Lipids**, v. 42, n. 12, p. 1073-84, 2007.
- CHRISTIE, W. W.; SÉBÉDIO, J.L.; JUANÉDA, P. A practical guide to the analysis of conjugated linoleic acid (CLA). **Inform**, v. 12, p. 147-152, 2001.
- CORDAIN, L.; WATKINS, B. A.; FLORANT, G. L.; KELHER, M.; ROGERS, L.; LI, Y. Fatty acid analysis of wild ruminant tissues: evolutionary implications for reducing diet-related chronic disease. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 181–191, 2002.
- DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's food chemistry**, 4^a ed. , Nova Iorque, CRC Press, 2007.
- DAVIS, A. L.; MCNEILL, G. P.; CASWELL, D. C. Analysis of conjugated linoleic acid isomers by ¹³C NMR spectroscopy. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 97, p. 155–165, 1999.
- DHIMAN, T. R.; NAM, S. H.; URE, A. L. Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 6, p. 463-482, 2005.
- DUFFY, P. E.; QUINN, S. M.; ROCHE, H. M.; EVANS, P. Synthesis of trans-vaccenic acid and cis-9-trans-11-conjugated linoleic acid. **Tetrahedron**, v. 62, n. 20, p. 4838-4843, 2006.
- ENSER, M.; HALLETT, K.; HEWITT, B.; FURSEY, G.A.J.; WOOD, J.D. Fatty Acid Content and Composition of English Beef, Lamb and Pork at Retail. **Meat Science**, v. 42, n. 4, p.443-456, 1996.
- FEDERAL REGISTER 64 FR, Washington, Food and Drug Administration, 17 Final Rule July, 11 2003, Food labeling: *trans* fatty acids in nutrition labeling, nutrient content claims, and health claims; proposed rule. Disponível em: <http://www.cfsan.fda.gov>. Acesso em: 9 maio 2007.
- FERNANDES, A.R.M.; SAMPAIO, A.A.M.; HENRIQUE, W.; OLIVEIRA, E.A.; OLIVEIRA, R.V.; LEONEL, F.R. Fatty acids composition and meat quality of Nellore

- and Canchim young bulls fed sugar cane-based diets with two concentrate levels. **R. Bras. Zootec.**, v.38, n.2, p.328-337, 2009.
- FERNANDEZ, M. L.; WEST, K. L. Mechanisms by which dietary fatty acids modulate plasma lipids. **J Nutr**, v. 135, n. 9, p. 2075-8, 2005.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.
- FONSECA, M.C.P.; SALAY, E. Beef, chicken and pork consumption and consumer safety and nutritional concerns in the City of Campinas, Brazil. **Food Control**, v.19, p.1051–1058, 2008.
- FRENCH, P.; O'RIORDAN, E.G.; MONAHAN, F.J.; CAFFREY, P.J.; MOLONEY, A.P. Fatty acid composition of intra-muscular triacylglycerols of steers fed autumn grass and concentrates. **Livestock Production Science**, v.81, p.307-317, 2003.
- GRANLUND, L.; LARSEN, L. N.; NEBB, H. I.; PEDERSEN, J. I. Effects of structural changes of fatty acids on lipid accumulation in adipocytes and primary hepatocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1687, n. 1-3, p. 23-30, 2005.
- GRIINARI, J. M.; CORL, B. A.; LACY, S. H.; CHOUINARD, P. Y.; NURMELA, K. V.; BAUMAN, D. E. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 9, p. 2285-91, 2000.
- GRIINARI, J. M.; DWYER, D. A.; MCGUIRE, M. A.; BAUMAN, D. E.; PALMQUIST, D. L.; NURMELA, K. V. V. Trans-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 5, p. 1251-1261, 1998.
- GRUNDY, S. M. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, p. 2696-8, 2002
- HAUMANN, B.F. The benefits of dietary fats: the other side of the story. **International news on fats, oils and related materials**, v.9, n.5, p.366-382, 1998.
- HE, K.; XU, Y.; VAN HORN, L. The puzzle of dietary fat intake and risk of ischemic stroke: a brief review of epidemiologic data. **J Am Diet Assoc**, v. 107, n. 2, p. 287-95, 2007.

