

PLÍNIO MAGALHÃES MADUREIRA

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM LEITE DE CABRA POR
DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE GORDURA OU POR METILAÇÃO
DIRETA

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica Agrícola, para
obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

PLÍNIO MAGALHÃES MADUREIRA

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM LEITE DE CABRA POR
DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE GORDURA OU POR METILAÇÃO
DIRETA

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Aprovada: 4 de julho de 2011

Dra. Márcia Maria Cândido da Silva

Prof^a. Tânia Toledo de Oliveira

Prof. Augusto César de Queiroz

Prof. Edenio Detmann
(Coorientador)

Prof. George Henrique Kling de Moraes
(Orientador)

Dedico...

Aos meus Queridos Pais, Furbino e Neusa, pelo incentivo e Coragem para seguir em frente, e por sempre dizerem que Eu Sou Capaz...

À minhas Queridas Irmãs, Patrícia e Paula, pelas Confidências e Desabafos...

Aos meus amigos, pelo Amor, Carinho e Palavras que por muitas vezes secaram minhas lágrimas de Angústia, e fizeram-me ver a Vida de uma forma diferente...

".... Os homens perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde. E por pensarem ansiosamente no futuro esquecem do presente de forma que acabam por não viver nem no presente nem no futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... e morrem como se nunca tivessem vivido."

Dalai Lama

AGRADECIMENTOS

Ao nosso Grandioso Pai, “Deus”, pelas maravilhas da vida, e por sempre se fazer presente na minha vida, e na vida de minha Família.

Aos meus amados pais, Furbino e Neusa, pelo carinho, apoio, incentivo, compreensão e acima de tudo pelo respeito às minhas atitudes e decisões. Com eles tenho certeza que enfrento qualquer batalha, pois me ensinaram o essencial da vida, que é o respeito e o amor, pessoas que são o meu espelho, o meu alicerce, a minha Vida.

Às minhas queridas Irmãs, Patrícia e Paula, pela fidelidade e confiança e por sempre saberem usar as palavras certas para me ajudar.

Ao professor Edenio Detmann, pela sua solicitude em sempre dispor um tempo em sua agenda para me ouvir e indicar o melhor caminho a seguir. A ele agradeço também a amizade, pois nestes anos de convívio pude perceber o ser humano digno, lutador e atencioso que ele é, um exemplo a todos que trabalham no Laboratório de Nutrição Animal.

Ao professor George Henrique Kling de Moraes, pois desde que cheguei a Viçosa em 2001 tive a oportunidade de compartilhar da sua convivência seja como Chefe de departamento, Coordenador do curso de Bioquímica, professor e agora orientador. Seu profissionalismo e alegria de viver ficarão sempre comigo, assim como suas tiradas inusitadas e suas brincadeiras sérias que nos ajudaram nos instantes mais difíceis dessa jornada.

Ao departamento de Bioquímica e Biologia Molecular representando todo o quadro docente, professores maravilhosos que tive durante a graduação e em algumas disciplinas do mestrado, os quais me ensinaram muito dentro e fora da sala de aula.

Ao departamento de Zootecnia na figura do chefe de departamento, o professor Sebastião de Campos Valadares Filho, o qual sempre foi solícito na aprovação do processo administrativo que possibilitou que eu pudesse conciliar as atividades de funcionário e estudante.

À Márcia Maria Cândido da Silva pelo auxílio nas análises e pelas ótimas idéias que me inspiraram na realização deste trabalho.

Aos inúmeros amigos, mas em especial a Marina, Bruno, João Paulo e mais recentemente Danilo, pela convivência fraterna, amizade, momentos alegres e enriquecedores que passamos juntos na Juventude Religare.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Zootecnia que me acompanharam e me ajudaram nesta longa caminhada.

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, por me receberem e tornarem o meu sonho realidade.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte deste processo durante todos esses anos, tornando possível a realização de um Sonho.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

Plínio Magalhães Madureira, filho de Furbino Soares Madureira e Neusa Magalhães Madureira, nasceu em Coronel Fabriciano, estado de Minas Gerais, em 12 de novembro de 1979.

Em 2001, foi aprovado na Universidade Federal de Viçosa, onde iniciou o curso de Graduação em Bioquímica, obtendo o título de Bioquímico, em março de 2006.

Em junho de 2004 foi aprovado no concurso público para Técnico em Laboratório na Universidade Federal de Viçosa, onde está atualmente lotado no departamento de Zootecnia.

Em 2009, foi aprovado no processo de seleção do curso de Pós-Graduação – Mestrado em Bioquímica Agrícola – na Universidade Federal de Viçosa: UFV, concentrando seus estudos na área de Nutrição e Metabolismo Animal, defendendo dissertação em 4 de julho de 2011.

CONTEÚDO

RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
<i>LIPÍDIOS.....</i>	<i>3</i>
<i>LEITE DE CABRA.....</i>	<i>7</i>
<i>PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS EM LEITE DE CABRA.....</i>	<i>9</i>
<i>MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DA GORDURA DO LEITE.....</i>	<i>11</i>
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	21
DISCUSSÃO.....	32
CONCLUSÃO.....	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

RESUMO

MADUREIRA, Plínio Magalhães, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2011.

Caracterização do perfil de ácidos graxos em leite de cabra por diferentes métodos de extração de gordura ou por metilação direta. Orientador: George Henrique Kling de Moraes. Coorientadores: Edenio Detmann e Marcelo Teixeira Rodrigues.

Objetivou-se caracterizar o perfil de ácidos graxos em leite de cabra por quatro métodos distintos de extração da gordura do leite e um método de metilação direta com posterior análise por cromatografia gasosa. As amostras foram obtidas no tanque de armazenamento de leite no setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, onde se encontram caprinos das raças Saanen e Alpina, os quais são mantidos em baias coletivas sob o sistema de estabulação livre e recebendo alimentação à base de silagem de milho, feno de Tifton e concentrado. As metodologias utilizavam processos de extração por solventes orgânicos, hexano (NOUROOZ-ZADEH & APPELQUIST, 1988) e clorofórmio (BLIGH & DYER, 1959); extração somente por processos físicos de centrifugação (FENG et al. 2004); extração por centrifugação associada à extração por solvente (HARA & RADIN, 1978) e extração e metilação realizadas conjuntamente a partir do leite liofilizado (CHRISTIE et al. 1982). As análises demonstraram que o tempo longo de manipulação da amostra durante a extração da gordura do leite nos métodos que não utilizavam o leite liofilizado provoca perda dos ácidos graxos mais voláteis, sendo que a metodologia de extração e metilação a partir do leite liofilizado preserva mais os teores dos ácidos graxos de cadeia curta e média do leite caprino. O método proposto por CHRISTIE et al. (1982) foi o que mais se destacou,

notadamente em relação aos ácidos graxos butírico (C4), capróico (C6), caprílico (C8) e cáprico (C10), apresentando concentrações (g/100g de gordura) ($P < 0,05$) maiores para esses AGs em relação aos demais métodos analíticos.

ABSTRACT

MADUREIRA, Plínio Magalhães, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2011.
Characterization of fatty acids profile in goat milk using different fat extraction methods or by direct methylation. Adviser: George Henrique Kling de Moraes. Co-Advisers: Edenio Detmann and Marcelo Teixeira Rodrigues.

The objective of this research was to characterize the profile of fatty acids in goat milk by using four different methods of extraction of fat milk and a method of direct methylation for further analysis by gas chromatography. Samples were obtained from the storage tank of the caprine production systems of the Department of Animal Science at the Universidade Federal de Viçosa. The milk samples were taken from Saanem and Alpine goats, which are kept in collective pens and fed a diet based on corn silage, Tifton hay and concentrate. The evaluated methodologies utilized processes of extraction by organic solvents hexane (NOUROOZ-ZADEH & APPELQUIST, 1988) and chloroform (BLIGH & DYER, 1959; modified by SILVA, 2001); extraction solely by physical processes of centrifugation (FENG et al. 2004); extraction by both centrifugation and solvent (HARA & RADIN, 1978), and extraction and methylation of lyophilized milk performed together (CHRISTIE et al. 1982; adapted by CHILLIARD et al. 2006). The results showed that intense handling of the sample during the extraction of fat in the milk in the methods that did not utilize lyophilized milk results in loss of the more volatile fatty acids, and the methodology of extraction and methylation of the lyophilized milk results in higher contents of short-and medium-chain fatty acids in goat milk. The method proposed

by Christie et al.(1982) was the method which most stood out, notably concerning butyric (C4), caproic (C6), caprylic (C8) and capric (C10) fatty acids, presenting higher concentrations (g/100g fat) ($P < 0.05$) or fatty acids when compared to the other analytical methods.

INTRODUÇÃO

O leite produzido por animais ruminantes tem sido usado amplamente pela população humana desde a domesticação desses animais pelas civilizações mais remotas. Atualmente, com os altos índices de doenças cardiovasculares, tem-se buscado a produção de alimentos com características que minimizem estes problemas.

A gordura é o componente mais variável do leite produzido por animais ruminantes. Nos estudos de nutrição animal busca-se cada vez mais a manipulação dos componentes do leite com o objetivo de maximizar o teor de ácidos graxos poliinsaturados e diminuir a quantidade de gordura saturada, considerada prejudicial à saúde.

A avaliação da composição de ácidos graxos do leite por técnicas de cromatografia gasosa com colunas capilares constitui instrumento de alta relevância, principalmente no tocante ao desenvolvimento de pesquisas, à avaliação e desenvolvimento industrial de produtos lácteos e para o conhecimento das características nutricionais do leite e de seus derivados. Contudo, a análise de ácidos graxos no leite apresenta algumas complexidades atribuídas à ampla faixa de tamanhos moleculares e à presença de grande quantidade de ácidos graxos de cadeia curta. Além disso, os ácidos graxos para serem injetados no cromatógrafo devem antes ser previamente convertidos em ésteres metílicos.

As técnicas mais amplamente utilizadas na separação da gordura do leite são baseadas principalmente na extração com solventes orgânicos. Contudo, estes métodos de extração são processos demorados e com riscos potenciais à saúde quando utilizados de forma rotineira. Métodos baseados em processos físicos, como a liofilização, podem

constituir alternativa à extração de lipídeos por ação de solventes. Contudo, avaliações comparativas entre tais métodos em leite de cabra são escassas e informações a respeito do método com maior robustez e exatidão ainda necessitam ser definidas.

Assim, objetivou-se caracterizar o perfil de ácidos graxos em leite de cabra *in natura* utilizando-se diferentes métodos de extração da gordura ou por metilação direta.

REVISÃO DE LITERATURA

Lipídios

Os lipídeos constituem grupo de substâncias químicas com funções biológicas extremamente variadas. As gorduras e os óleos são as principais formas de armazenamento de energia nos animais vertebrados e em grande parte das espécies de plantas. Os fosfolipídeos e esteróis são os principais elementos estruturais das membranas biológicas. Outros lipídeos, apesar de presentes em quantidades relativamente pequenas, desempenham funções relevantes nos organismos, como cofatores enzimáticos, carreadores de elétrons, pigmentos absorvedores de luz, formação de regiões hidrofóbicas de proteínas, agentes emulsificantes do trato digestivo, hormônios, mensageiros intracelulares, entre outros (NELSON & COX, 2006).

Os ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos com comprimento da cadeia variando entre 4 e 36 carbonos. Em alguns desses, a cadeia pode ser linear e completamente saturada, enquanto em outros, pode ser ramificada e conter vários pontos de insaturação. A molécula de ácido graxo tem duas regiões quimicamente distintas: a primeira, caracterizada por uma cadeia longa, que é hidrofóbica e não muito reativa quimicamente; a segunda que é formada por um grupo carboxila (-COOH), o qual se comporta como um ácido (ácido carboxílico), ionizável em solução (-COO⁻), extremamente hidrofílico e quimicamente reativo (Figura 1). Quase todas as moléculas de ácidos graxos em uma célula estão covalentemente ligados a outras moléculas por seu grupo carboxílico.

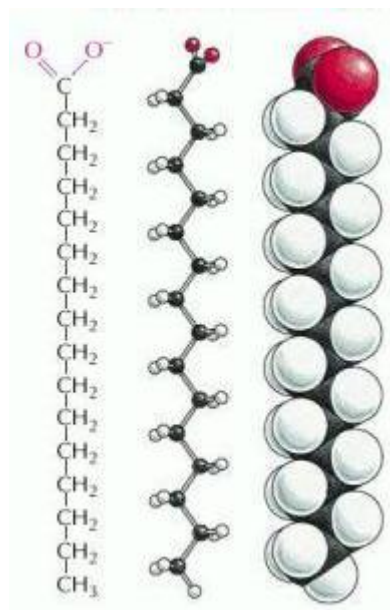


Figura 1 – Representação do ácido graxo palmítico (C₁₆) em sua fórmula estrutural, modelo bola-e-bastão e modelo de preenchimento espacial, respectivamente. Em vermelho está representada a extremidade polar do ácido carboxílico e em seguida a cadeia carbônica hidrofóbica. Fonte: ALBERTS et. al. (2002).

Os ácidos graxos mais comuns nos óleos e gorduras possuem cadeias carbônicas com números pares de 4 a 24 átomos de carbono. Os ácidos graxos com 2-4 átomos de carbono são considerados ácidos graxos de cadeia curta ou voláteis; 6-14, cadeia média, e 16-24 de cadeia longa. Ácidos graxos saturados são os que possuem todos os átomos de carbono da cadeia hidrocarbonada ligados a, pelo menos, dois átomos de hidrogênio. Por outro lado, quando há uma ou mais duplas ligações gerando carbonos ligados a um só átomo de hidrogênio, os ácidos graxos são denominados ácidos insaturados. Desta forma, os ácidos graxos diferem basicamente uns dos outros pelo comprimento da cadeia hidrocarbônica e pelo número e posição das duplas ligações. Os ácidos graxos saturados têm como isômeros apenas os ácidos com ramificação na cadeia, sendo este tipo de isomeria pouco comum. Nos ácidos graxos insaturados, podem ocorrer dois tipos de isomeria, isto é, a de posição e a geométrica. No primeiro caso, podem apresentar isômeros

posicionais em relação à localização da dupla ligação na cadeia de carbono. Na natureza, estas ligações estão freqüentemente localizadas nos carbonos 9, 12 e 15. Nos ácidos graxos insaturados de ocorrência natural predominam ligações duplas na configuração *cis*. Assim, pode-se dizer que os ácidos graxos insaturados diferem quanto ao número de átomos de carbono, número de duplas ligações (monoinsaturados ou poliinsaturados; Tabelas 1 e 2), localização das insaturações e quanto à conjugação e configuração.

Tabela 1 - Listagem dos ácidos graxos saturados

Nome sistemático	Nome comum	Nº de átomos de carbono
n-butanóico	Butírico	4
n-hexanóico	Capróico	6
n-octanóico	Caprílico	8
n-decanóico	Cáprico	10
n-dodecanóico	Láurico	12
n-tetradecanóico	Mirístico	14
Hexadecanóico	Palmítico	16
n-octadecanóico	Esteárico	18
n-eicosanóico	Araquídico	20
n-docosanóico	Behênico	22

Fonte: Adaptado de MAYES (1994).

Na isomeria geométrica, as duplas ligações impedem a livre rotação dos átomos de carbono, ocorrendo dois segmentos na cadeia hidrocarbonada, que podem situar-se do mesmo lado, como é o caso dos isômeros *cis*, gerando uma cadeia dobrada. No caso dos

isômeros *trans*, esses dois segmentos situam-se em lados opostos, mantendo a cadeia hidrocarbonada praticamente linear.

A representação simbólica dos ácidos graxos é realizada indicando-se o número de átomos de carbono seguido de dois pontos, do número, tipo e posição das ligações insaturadas. O ácido oléico, por exemplo, é caracterizado como ácido C18:1 *cis*,9. A numeração usual (IUPAC), para os átomos de carbono, é a que considera o carbono da carboxila como o carbono 1. O símbolo " Δ 9", por exemplo, significa que a ligação insaturada está entre os carbonos 9-10. Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) podem ser subdivididos em duas famílias, de acordo com a localização da última dupla ligação em relação ao seu grupamento metílico terminal, ou seja, a família ômega-6 (ω 6), em que a primeira insaturação encontra-se no carbono 6 contando a partir do grupo metílico terminal, representada pelo ácido linoléico (C18:2 Δ 9,12 ω 6) e a família ômega-3 (ω 3), em que a primeira insaturação encontra-se no carbono 3 contando a partir do grupo metílico terminal, representada pelo ácido α -linolênico (C18:3 Δ 9,12,15 ω 3). Estes ácidos graxos são considerados essenciais porque o organismo humano não pode sintetizá-los e, portanto, devem ser fornecidos através da dieta. Seus derivados, como o ácido araquidônico (ARA-C20:4 ω 6), ácido docosahexaenóico (DHA-C22:6 ω 3) e ácido eicosapentaenóico (EPA-C20:5 ω 3), também podem ser considerados essenciais, nos casos em que não possam ser sintetizados em quantidades adequadas pelo organismo, como, por exemplo, em crianças prematuras. O EPA (C20:5 ω 3), oriundo do ácido α -linolênico (C18:3 ω 3), é um componente importante dos fosfolipídeos de membranas celulares e serve como precursor para a síntese de eicosanóides. O DHA (C22:6 ω 3) é um componente estrutural das membranas celulares, particularmente tecidos nervosos do cérebro, e tem um papel importante nas células visuais da retina. (ORNELLAS & ORNELLAS, 1983; GURR, 1984; MORETTO & FETT, 1989; MAYES, 1994; FENNEMA, 1996.)

Tabela 2 – Listagem dos ácidos graxos insaturados

Nome sistemático	Nome comum	Nº de duplas ligações	Nº de átomos de carbono
n-cis,9-decenóico	Caproléico	1	10
n-cis,9- dodecenóico	Lauroléico	1	12
n-cis,9-tetradecenóico	Miristoléico	1	14
n-cis,9-Hexadecenóico	Palmitoléico	1	16
n-cis,9-Octadecenóico	Oléico	1	18
n-cis,11- Octadecenóico	Vacênico	1	18
n-cis,9,12-Octadecadienóico	Linoléico	2	18
n-cis,9,12,15-Octadecatrienóico	Linolênico	3	18
n-cis,5,8,11,14- Eicosatetraenóico	Araquidônico	4	20
n-cis,13-Docosenóico	Erúcico	1	22
n-cis,4,7,10,13,16,19-Docosahexaenóico	Cervônico	6	22
n-cis, 15-Tetracosenóico	Nervônico	1	24

Fonte: Adaptado de MAYES (1994).

Leite de cabra

O leite caprino constitui importante fonte de nutrientes para humanos quando utilizado como parte de uma dieta equilibrada. O crescimento da demanda global de leite de cabra está potencialmente relacionado às suas propriedades dietéticas, ao aumento na renda familiar em países em desenvolvimento e ao reconhecimento de suas propriedades nutracêuticas (FAO, 2001; DUBEUF et al., 2004).

As recomendações nutracêuticas do leite de cabra têm como base: sua elevada digestibilidade; os efeitos de diminuição sobre os níveis plasmáticos de colesterol e triglicerídeos (LÓPEZ-ALIAGA et al., 2005); seu elevado teor de minerais que atuam na prevenção e auxílio no tratamento de osteoporose, menopausa, doenças cardiovasculares e do câncer cólon-retal (GUÉGUEN, 1996); bem como suas características de hipoalergenicidade (LARA-VILLOSLADA et al., 2004). As qualidades nutricionais, funcionais e nutracêuticas do leite de cabra qualificam-no para o consumo em geral e para novas perspectivas de mercado, entre as quais a utilização na indústria farmacêutica e de alimentos, principalmente em fórmulas infantis (STEIJNS, 2001; McCULLOUGH, 2004).

Os lipídeos são componentes importantes da qualidade industrial e sensorial dos produtos lácteos oriundos de leite caprino por influenciarem no rendimento, textura, coloração, sabor, etc. A intensidade do sabor característico dos produtos lácteos caprinos resulta da interação de fatores, tais como: a composição de ácidos graxos da gordura do leite; a estrutura dos triglicerídeos contendo alta proporção de ácidos graxos de cadeia média esterificados nos carbonos 2 e 3; e as peculiaridades do sistema lipolítico no leite (CHILLIARD et al., 2003). Os glóbulos de gordura no leite de cabra possuem menor diâmetro médio que os glóbulos de gordura do leite de vaca. Assim, os glóbulos menores ficam mais dispersos e propiciam mais homogeneidade do leite (ATTAIE & RICHTER, 2000).

Dentre as propriedades nutracêuticas do leite de cabra destaca-se a elevada digestibilidade de sua fração lipídica observada em estudos realizados com crianças com síndrome de má absorção (HACHELAF et al., 1993) e em ratos submetidos à secção do segmento distal do intestino delgado para reproduzir esta síndrome (ALFÉREZ et al., 2001). A digestibilidade elevada do leite de cabra tem sido atribuída à presença de ácidos graxos de cadeia média (capróico, caprílico, cáprico e láurico) em concentrações cerca de

duas vezes superiores às do leite de vaca. Estes ácidos graxos de cadeia média são mais rapidamente hidrolisados por enzimas pancreáticas, possuem maior permeabilidade junto às células do lúmen intestinal, sendo prontamente transportados pelo sistema porta sem que haja necessidade de formação de micelas (TOUHAMI, 1997).