- HJERKINN, E. M.; SELJEFLOT, I.; ELLINGSEN, I.; BERSTAD, P.; HJERMANN, I.; SANDVIK, L.; ARNESEN, H. Influence of long-term intervention with dietary counseling, long-chain n-3 fatty acid supplements, or both on circulating markers of endothelial activation in men with long-standing hyperlipidemia. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, n. 3, p. 583-589, 2005.
- HODGE, A. M.; ENGLISH, D. R.; O'DEA, K.; SINCLAIR, A. J.; MAKRIDES, M.; GIBSON, R. A.; GILES, G. G. Plasma phospholipid and dietary fatty acids as predictors of type 2 diabetes: interpreting the role of linoleic acid. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 86, n. 1, p. 189-197, 2007.
- JAMES, A.T.; MARTIN, A.J.P. Gas-liquid partition chromatography: the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. **Biochem J.**, v.50, n.5, p.679–690, 1952.
- JENKINS, T. C.; WALLACE, R. J.; MOATE, P. J.; MOSLEY, E. E. BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 2, p. 397-412, 2008.
- KENNEDY, A.; MARTINEZ, K.; CHUANG, C. C.; LAPOINT, K.; MCINTOSH, M. Saturated Fatty Acid-Mediated Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue: Mechanisms of Action and Implications. *The Journal of Nutrition*, v. 139, n. 1, p. 1-4, 2009
- KEPLER, C. R.; HIRONS, K. P.; MCNEILL, J. J.; TOVE, S. B. Intermediates and Products of Biohydrogenation of Linoleic Acid by *Butyrivibrio Fibrisolvens*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 6, p. 1350-1354, 1966.
- KHANAL, R.C. e DHIMAN, T.R. Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid (CLA): A Review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.3, n. 2, p.72-81, 2004.
- KRAMER, J. K. C.; FELLNER, V.; DUGAN, M. E. R.; SAUER, F. D.; MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total trans fatty acids. **Lipids**, v. 32, n. 11, p. 1219-1228, 1997.
- KRAMER, J. K. G.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; DENG, Z. Y.; ZHOU, J. Q.; JAHREIS, G.; DUGAN, M. E. R. Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18 : 1 isomers

- in synthetic and animal products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 6, p. 1137s-1145s, 2004.
- LARSEN, T. M.; TOUBRO, S.; GUDMUNDSEN, O.; ASTRUP, A. Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y does not prevent weight or body fat regain. **Am J Clin Nutr**, v. 83, p.606 –612, 2006.
- LAWRIE, R.A. **Ciência da carne**, 6ª edição, Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005.
- LETH, T.; JENSEN H.G.; MIKKELSEN, A.A.; BYSTED A., The effect of the regulation on *trans* fatty acid content in Danish food. **Atherosclerosis Supplements**, v.5, p.53-56, 2006.
- LICHTENSTEIN, A. Diet and lifestyle recommendations revision 2006: A scientific statement from the American Heart Association nutrition committee. **Circulation**, v. 114, n. 23, p. E629-E629, 2006.
- LIE KEN JIE ,M. S. F. Analysis of conjugated linoleic acid esters by nuclear magnetic resonance spectroscopy . **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v.103, p. 594–632, 2001.
- LOIS, K.; YOUNG, J.; KUMAR, S. Obesity; epiphenomenon or cause of metabolic syndrome? **International Journal of Clinical Practice**, v. 62, n. 6, p. 932-938, 2008.
- MANCINI-FILHO, J. Lípidos em relação a dieta brasileira. **Nutrição em Pauta**, v.7, n.36, p.41-44, 1999.
- MANCINI-FILHO, J.; CHEMIN, S. Implicações nutricionais dos ácidos graxos *trans*. **Óleos e Grãos**, v.31, p.41-45, 1996.
- MARKS, D.J.; NELSON, M.L.; BUSBOOM, J.R.; CRONRATH, J.D. AND FALEN, L.. Effects of supplemental fat on growth performance and quality of beef from steers fed barley-potato product finishing diets: Fatty acid composition of muscle and subcutaneous fat. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.3611–3616, 2004.
- MARTINS, E. F.; TORRES, R. P.; MALUF, L. M. P.; MANCINI-FILHO, J.; NISHIYAMA, A.; PERES, C. M.; MIYASAKA. Análise qualitativa e quantitativa de ácidos graxos por cromatografia. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C.K.; PROCOPIO, J. (Org.). **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002, p.33-41.

- MCCARTHY, M.; HENSON, S. Perceived risk and risk reduction strategies in the choice of beef by Irish consumers. **Food Quality and Preference**, v. 16, n. 5, p. 435-445, 2005.
- MCLEOD, R. S.; LEBLANC, A. M.; LANGILLE, M. A.; MITCHELL, P. L.; CURRIE, D. L. Conjugated linoleic acids, atherosclerosis, and hepatic very-low-density lipoprotein metabolism. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 6, p. 1169s-1174s, 2004.
- MENDIS, S.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; RATNAYAKE, M.N. Fatty acid profile of canadian dairy products with special attention to the trans-octadecenoic acid and conjugated linoleic acid Isomers. **Journal of AOAC**, v.91, n.4, p.811-819, 2008.
- MICHA, R.; MOZAFFARIAN, D. Trans fatty acids: effects on metabolic syndrome, heart disease and diabetes. **Nature Reviews Endocrinology**, v.5, 335–344, 2009
- MITMESSER, S. H.; CARR, T. P. Trans fatty acids alter the lipid composition and size of apoB-100-containing lipoproteins secreted by HepG2 cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 3, p. 178-183, 2005.
- MOZAFFARIAN, D.; KATAN, M. B.; ASCHERIO, A.; STAMPFER, M. J.; WILLETT, W. C. Medical progress - Trans fatty acids and cardiovascular disease. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 15, p. 1601-1613, 2006.
- NUERNBERG, K.; DANNENBERGER, K.; ENDER, K.; NUERNBERG, G. Comparison of different methylation methods for the analysis of conjugated linoleic acid isomers by silver ion HPLC in beef lipids. **J. Agric. Food Chem.**, v.55, p.598-602, 2007.
- OKERE, I. C.; CHANDLER, M. P.; MCELFRISH, T. A.; RENNISON, J. H.; SHAROV, V.; SABBAH, H. N.; TSERNG, K. Y.; HOIT, B. D.; ERNSBERGER, P.; YOUNG, M. E.; STANLEY, W. C. Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 1, p. H38-H44, 2006.
- PAJUNEN, T. I.; KOSKELA, H.; HASE, T.; HOPIA, A. NMR properties of conjugated linoleic acid (CLA) methyl ester hydroperoxides. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 154, n. 2, p. 105-114, 2008.

- PARADIS, C.; BERTHIAUME, R.; LAFRENIERE, C.; GERVAIS, R.; CHOUINARD, P. Y. Conjugated linoleic acid content in adipose tissue of calves suckling beef cows on pasture and supplemented with raw or extruded soybeans. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 7, p. 1624-1636, 2008.
- PARIZA, M. W. Conjugated linoleic acid may be useful in treating diabetes by controlling body fat and weight gain. **Diabetes Technol Ther**, v. 4, n. 3, p. 335-338, 2002.
- PARIZA, M. W.; BENJAMIN, H. W.; HARGRAVES, W. A.; CHRISTOU, M.; JEFCOATE, C. R. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by Dmba. **Proceedings of the American Association for Cancer Research**, v. 26, p. 118-118, 1985.
- PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 4, p. 283-298, 2001.
- PARK, S. J.; PARK, C. W.; KIM, S. J.; KIM, J. K.; KIM, Y. R.; PARK, K. A.; KIM, J. O.; HA, Y. L. Methylation methods for the quantitative analysis of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in various lipid samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 5, p. 989-996, 2002.
- PARK, Y.; PARIZA, M. W. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 311-323, 2007.
- PARK, Y.; STORKSON, J. M.; ALBRIGHT, K. J.; LIU, W.; PARIZA, M. W. Evidence that the trans-10,cis-12 isomer of conjugated linoleic acid induces body composition changes in mice. **Lipids**, v. 34, n. 3, p. 235-241, 1999.
- PARODI, P. W. Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 60, p. 1550-1553, 1977.
- RUSSO, G. L. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. **Biochem Pharmacol**, v. 77, n. 6, p. 937-46, 2009.
- RUXTON, C. H. S.; REED, S. C.; SIMPSON, M. J. A.; MILLINGTON, K. J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 20, n. 3, p. 275-285, 2007.