Perfis de ácidos graxos em leite de cabra

Fatores genéticos, fisiológicos e ambientais são considerados premissas na composição química e nas propriedades do leite de cabra. Entre esses fatores, a alimentação tem sido fundamental na manipulação dos componentes do leite, principalmente quanto ao perfil lipídico, que afeta diretamente seu sabor e odor. A dieta à base de pastagens, em razão das substâncias presentes nas forragens com propriedades odoríferas, pode modificar a composição química e as propriedades sensoriais do leite, relacionadas à composição em ácidos graxos e enzimas do leite (COULON & PRIOLO, 2002).

Os produtos lácteos têm sido tradicionalmente reconhecidos como uma importante fonte para nutrição humana, e suas propriedades nutricionais estão relacionadas com os seus componentes, especialmente lipídios e proteínas (DONNELLY, 2006). Neste aspecto, o leite de cabra é um alimento diferenciado em relação ao leite de vaca, por apresentar na sua composição de gordura maior proporção de ácidos graxos de cadeia pequena e média (6 a 14 carbonos) e em sua porção protéica, menor proporção de proteína do tipo caseína α_1 , que resultam em maior digestibilidade (JENNESS, 1980). O maior teor desses ácidos graxos, juntamente com o ácido linoléico conjugado (CLA), é relevante, uma vez que são considerados benéficos à saúde humana, podendo reduzir os riscos de ocorrência de doenças cardiovasculares e diabetes.

Desta forma, EKNAES et al. (2006), ao estudarem a qualidade do leite de cabras norueguesas durante diferentes períodos de lactação, utilizando éter de petróleo para extração da gordura do leite, determinou a concentração (g/100g de ácido graxo) para os ácidos graxos butírico, caprótico, caprílico e cáprico, aos 74 dias de lactação e alimentando-se de pastagem de montanha, como sendo 3,46; 2,57; 2,23; 6,51, respectivamente. MAIA et al. (2006) utilizando o método de extração da gordura do leite relatado por MURPHY & MCNEILL (1995), avaliou o efeito da inclusão de fontes de óleo na dieta de cabras da raça Saanen em lactação sobre o perfil de ácidos graxos na gordura do leite e obteve as seguintes concentrações (g/100g de ácido graxo) para os ácidos graxos butírico 0,77; caprótico 1,09; caprílico 1,57; cáprico 5,16 e CLA 1,43; ao adicionar 5,1% de óleo de arroz na dieta total. QUEIROGA et al. (2007) avaliando a influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen, utilizou o método descrito por FOLCH et al. (1957) e determinou as concentrações (g/100g de ácido graxo) para os ácidos graxos butírico, caprótico, caprílico e cáprico, nas condições de manejo com presença do macho 3,00; 3,46; 3,95; 9,04; ordenha com higiene 3,00; 4,09; 3,89; 9,36 e aos 135 dias de lactação 3,00; 5,09; 3,69 e 8,96; respectivamente. SILVA (2009) trabalhando com cabras da raça Saanen utilizou o método descrito por BLIGH & DYER (1959) e encontrou as seguintes concentrações (g/100g de ácido graxo) para os ácidos graxos de cadeia curta e média Butírico 0,6; caprótico 3,1; caprílico 3,7 e cáprico 12,3. RODRÍGUEZ-ALCALÁ et. al. (2009) avaliando o uso da tecnologia de homogeneização de alta pressão (HPH) na caracterização do perfil de ácidos graxos em leite de vaca, ovelha e cabra, utilizou o método de extração de gordura do leite proposto por LUNA et. al. (2005) e determinou as concentrações (g/100g de ácido graxo) para os ácidos graxos butírico, caprótico, caprílico, cáprico e CLA no leite de cabra, à pressão de 350 MPa, como sendo 2,48; 2,72; 2,80; 9,05 e 0,69; respectivamente. SANTOS,

et al. (2011) avaliando o efeito da casca de mamona sobre a produção e composição dos ácidos graxos do leite de cabra da raça Anglo-Nubiano, utilizou o método descrito por FENG et al. (2004) para extração da gordura do leite e obteve as seguintes concentrações (g/100g de ácido graxo), ao nível de 100% de substituição do feno de capim Tifton pela casca de mamona, para os ácidos graxos butírico 0,73, capróico 1,61, caprílico 1,90, cáprico 9,50 e CLA 1,84.

Métodos de extração da gordura do leite

Estudos sobre a composição lipídica do leite, especialmente sobre a composição em ácidos graxos, vêm sendo intensivamente realizados devido ao grande interesse mundial pelos profissionais da saúde, tendo grande importância para estudos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais (MARANGONI et. al., 2002).

A extração dos lipídios é uma etapa crítica nas análises de lipídios totais, especialmente em relação à composição de ácidos graxos, podendo ocorrer erros na análise química, assim como, contaminação ou extração inadequada do componente de interesse, o que, conseqüentemente irá remeter a resultados e interpretações errôneos (TANAMATI et al., 2005).

Durante a extração lipídica, as amostras devem ser preparadas e analisadas cuidadosamente para evitar a oxidação dos ácidos graxos, a qual pode comprometer a identificação e quantificação dos componentes da fração lipídica (MILINSK et. al., 2008). Com o objetivo de encontrar método eficiente para obtenção da fração lipídica desejada pesquisadores vem realizando trabalhos comparando diferentes métodos de extração de lipídios nos leites.

Na extração de lipídios totais do leite de vaca, por exemplo, os métodos mais utilizados no mundo são aqueles descritos por FOLCH et al. (1957) e BLIGH & DYER (1959), ambos utilizando os solventes clorofórmio e metanol; no entanto, os volumes de solventes utilizados nestes métodos são diferentes (TONIAL et al., 2009). Os solventes usados para extração de lipídios devem solubilizar todos os componentes lipídicos e serem suficientemente polares para promoverem as dissociações das membranas celulares com lipoproteínas sem que ocorra reação química (SMEDES, 1999).

Outros métodos utilizados para extração de lipídios do leite são os descritos por GERBER (1981), o qual envolve processo de separação físico-química em meio ácido (ácido sulfúrico); ROESE-GOTTLIEB (1990), que é realizado em meio alcalino (hidróxido de amônio); MURPHY & MCNEILL (1995), o qual utiliza processos físicos de centrifugação para separação da fração gordurosa do leite e a transesterificação é feita em solução de n-heptano e KOH/metanol; e LUNA et. al. (2005), que se baseia em duas etapas de centrifugação a temperatura ambiente (20°C) para separar a gordura do leite.

A grande maioria dos estudos comparativos de métodos de extração da gordura do leite e caracterização do perfil de ácido graxo é feita em leite de vaca, havendo poucas informações a respeito dos efeitos dos métodos de extração em leite de cabra, o qual possui composições de ácidos graxos substancialmente diferentes em relação ao leite de vaca.

Os métodos avaliados neste estudo são os mais utilizados nas rotinas laboratoriais para extração da gordura do leite e caracterização do perfil de ácidos graxos, variando de acordo com a disponibilidade de reagentes e equipamentos nos laboratórios. BLIGH & DYER (1959), por exemplo, desenvolveram um método simples e relativamente barato, pois utiliza quantidades muito pequenas de metanol e clorofórmio. O método descrito por FENG et al. (2004), por sua vez, utiliza apenas processos físicos de centrifugação, o que também pode ser de baixo custo se o laboratório já possuir as centrífugas. Já o método

descrito por HARA & RADIN (1978) utiliza extração por centrifugação em uma etapa e extração por solventes orgânicos em outra, dessa forma procurou-se descobrir, ao avaliar esse método, se a combinação de processos físicos e químicos seria vantajoso na recuperação dos ácidos graxos do leite de cabra. O método descrito por NOUROOZ-ZADEH & APPELQUIST (1988) que utiliza extração somente por solventes orgânicos com isopropanol e hexano possui mais etapas no processo, solventes diferente e em quantidades superiores ao método BLIGH & DYER (1959). Por fim o método desenvolvido originalmente por CHRISTIE et al. (1982) e posteriormente adaptado por CHILLIARD et al. (2006) apresenta uma inovação que é a metilação dos ácidos graxos diretamente a partir do leite liofilizado omitindo a etapa de extração da gordura do leite.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa-MG. As amostras foram obtidas no tanque de armazenamento de leite no setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, onde se encontram caprinos das raças Saanen e Alpina, os quais são mantidos em baias coletivas sob o sistema de estabulação livre e recebendo alimentação à base de silagem de milho e feno de Tifton como volumoso e mistura concentrada, fornecida conforme suas necessidades. A mistura concentrada é constituída de milho, farelo de soja e minerais. As amostras foram coletadas nos tanques em intervalos de uma semana entre os meses de fevereiro e maio de 2011, totalizando dez amostras com aproximadamente 500 mL cada. Previamente à tomada das amostras o agitador mecânico do tanque de expansão foi acionado por 10 minutos para homogeneização do leite armazenado.

Para cada uma dessas coletas, foram analisados cinco métodos com processos diferenciados de extração da gordura do leite:

- 1) FENG: método desenvolvido por FENG et al. (2004) utilizando-se somente o processo de centrifugação em duas etapas, sem a adição de solventes orgânicos para separação da fase lipídica;
- 2) HARA: método desenvolvido por HARA & RADIN (1978) baseado na extração por centrifugação em uma etapa seguida de extração por

solvente orgânico usando mistura de hexano:isopropanol: butilhidroxitolueno (BHT);

- 3) NOUROOZ: desenvolvido por NOUROOZ-ZADEH & APPELQUIST (1988) baseado na extração por solvente orgânico usando isopropanol e hexano;
- 4) BLIGH: desenvolvido por BLIGH & DYER (1959) e modificado por SILVA (2001) baseado na extração por solvente orgânico usando metanol e clorofórmio; e
- 5) CHRISTIE: originalmente desenvolvido por CHRISTIE et al. (1982) e posteriormente adaptado por CHILLIARD et al. (2006), dispensa a fase de extração da gordura do leite, o processo de esterificação é feito diretamente a partir do leite liofilizado utilizando metilato de sódio e ácido clorídrico.

Para todos os métodos, exceto para CHRISTIE, o processo de esterificação dos ácidos graxos foi feito de acordo com os procedimentos relatados por HARTMAN & LAGO (1986).

A seguir a descrição das etapas dos processos de cada método utilizado na extração da gordura do leite

FENG

Foram centrifugados 40 mL de leite *in natura* a $17.800 \times g$ por 30 minutos a 4°C. Cerca de 1 g da camada de gordura (*fat cake*) foi retirado com auxílio de espátula e transferido para tubos *eppendorf* com capacidade para 1,5 mL, os quais foram mantidos à temperatura ambiente por aproximadamente 20 minutos. Em seguida, os tubos *eppendorf* foram centrifugados à $19.300 \times g$ por 20 minutos em temperatura ambiente, o que fez com que o *fat cake* se separasse em três fases: superior, composta de lipídios; fase

intermediária, composta de proteínas e fase inferior composta de sólidos insolúveis. A camada lipídica ou fase superior foi transferida para outro tubo *ependorf* e congelada a -20°C até a realização dos procedimentos de esterificação.

HARA

Foram centrifugados 10 mL de leite *in natura* a $17.800 \times g$ por 30 minutos a 4°C. Retiraram-se cerca de 300-400 mg da camada de gordura (*fat cake*) transferindo-os para tubos de ensaio de 15 mL previamente lavados com hexano. Adicionou-se 18 mL/g de gordura de solução hexano:isopropanol (3:2 vol:vol), contendo 50 mg/L de BHT (butilhidroxitolueno) para evitar a oxidação dos ácidos graxos. Agitou-se em *vortex* por 1 minuto. Em seguida foram adicionados 12 mL/g da solução de sulfato de sódio (67 g/L) com o objetivo de separar o hexano do isopropanol. O tubo foi novamente agitado em *vortex* por 1 minuto e deixado em repouso até a completa separação das fases (aproximadamente 1 minuto). A camada superior, contendo o solvente hexano, foi transferida para um tubo de ensaio limpo de 15 mL contendo 1 g de sulfato de sódio anidro. Agitou-se novamente e gás nitrogênio foi insuflado no tubo, o qual permaneceu em repouso por 30 minutos. A camada superior, contendo hexano mais os lipídios do leite, foi transferida para frascos de vidro âmbar, os quais foram armazenados a -20°C.

NOUROOZ

Foram transferidos 17 mL de leite para um funil de separação, ao qual foram adicionados 30 mL de isopropanol, agitando-se por 3 minutos. Em seguida foram acrescentados 22,5 mL de hexano, procedendo-se a nova agitação por 3 minutos. Após repouso de 15 minutos, o conteúdo líquido do funil foi dividido em duas fases: uma inferior aquosa e outra superior que continha os lipídios extraídos. A fase superior foi retirada e reservada em frasco *erlenmeyer* com tampa. A fase inferior foi devolvida para o funil de separação repetindo-se o processo de extração utilizando-se 22,5 mL de hexano. O

último extrato foi adicionado ao primeiro. O hexano contendo os lipídios foi transferido para outro funil de separação, sendo adicionados 15 mL de solução de sulfato de sódio (0,47 M) com o objetivo de retirar a água por completo. Após o tempo para separação das fases (aproximadamente 15 minutos) o hexano (fase superior) foi coletado e armazenado (-20°C) em frasco âmbar.

BLIGH

Foram transferidos 3 mL da amostra de leite para um frasco *erlenmeyer* de 125 mL. Em seguida, foram adicionados 10 mL de metanol, 5 mL de clorofórmio e 1,3 mL de água. Considerando-se a água contida no leite, estes solventes apresentaram relação de 2:1:0,8 respectivamente. O *erlenmeyer* foi vedado e agitado por 30 minutos em uma mesa agitadora. A mistura foi, então, transferida para funil de separação, acrescentando-se 5 mL de clorofórmio e 5 mL de solução de sulfato de sódio anidro (20 g/L). A mistura apresentou assim proporção final de 2:2:1,8 (metanol:clorofórmio:água). Agitou-se por dois minutos, liberando a pressão do funil e esperou-se o tempo necessário para a separação das fases (20-30 minutos). A camada inferior contendo lipídios e clorofórmio foi transferida para um frasco *erlenmeyer* limpo com tampa. Na fase restante no funil de separação adicionou-se mais 10 mL de clorofórmio, agitou-se e esperou separar as camadas, transferindo a camada inferior para o *erlenmeyer* contendo a primeira porção extraída. Esta solução (lipídios e clorofórmio) foi filtrada em papel de filtro contendo cerca de 2 g de sulfato de sódio anidro. O filtrado foi transferido para frascos âmbar identificados e mantidos a -20°C.

CHRISTIE

Cerca de 100 mL de leite foi congelado a -60°C e levado ao liofilizador; posteriormente, aproximadamente 130 mg de leite liofilizado foram transferidos para um tubo de ensaio de tampa rosqueável com septo para vedação, adicionou-se 2 mL de

metilato de sódio (0,5 M), agitou-se em *vortex* (3 minutos) e levou-se a banho-maria a 70-75°C por 15 minutos; após esse tempo, deixou-se esfriar e adicionou-se 75 µL de ácido clorídrico (12 M) deixando a mistura reagir em temperatura ambiente por 15 minutos; adicionou-se a seguir 500 µL de hexano (grau HPLC) e 3 mL de água deionizada; a mistura foi agitada e deixada em repouso para separação das fases. Aproximadamente 250 µL da fase orgânica superior (hexano e ésteres metílicos de ácidos graxos) foram transferidos para *vials* de vidro âmbar, os quais foram mantidos sob refrigeração (-20°C) para posterior análise cromatográfica.

As etapas do processo de esterificação dos ácidos graxos extraídos nos quatro métodos que utilizaram o leite *in natura* (HARTMAN & LAGO, 1986, com modificações de SILVA, 2005) são descritas a seguir.

As amostras de gordura, após descongelamento, foram submetidas à saponificação com hidróxido de sódio e esterificação dos ácidos graxos com metanol na presença de ácido clorídrico. Em um tubo de ensaio com tampa rosqueável, adicionou-se aproximadamente 50-60 mg dos lipídios extraídos e 2,5 mL de hidróxido de sódio (solução 0,5 M em metanol). Os tubos foram tampados e mantidos em banho-maria à 70-75°C por 15 minutos. Após resfriamento em temperatura ambiente, adicionou-se 7,5 mL do reagente de esterificação (40 mL de ácido clorídrico e 960 mL de metanol). A mistura, então, foi novamente mantida em banho-maria à 70-75°C por 10 minutos. Após resfriamento a temperatura ambiente, 500 µL de hexano (grau HPLC) e 5 mL de solução de cloreto de sódio (200 g/L) foram adicionados com o objetivo de extrair os ésteres metílicos. Aproximadamente 250 µL da fase orgânica superior foram transferidos para *vials* de vidro âmbar. A extração foi repetida com mais 250 µL de hexano, retirando-se mais 250 µL da fase superior e transferindo para o mesmo frasco âmbar. Os frascos foram, então,

devidamente etiquetados e mantidos sob refrigeração à -20°C para posterior análise cromatográfica.

O perfil de ácidos graxos nas amostras de gordura obtidas pelos diferentes métodos foi avaliado por cromatografia gasosa sendo utilizado o cromatógrafo à gás (GC) modelo Finnigan 9001. A coluna, os padrões, a vazão dos gases e o programa de temperatura usados para as análises foram os seguintes:

Coluna: SP 2560 (100m x 0,25mm x 0,25 μm) - *SUPELCO*

Padrões:

- Supelco 37 - Component FAME Mix, 10mg/mL em CH_2Cl_2 – *SUPELCO* 47885-U
- Grain FAME Mix, 10 mg/mL em CH_2Cl_2 – *SUPELCO* 47801

Vazão dos gases:

- Injeção no modo split (1:100), 1 μL da amostra.
- Gás carreador – Hélio (30mL/min)
- Make up – Gás Hidrogênio – 30 mL/min
- Ar sintético – 300 mL/min

Programação de temperatura:

- Temperatura do injetor e do detector (FID) – 250°C ;
- Temperatura da coluna: Temperatura inicial 50°C , aumentando a uma taxa de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$. até 170°C , em seguida aumenta $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$. até 220°C , mantendo nessa temperatura por 15 minutos. Tempo total da corrida = 52 minutos.

Os fatores de correção de picos utilizados consistiram no quociente entre a percentagem da área de cada ácido graxo do padrão (fornecido pela empresa) e a porcentagem da área dos ácidos graxos do padrão recuperados quando da injeção no GC.

Obtido o fator de correção multiplicou-se a área de cada ácido graxo da amostra por seu respectivo fator de correção, obtendo-se, dessa forma, a área corrigida.

A proporção relativa de cada ácido graxo na gordura extraída (g/100 g de gordura) das amostras de leite foi avaliada de forma univariada por intermédio de análise de variância de acordo com o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + A_i + M_j + \varepsilon_{(i)j}$$

em que: Y_{ij} = proporção relativa do ácido graxo mensurada na amostra de leite i por intermédio do método de extração j ; μ = constante geral; A_i = amostra de leite i (efeito aleatório); M_j = método de extração j (efeito fixo); e $\varepsilon_{(i)j}$ = erro aleatório, não observável, pressuposto NID (0; σ^2).

As análises foram conduzidas por intermédio do PROC MIXED do SAS (versão 9.1), adotando-se 0,05 como nível crítico de probabilidade para o erro tipo I. Quando verificado efeito significativo para os métodos ($P < 0,05$) procedeu-se à comparação entre estes por intermédio do teste de Tukey-Kramer. Os graus de liberdade foram computados utilizando-se o método de Keward-Roger.

Adicionalmente, os métodos de extração de gordura foram comparados de forma multivariada utilizando-se a técnica de variáveis canônicas, segundo descrições de JOHNSON & WICHERN (1998). As variáveis foram previamente normalizadas, computando-se as distâncias generalizadas de Mahalanobis entre métodos. Os procedimentos multivariados foram conduzidos por intermédio do PROC CANDISC do SAS (versão 9.1).

RESULTADOS

Para todos os métodos foram identificados 21 ácidos graxos nas amostras de leite de cabra, sendo esses em ordem crescente da cadeia carbônica: butírico, capróico, caprílico, cáprico, undecanóico, láurico, tridecanóico, mirístico, miristoléico, pentadecanóico, palmítico, palmitoléico, heptadecanóico, cis-10-heptadecenóico, esteárico, oléico, linoléico, araquídico, ácido linoléico conjugado (CLA), linolênico, erúico.

Dos 21 ácidos graxos mensurados e identificados, com exceção dos ácidos láuricos e tridecanóico ($P > 0,05$), foram encontradas diferenças significativas ($P < 0,05$) entre métodos de extração para a concentração (g/100 g de ácidos graxos) desses na gordura extraída (Tabelas 3 e 4). De forma geral, observaram-se diferenças mais proeminentes com a aplicação do método CHRISTIE, o qual apresentou concentrações expressivamente superiores ($P < 0,05$) em relação aos demais métodos principalmente para os ácidos graxos de cadeia curta e média butírico, capróico e caprílico (Tabela 3) e para os ácidos graxos de cadeia longa araquídico e CLA (Tabela 4).

A evaporação dos 2 mL (proposto em princípio por HARTMAN & LAGO, 1986, com modificações de SILVA, 2005), oriundos da extração final dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, sob injeção de gás nitrogênio, ocasionou a perda total dos ácidos graxos butírico (C4) e capróico (C6) (Figura 2). Neste contexto, modificação do processo teve de ser realizada para concentração da amostra, mantendo-se simultaneamente a sensibilidade para mensuração desses ácidos graxos. Esta modificação será discutida posteriormente nesta dissertação.