- SAHIN, H.; UYANIK, F.; INANC, N. Effects of Conjugated Linoleic Acid on Body Composition and Selected Biochemical Parameters in Obese Women. **Pakistan Journal of Nutrition**, n. 7, v. 4, p. 546-549, 2008
- SARRIES, M. V.; MURRAY, B. E.; MOLONEY, A. P.; TROY, D.; BERIAIN, M. J. The effect of cooking on the fatty acid composition of longissimus muscle from beef heifers fed rations designed to increase the concentration of conjugated linoleic acid in tissue. **Meat Science**, v. 81, n. 2, p. 307-312, 2009.
- SCOLLAN, N.; HOCQUETTE, J. F.; NUERNBERG, K.; DANNENBERGER, D.; RICHARDSON, I.; MOLONEY, A. Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. **Meat Science**, v. 74, n. 1, p. 17-33, 2006.
- SEPPÄNEN-LAAKSO, T.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, R. Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. **Analytica Chimica Acta**, v. 465, n. 1-2, p. 39-62, 2002.
- SHAMIL, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v.17, n.2, p.227-236, 2004.
- SIERI, S.; KROGH, V.; FERRARI, P.; BERRINO, F.; PALA, V.; THIEBAUT, A. C. M.; TJONNELAND, A.; OLSEN, A.; OVERVAD, K.; JAKOBSEN, M. U.; CLAVEL-CHAPELON, F.; CHAJES, V.; BOUTRON-RUAULT, M. C.; KAAKS, R.; LINSEISEN, J.; BOEING, H.; NOTHLINGS, U.; TRICHOPOULOU, A.; NASKA, A.; LAGIOU, P.; PANICO, S.; PALLI, D.; VINEIS, P.; TUMINO, R.; LUND, E.; KUMLE, M.; SKEIE, G.; GONZALEZ, C. A.; ARDANAZ, E.; AMIANO, P.; TORMO, M. J.; MARTINEZ-GARCIA, C.; QUIROS, J. R.; BERGLUND, G.; GULLBERG, B.; HALLMANS, G.; LENNER, P.; BUENO-DE-MESQUITA, H. B.; VAN DUIJNHOFEN, F. J. B.; PEETERS, P. H. M.; VAN GILS, C. H.; KEY, T. J.; CROWE, F. L.; BINGHAM, S.; KHAW, K. T.; RINALDI, S.; SLIMANI, N.; JENAB, M.; NORAT, T.; RIBOLI, E. Dietary fat and breast cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 5, p. 1304-1312, 2008.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 1ª edição, Porto Alegre: Ed.Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 1999

- SUNDRAM, K.; FRENCH, M. A.; CLANDININ, M. T. Exchanging partially hydrogenated fat for palmitic acid in the diet increases LDL-cholesterol and endogenous cholesterol synthesis in normocholesterolemic women. **European Journal of Nutrition**, v. 42, n. 4, p. 188-194, 2003.
- VAZ, J.S.; DEBONI, F.; AZEVEDO, M. J.; GROSS, J. L.; ZELMANOVITZ, T. Fatty acids as biological markers of fat intake. **Revista de Nutrição**, v.19, n.4, 2006.
- VEACH, J. Functional dichotomy: glutathione and vitamin E in homeostasis relevant to primary open-angle glaucoma. **British Journal of Nutrition**, v. 91, n. 6, p. 809-829, 2004.
- VISIOLI, F.; HAGEN, T. M. Nutritional strategies for healthy cardiovascular aging: Focus on micronutrients. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 3, p. 199-206, 2007.
- WAHRBURG, U. What are the health effects of fat? **European Journal of Nutrition**, v. 43, p. 6-11, 2004.
- WALKER, P.; RHUBART-BERG, P.; MCKENZIE, S.; KELLING, K.; LAWRENCE, R. S. Public health implications of meat production and consumption. **Public Health Nutrition**, v. 8, n. 4, p. 348-356, 2005.
- WANG, Y. W.; JONES, P. J. H. Conjugated linoleic acid and obesity control: efficacy and mechanisms. **International Journal of Obesity**, v. 28, n. 8, p. 941-955, 2004.
- WARENSJO, E.; SUNDSTROM, J.; VESSBY, B.; CEDERHOLM, T.; RISERUS, U. Markers of dietary fat quality and fatty acid desaturation as predictors of total and cardiovascular mortality: a population-based prospective study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, n. 1, p. 203-209, 2008.
- WHO (2003). Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. **WHO Technical Report Series No. 916**. World Health Organization: Geneva.
- WILLIAMSON, C. S.; FOSTER, R. K.; STANNER, S. A.; BUTTRISS J. L. Red meat in the diet. **British Nutrition Foundation**, v. 30, p. 323–355, 2005
- YAMASAKI, M.; MIYAMOTO, Y.; CHUJO, H.; NISHIYAMA, K.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. Trans 10, cis12-conjugated linoleic acid induces mitochondria-

related apoptosis and lysosomal destabilization in rat hepatoma cells. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1735, n. 3, p. 176-184, 2005.

ZABALA, A.; PORTILLO, M. P.; MACARULLA, M. T.; RODRIGUEZ, V. M.; FERNANDEZ-QUINTELA, A. Effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 CLA isomers on liver and adipose tissue fatty acid profile in hamsters. **Lipids**, v. 41, n. 11, p. 993-1001, 2006.