Tabela 3 - Médias de mínimos quadrados para a concentração de ácidos graxos de cadeia curta e média (g/100 g de ácidos graxos) em função dos métodos de extração

Ácido Graxo	Método ¹					EPM	Valor-P
	Christie	Feng	Nouroouz	Bligh	Hara		
Butírico	4,176a	0,879b	0,713b	0,705b	0,673b	0,145	<0,0001
Capróico	2,804a	0,896b	0,681b	0,648b	0,643b	0,095	<0,0001
Caprílico	3,467a	2,241b	1,823b	1,785b	1,734b	0,127	<0,0001
Cáprico	9,777a	8,917ab	7,682b	7,81b	7,679b	0,349	0,0001
Undecanóico	0,156a	0,093b	0,117ab	0,097b	0,115ab	0,011	0,0014
Láurico	3,971	4,015	3,836	3,906	3,727	0,114	0,2173
Tridecanóico	0,141	0,135	0,106	0,111	0,111	0,015	0,4044
Mirístico	10,023b	10,288ab	10,269ab	10,674a	10,171b	0,124	0,0025
Miristoléico	0,528a	0,478ab	0,468ab	0,446b	0,472ab	0,017	0,0133

¹ Médias na linha, seguidas por letras diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey-Kramer (P<0,05).

Tabela 4 - Médias de mínimos quadrados para a concentração de ácidos graxos de cadeia longa (g/100 g de ácidos graxos) em função dos métodos de extração

Ácido Graxo	Método ¹					EPM	Valor-P
	Christie	Feng	Nouroouz	Bligh	Hara		
Pentadecanóico	0,853a	0,782ab	0,763b	0,782ab	0,782ab	0,025	0,0492
Palmítico	26,164c	26,667bc	27,076bc	28,862a	27,456b	0,337	<0,0001
Palmitoléico	1,503a	1,498a	1,345b	1,331b	1,256b	0,07	0,0407
Heptadecanóico	0,918a	0,765b	0,748b	0,78b	0,78b	0,031	0,0020
Cis-10-Heptadecenóico	0,401b	0,284b	0,267b	0,25b	0,744a	0,048	<0,0001
Esteárico	8,635b	10,838a	10,863a	10,324a	10,557a	0,491	0,0025
Oléico e isômero	25,073b	26,025ab	26,765a	25,351ab	25,617ab	0,398	0,0378
Linoléico	2,839ab	2,784ab	2,959a	2,571b	2,91ab	0,087	0,0388
Araquídico	0,481a	0,28b	0,246b	0,247b	0,248b	0,026	<0,0001
Cla	0,458a	0,276b	0,268b	0,231b	0,271b	0,02	<0,0001
Linolênico	0,939a	0,693bc	0,736b	0,597c	0,699bc	0,026	<0,0001
Erucico	0,267a	0,229b	0,264a	0,225b	0,248ab	0,009	0,0011

¹ Médias na linha, seguidas por letras diferentes, são diferentes pelo teste de Tukey-Kramer (P<0,05).

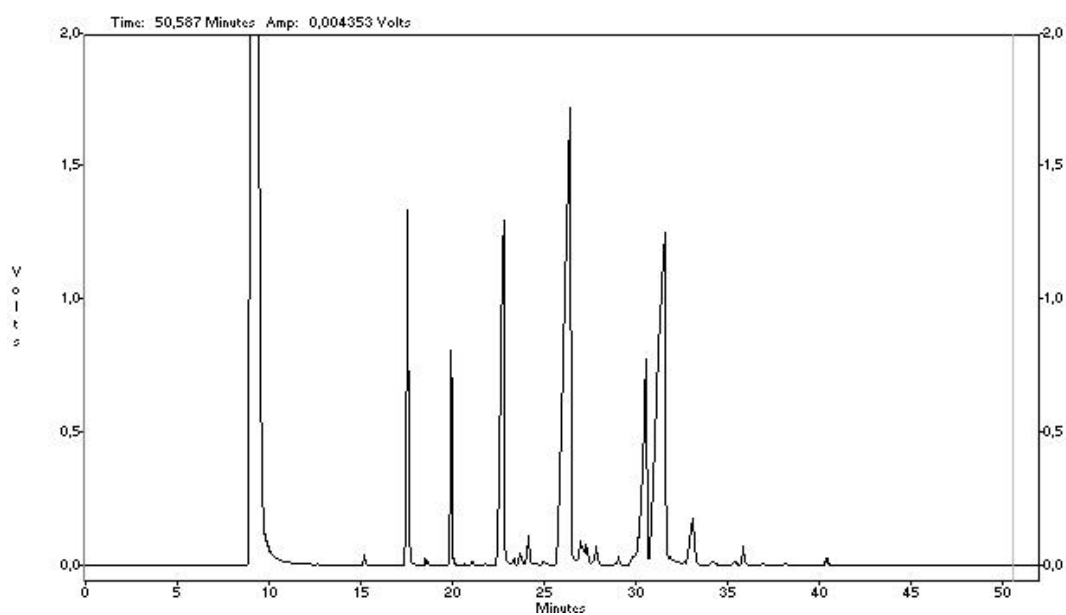


Figura 2 – Cromatograma de uma amostra evaporada sob gás nitrogênio e ressuspendida com 50 μ L de hexano. O primeiro pico que saiu a aproximadamente 15 minutos de corrida corresponde ao caprílico (C8), indicando a perda dos ácidos graxos butírico(C4) e capróico(C6) durante o processo de evaporação.

Adicionalmente, no cromatograma das amostras oriundas do método de extração HARA, surgiu um pico proeminente, não identificado, que saía a aproximadamente 22,44 minutos de corrida, um pouco antes do mirístico (C14) (Figura 3).

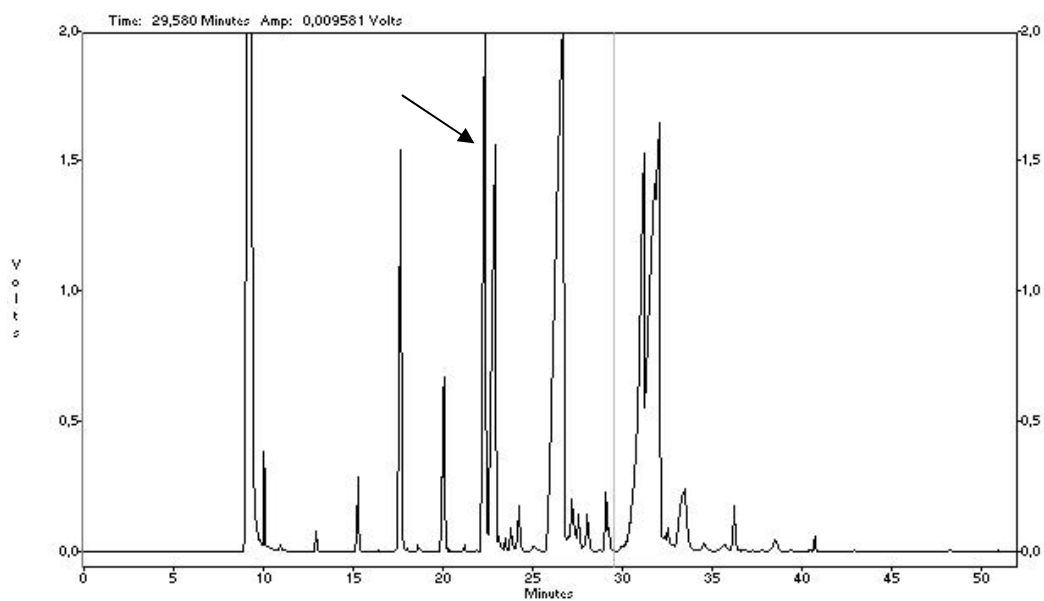


Figura 3 – Cromatograma de uma amostra em que a gordura do leite foi extraída segundo o método HARA. A seta indica o pico desconhecido que saiu a aproximadamente 22,44 minutos de corrida, um pouco antes do mirístico (C14).

A realização do processo de extração do leite sem o BHT e do processo de extração sem leite (branco verdadeiro) comprovou que o pico desconhecido era provocado pelo BHT (butilhidroxitolueno) que estava em alta concentração (Figura 4).

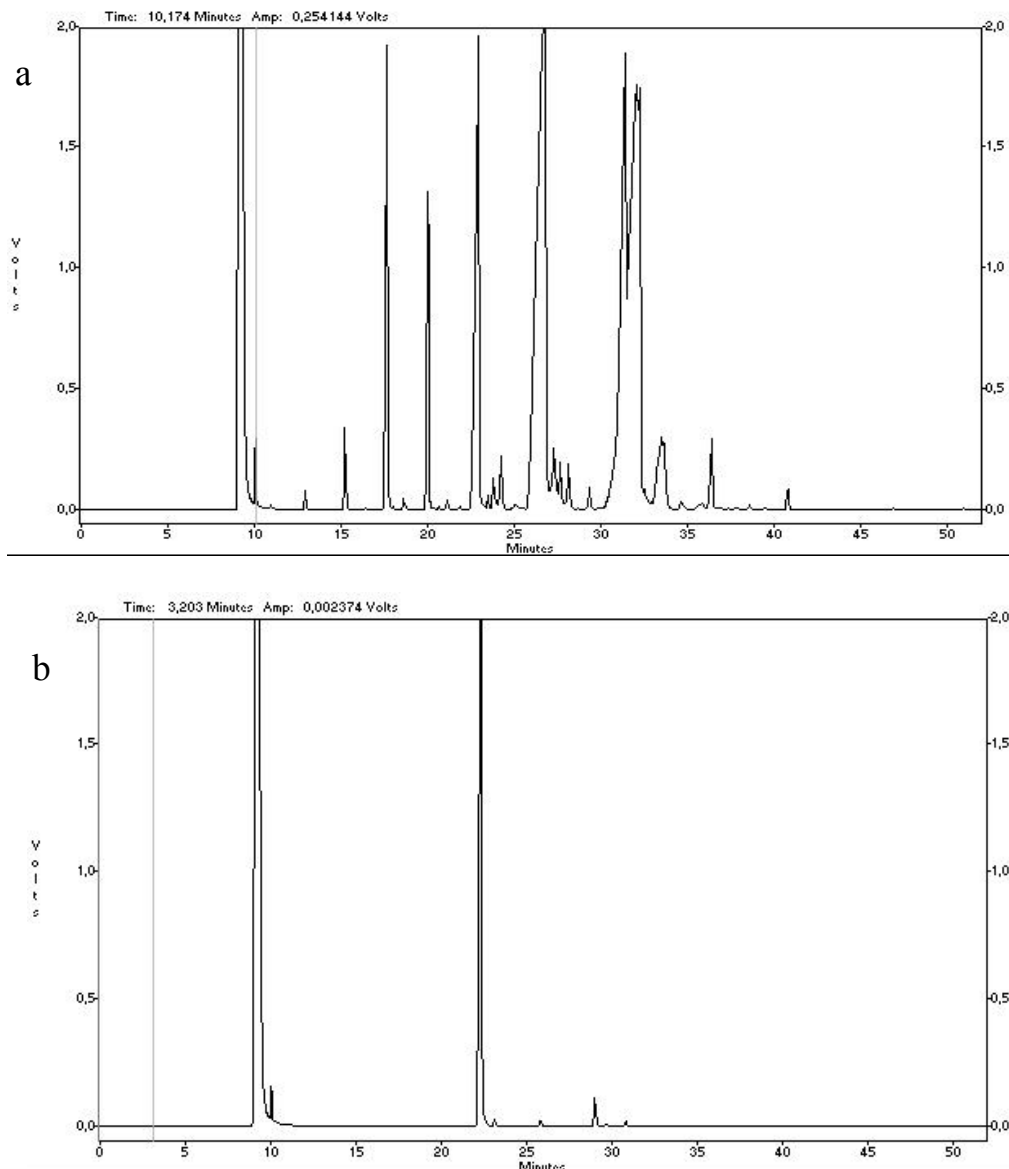
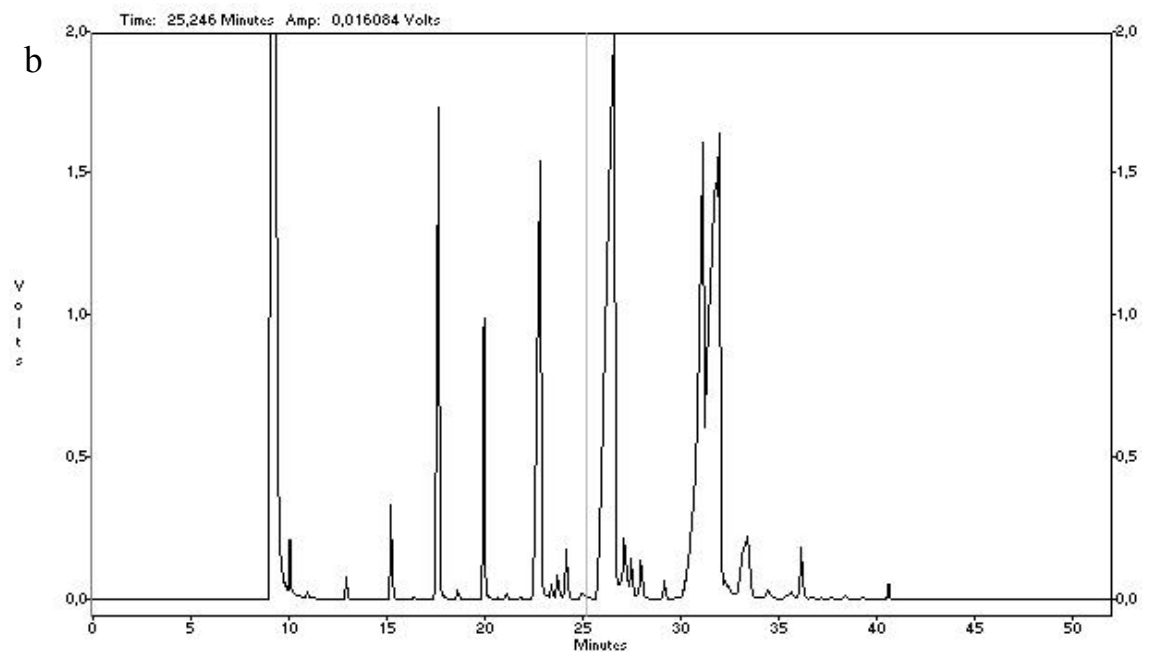
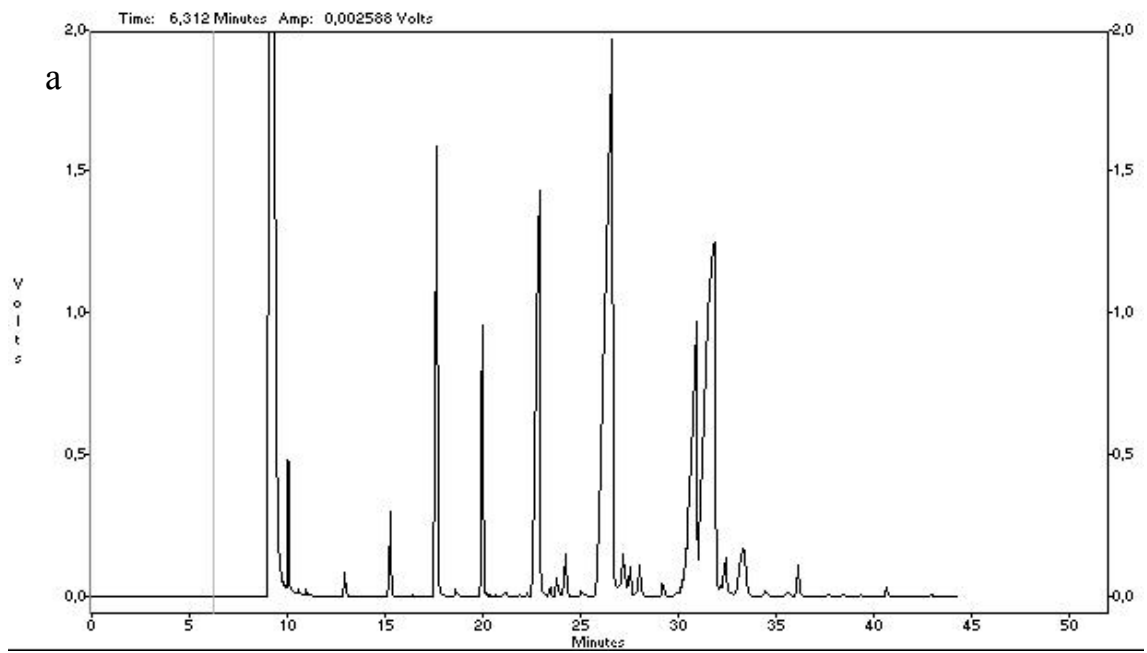


Figura 4 – Em ‘a’ está representado o cromatograma da extração da gordura do leite segundo o método HARA, sem a presença do BHT. Em ‘b’ o cromatograma do procedimento de extração sem a amostra.

Os demais métodos analíticos apresentaram cromatogramas característicos com destaque para o método CHRISTIE, o qual, visivelmente, apresentou picos correspondentes aos ácidos graxos de cadeia curta e média mais proeminentes em relação aos demais métodos de análise. (Figura 5)



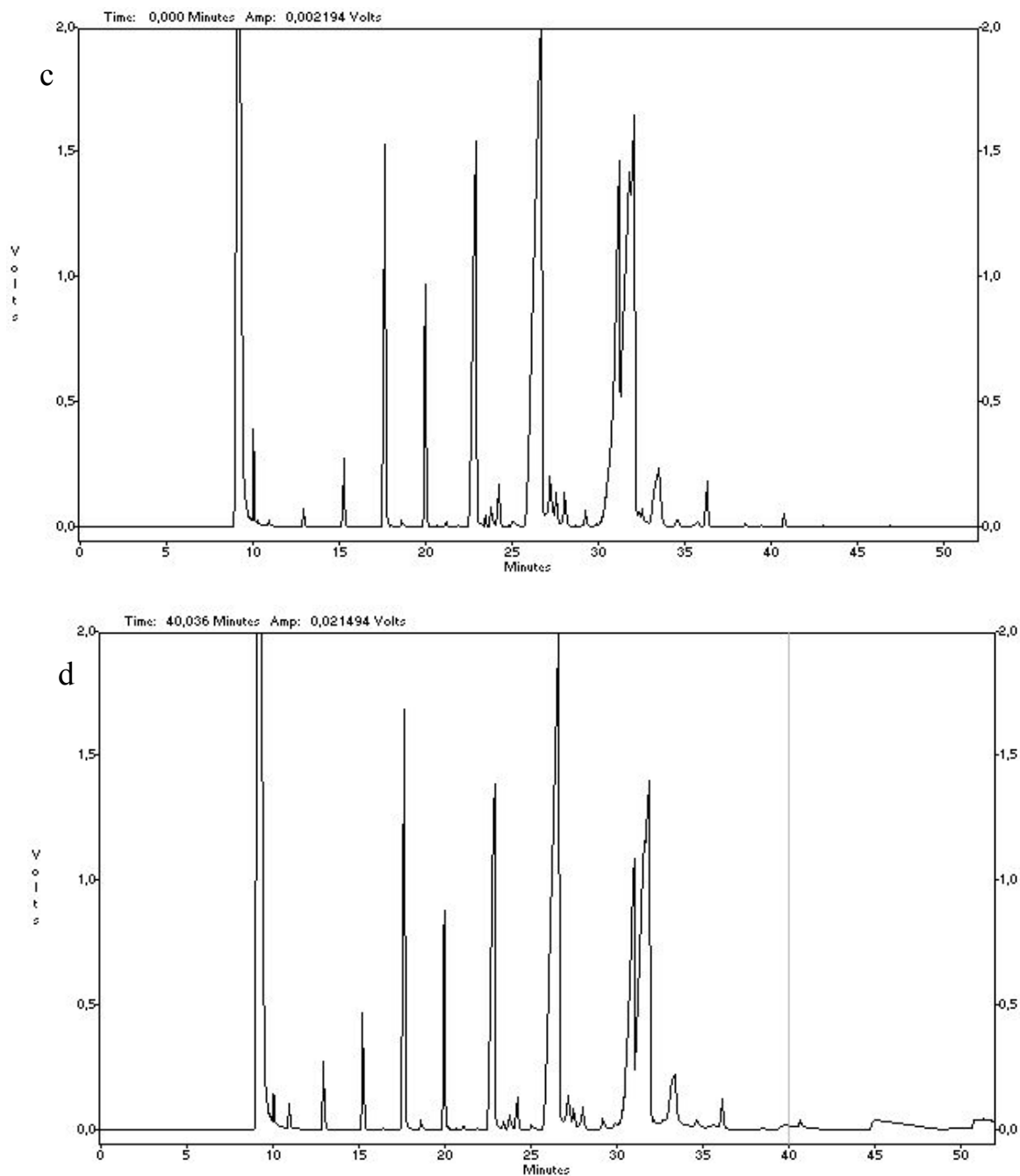


Figura 5 – Cromatogramas representativos das amostras resultantes dos seguintes métodos de extração da gordura do leite: a) BLIGH; b) FENG c) NOUROOZ; d) CHRISTIE.

Considerando-se todas as informações simultaneamente, verificou-se que todos os métodos de extração dos ácidos graxos do leite de cabra avaliados produziram resultados diferentes ($P < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 – Distância generalizada de Mahalanobis relativa à composição da gordura do leite em função do método de extração

Método	Método ¹			
	Feng	Nouroouz	Bligh	Hara
Christie	258,8 <0,0001	270,0 <0,0001	242,5 <0,0001	231,9 <0,0001
Feng	—	16,8 0,0289	19,6 0,0122	40,7 <0,0001
Nouroouz		—	17,1 0,0260	41,0 <0,0001
Bligh			—	27,4 0,0013

¹ Os valores subscritos corresponde ao nível descritivo de probabilidade para o erro tipo I associado à $H_0: D = 0$.

Na avaliação multivariada definiu-se pela avaliação de duas variáveis canônicas, as quais representaram 93,12% da variação total entre métodos de extração de gordura (Tabela 6).

A primeira variável canônica representou 83,16% da variação total entre métodos. A avaliação gráfica de seu comportamento permitiu evidenciar que o método CHRISTIE se destacou de forma proeminente dos demais, não havendo divergência clara entre esses (Figura 6). Entre os coeficientes da primeira variável canônica verificou-se maior peso para aqueles correspondentes aos ácidos butírico, capríco, caprílico e esteárico (Tabela 6). Isto corrobora os resultados obtidos com a análise univariada, na qual se verificou diferenças proeminentes do método CHRISTIE em relação aos demais, com diferenças significativas para esses ácidos graxos (Tabelas 3 e 4). As concentrações de ácido esteárico comportaram-se de forma inversa a esses ácidos, com menores concentrações obtidas com o método CHRISTIE em relação aos demais (Tabela 4).

A segunda variável canônica representou 9,96% da variação entre métodos e propiciou diferenciação entre os demais métodos de extração (Tabela 6). Neste contexto, observou-se que o método HARA de extração da gordura do leite divergiu dos demais (Figura 6). Os coeficientes canônicos de maior peso foram aqueles associados aos ácidos butírico, capróico, esteárico e oléico (Tabela 6).

Tabela 6 - Coeficientes canônicos padronizados utilizados para discriminação multivariada entre métodos de extração da gordura do leite

Ácido Graxo	Variável Canônica	
	Primeira	Segunda
Butírico	2,035	-5,881
Capróico	4,798	8,381
Caprílico	-2,296	-1,561
Cáprico	-0,421	-0,023
Undecanóico	-0,836	0,303
Láurico	-0,154	1,155
Tridecanóico	-0,456	0,077
Mirístico	-1,113	0,997
Miristoléico	-0,587	0,884
Pentadecanóico	1,205	-0,336
Palmítico	-0,452	0,522
Palmitoléico	0,114	0,188
Heptadecanóico	-0,021	0,894
Cis-10-Heptadecenóico	0,162	-1,642
Estearico	-2,076	2,749
Oléico e isômero	-1,347	2,159
Linoléico	-0,672	0,247
Araquídico	1,093	0,712
cla	-1,342	0,226
Linolênico	0,446	-0,158
Erucico	1,049	-0,195
Auto Valor	43,096	5,147
Importância Relativa (%)	83,16	9,96

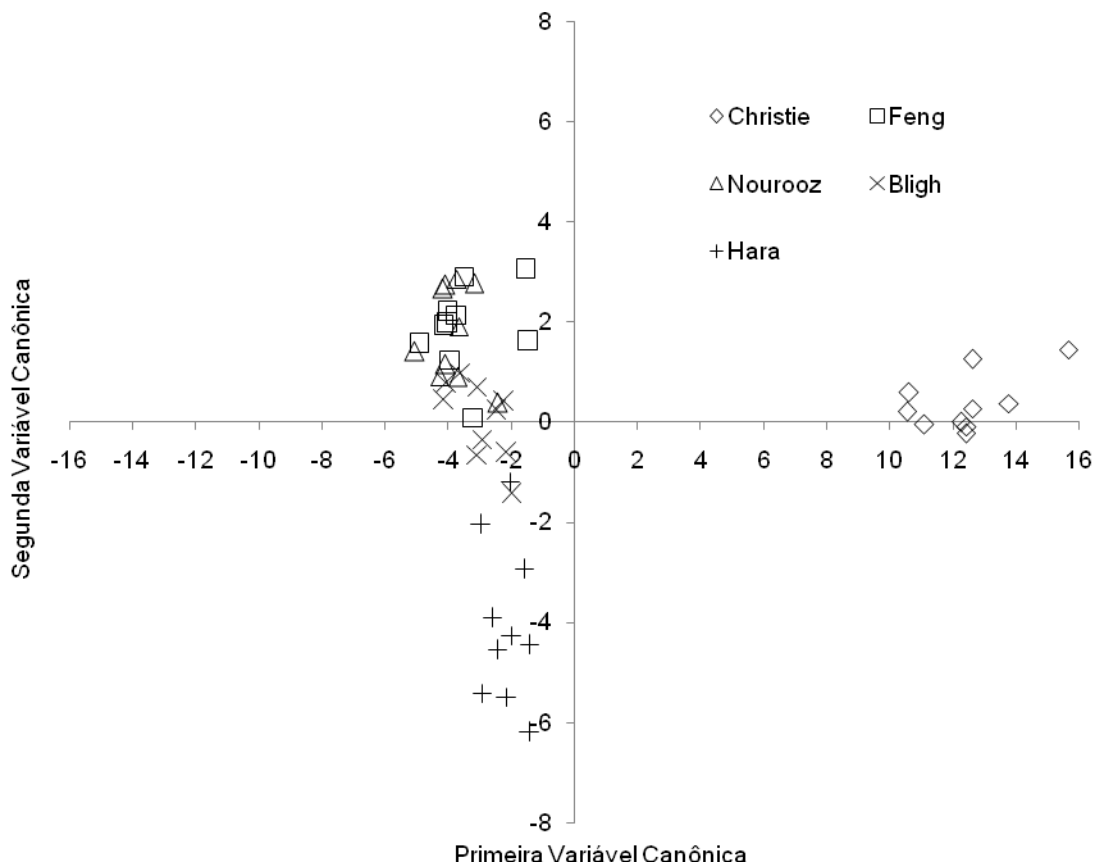


Figura 6 – Dispersão das estimativas da primeira e segunda variáveis canônicas produzidas a partir da composição da gordura do leite em função do método de extração.

DISCUSSÃO

Em princípio, o processo de extração dos ésteres metílicos dos ácidos graxos sugere a adição de 2 mL de hexano ao tubo de ensaio, retirando-se em seguida 1 mL, armazenando em *vial* para cromatografia, adição de mais 1 mL de hexano, retirando novamente mais 1 mL e colocando no mesmo *vial*, fornecendo, assim, um volume final de 2 mL. Porém, quando se retirou 1 μ L desse volume e se injetou no cromatógrafo, observou-se que a amostra estava muito diluída. Indicando, desse modo, a necessidade de concentrar a amostra evaporando este volume de 2 mL com injeção de gás nitrogênio e adição de 50 μ L de hexano. Este processo, entretanto, ocasionou a perda total dos ácidos graxos butírico (C4) e capróico (C6) e uma diminuição substancial no ácido graxo caprílico (C8) (Figura 2).

Para solucionar este problema foi necessário concentrar a amostra sem o processo de evaporação. Desse modo procedeu-se a concentração da amostra durante o processo de extração dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, adicionando-se 500 μ L ao tubo de ensaio, retirando 250 μ L e armazenando em *vial*, adicionou-se mais 250 μ L, retirando novamente 250 μ L, obtendo, assim, um volume final de 500 μ L ao invés de 2 mL. Desta forma foi possível recuperar os ácidos graxos butírico e capróico (Figura 5).

No método de extração da gordura do leite HARA sugere-se a adição de 50 mg de BHT na solução de hexano:isopropanol; porém, neste trabalho, esses foram adicionados ao tubo de ensaio. O BHT é um composto cuja fórmula estrutural apresenta uma hidroxila ligada a um anel benzeno (Figura 7). A ressonância das duplas ligações do anel aumenta a reatividade do grupo hidroxila, fazendo com que ele reaja de forma similar ao grupo

carboxila (-COO⁻) nas reações químicas (BARBOSA, 2004). Desta forma, durante o processo de esterificação dos ácidos graxos houve a formação de ésteres metílicos do BHT e, como este estava em concentração elevada, ocorreu sua detecção pelo cromatógrafo.

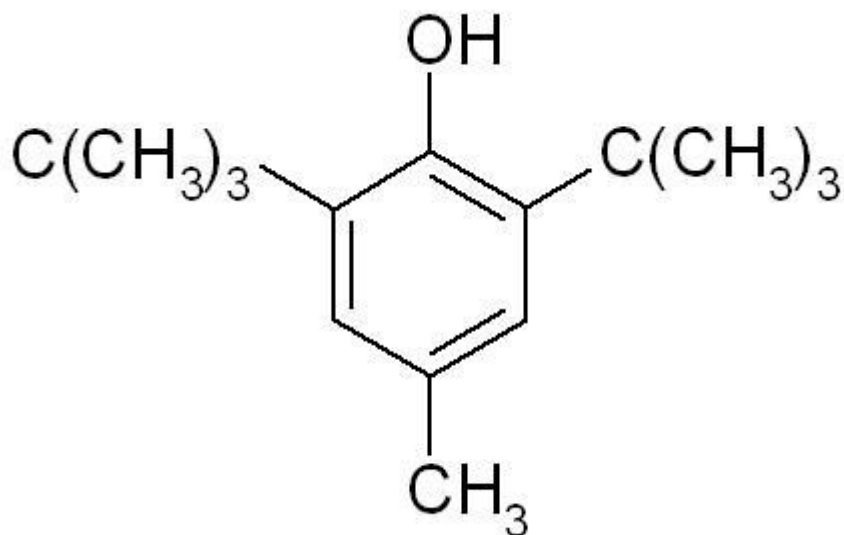


Figura 7 – Fórmula estrutural do butilhidroxitolueno (BHT).

A área do pico correspondente ao BHT foi eliminada da área total e distribuída proporcionalmente para os ácidos graxos.

No presente trabalho ficou evidenciado que, para o leite de cabra, o método de extração de gordura do leite CHRISTIE proporcionou maior recuperação dos ácidos graxos de cadeia curta e média em relação aos demais métodos. As maiores diferenças foram observadas nos ácidos graxos butírico (C4), capróico (C6) e caprílico (C8), com médias de concentrações (g/100g de ácidos graxos) relevantemente superiores aos demais métodos de extração (Tabela 3). Nestes residiram a maior importância relativa para discriminação entre o método CHRISTIE e os demais (Tabela 6 e Figura 6). Este método apresenta como principal diferença a utilização de procedimento de liofilização em detrimento a processos de extração por solvente e/ou centrifugações. Desta forma, de acordo com os resultados obtidos, extrações por solventes orgânicos ou centrifugação ou ambos parecem ser pouco

eficientes em propiciar a adequada extração e subsequente análise dos ácidos graxos de menor cadeia no leite de cabra. Este fato se torna relevante uma vez que as características peculiares do leite caprino se devem em grande parte ao fato desse tipo de leite possuir altos teores desses ácidos graxos de cadeia curta e média, os quais são benéficos à saúde humana (CHILLIARD et al., 2003; DUBEUF et al., 2004). Ressalta-se que a discriminação apontada pelo ácido esteárico na primeira variável canônica poderia constituir reflexo de se analisar a proporção dos ácidos graxos na gordura. Ou seja, com a maior participação dos ácidos graxos de cadeia curta, esperar-se-ia diluição na participação dos demais ácidos graxos. Este fato foi percebido na análise univariada principalmente para os ácidos mirístico, palmítico, esteárico e oléico (Tabelas 3 e 4).

Analisando-se os métodos percebe-se que a exposição da amostra ao ambiente e o tempo de extração são fatores preponderantes na recuperação desses ácidos graxos mais voláteis. No método FENG utiliza-se centrifugação em duas etapas para extrair os componentes lipídicos do leite; na primeira etapa o leite é centrifugado a $17.800 \times g$ por 30 minutos à 4°C e na segunda etapa é feita uma centrifugação do *fat cake* à $19.300 \times g$ por 20 minutos em temperatura ambiente. No método HARA utiliza-se inicialmente a centrifugação do leite a $17.800 \times g$ por 30 minutos à 4°C e logo em seguida procede-se à extração por solvente dos lipídeos do *fat cake*. No método NOUROOZ utiliza-se solvente orgânico (hexano) para a extração da gordura do leite em funis de separação. No método BLIGH utiliza-se solvente orgânico (clorofórmio) para a extração da gordura do leite. Em contrapartida, no método CHRISTIE utiliza-se processo no qual a extração e a metilação dos ácidos graxos são feitas conjuntamente, diretamente a partir do leite liofilizado.

A liofilização constitui processo de secagem constituído de três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. O material, previamente congelado em temperaturas iguais ou inferiores a -40°C é desidratado por sublimação,

utilizando-se baixas temperaturas de secagem a pressões reduzidas. A etapa de congelamento é crucial para o processo de liofilização. Desta forma há formação de cristais pequenos entre as moléculas de água o que preserva a estrutura química dos produtos, os quais podem ser novamente hidratados mantendo as propriedades organolépticas originais (MNERIE, 2008). Dessa forma, como a liofilização preserva as características bioquímicas do leite, consegue-se, assim, garantir a caracterização dos perfis de ácidos graxos mais próximos dos reais teores desses lipídios no leite de cabra, sem perdas de produtos voláteis por manipulação da amostra durante os procedimentos de extração da gordura.

Observando-se a dispersão da segunda variável canônica (Figura 6) percebe-se que dentre os métodos que não utilizaram o leite liofilizado o método descrito HARA se diferenciou negativamente dos demais. Sendo os ácidos graxos butírico, capróico, esteárico e oléico os principais responsáveis pela diferença (Tabela 6). A diminuição na recuperação dos dois primeiros ácidos graxos expressou em aumento nos teores dos dois últimos. Como este método realiza a extração da gordura do leite por centrifugação e por solvente orgânico ele promove uma dupla perda, associada aos dois procedimentos, dos ácidos graxos de cadeia curta e média.

Os métodos NOUROOZ e BLIGH apresentam ainda a desvantagem de usarem solventes orgânicos em suas metodologias de extração. Em NOUROOZ utiliza-se hexano, o qual pode causar distúrbios funcionais ou mutações morfológicas, dores de cabeça, náuseas, tonteados, perturbações visuais e auditivas, além de excitação. Pode produzir depressão moderada, seguida a falta de coordenação motora, confusão mental, podendo evoluir até a perda da consciência, quando em inalação prolongada (FISPO_PETROBRÁS). No método BLIGH, por sua vez, utiliza-se clorofórmio que é absorvido prontamente pela pele podendo causar efeitos tóxicos. O contato repetido causa desidratação da pele e dermatite irritante, irritação para olhos, nariz e garganta; se inalado

causará dores de cabeça, náuseas, tontura ou perda de consciência, podendo gerar graves efeitos irreversíveis para a saúde em caso de exposição prolongada (MERCK). O método FENG, por outro lado, apresenta-se com vantagens no que diz respeito à saúde do ser humano e à preservação do meio ambiente por usar apenas processos físicos de centrifugação para extrair a gordura do leite.

O método CHRISTIE apresentou média para a concentração (g/100g de ácido graxo) do ácido linoléico conjugado (CLA) de 0,458. Este valor é praticamente o dobro encontrado nos demais métodos analíticos. Na literatura científica encontram-se alguns valores para a concentração do CLA em leite de cabra: 1,43 em MAIA et al. (2006); 0,69 em RODRÍGUEZ-ALCALÁ et. al. (2009) e 1,84 em SANTOS et al. (2011), variando de acordo com o tratamento fornecido às cabras. As ligações duplas conjugadas presentes no CLA são altamente reativas e sujeitas a sofrerem processos de oxidação mais intensos que as duplas ligações químicas não conjugadas encontradas nos demais ácidos graxos. Assim, como os métodos FENG, HARA, NOUROOZ e BLIGH são mais demorados, exigem mais etapas de manipulação da amostra e utilizam processos de extração da gordura relativamente agressivos como extração por solventes orgânicos e centrifugações a altas velocidades, eles podem ter ocasionado uma perda na recuperação do CLA por oxidação desse ácido graxo. O método CHRISTIE, ao contrário, é rápido e não possui a etapa de extração da gordura do leite, o que proporciona, provavelmente, uma maior preservação da integridade do CLA presente nas amostras. Desse modo, o método CHRISTIE é, possivelmente, dentre os métodos avaliados, aquele que melhor recupera o CLA durante o processo de extração e metilação da gordura do leite de cabra, o que se torna especialmente relevante devido à importância terapêutica desse ácido graxo para os seres humanos.

CONCLUSÃO

O método CHRISTIE de extração da gordura do leite apresenta-se como o mais indicado para as rotinas laboratoriais na caracterização do perfil de ácidos graxos em leite de cabra por ser mais rápido, utilizar quantidades mínimas de reagentes químicos e garantir maior recuperação dos ácidos graxos de cadeia curta e média em leite de cabra.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFÉREZ, M.J.M.; BARRIONUEVO, M.; ALIAGA, T.L. et al. Digestive utilization of goat and cow milk fat in malabsorption syndrome. **Journal of Dairy Research**, v.68, p.451-461, 2001.
- ATTAIE, R.; RICHTER, R.L. Size distribution of fat globules in goat milk. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.940-944, 2000.
- BARBOSA, L.C.A. **Introdução à química orgânica**. São Paulo: Prentice Hall, editora UFV, 2004.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry**; v.37, p.911-917, 1959.
- CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; ROUEL, J. et al. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. **Journal of Dairy Science**, v.86, p.1751-1770, 2003.
- CHILLIARD, Y.; ROUEL, J.; LEROUX, C. Goat's alpha-s1 casein genotype influences its milk fatty acid composition and delta-9 desaturation ratios. **Animal Feed Science and Technology**, v.131, p.474-487, 2006.
- CHRISTIE, W.W.; **Chromatographic and spectroscopic analysis of lipids: General principles**. v.3 p.25-49. Ed. Oxford: Pergamon Press. 1982.
- COULON, J.B.; PRIOLO, A. La qualité sensorielle des produits laitiers et de la viande dépend des fourrages consommés par les animaux. **INRA Productions Animales**, v.15, p.333-342, 2002.
- DONNELLY, W.J. **New functions of dairy products for human health**. Porto Alegre – RS, p.63-68. IX Congresso Pan-americano do Leite (Tendências e avanços do

- Agronegócio de leite nas américas: mais leite = mais saúde). Ed. Carlos Eugênio Martins et al. 2006.
- DUBEUF, J.P.; MORAND-FEHR, P.; RUBINO, R. Situation, changes and future of goat industry around the world. **Small Ruminant Research**, v.51, p.165-173, 2004.
- EKNAES, M.; KOLSTAD, K.; VOLDEN, H.; HOVE, K. Changes in body reserves and milk quality throughout lactation in dairy goats. **Small Ruminant Research**, v.63, p.1-11, 2006.
- FENNEMA, O.R. **Food chemistry**. 3 ed. New York: Marcel Dekker Inc, 1996. 1069p.
- FENG, S.; LOCK, A.L.; GARNSWORTHY, P.C. A rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.3785-3788, 2004.
- FISPQ. **Ficha de informação de segurança de produto químico**. Petrobrás. <http://www.higieneocupacional.com.br/download/hexano-petrobras.pdf>.
- FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANNE STANLEY, G. H. A simple method for isolate and purification of total lipid from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v.226, p.497-509, 1957.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS - FAO. 1999. v.53, n.156,p.251, Roma, Itália., 2001
- GUÉGUEN, L. La valeur nutritionnelle minérale du lait de chèvre. Actes du colloque: Le lait de chèvre, un atout pour la santé. INRA Editions, n.81, p.65-75, 1997.
- GURR, M.I. **Role of fats in food and nutrition**. London: Elsevier, 1984. 170p.
- HACHELAF, W.; BOUKHRELD, M.; BENBOUABDELLAH, M. et al. Digestibilité des graisses du lait de chèvre chez des enfants présentant une malnutrition d'origine digestive. Comparaison avec le lait de vache. **Le lait**, v.73, n.4-5, p.593-599, 1993.

- HARA, A.; RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. **Analytical Biochemistry** v.90, p.420-426, 1978.
- HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters. **Laboratory Practice**, v.22, p.475-476, 1986.
- JENNESS, R. Composition and characteristics of goat milk: review 1968-1979. **Journal of Dairy Science**, v.63, p.1605-1630, 1980.
- JOHNSON, R.A.; WICHERN, D.W. **Applied multivariate statistical analysis**. 4.ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. 816p.
- LARA-VILLOSLADA, F.; OLIVARES, M.; JIMÉNEZ, J. et al. Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model of atopy. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v.39, p.354-360, 2004.
- LÓPEZ-ALIAGA, L.; ALFÉREZ, M.J.M.; NESTARES, P.B. et al. Goat milk feeding causes an increase in biliary secretion of cholesterol and a decrease in plasma cholesterol levels in rats. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.1024-1030, 2005.
- LUNA, P.; JUAREZ, M.; DE LA FUENTE, M. A. Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.3377-3381, 2005.
- MAIA, F. J. Inclusão de fontes de óleo na dieta de cabras em lactação: produção, composição e perfil dos ácidos graxos do leite. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.1504-1513, 2006.
- MARANGONI, F; AGOSTINI, C; LAMMARDO, A.M. et al. E. Polyunsaturated fatty acids in maternal plasma and in breast milk. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. **Elsevier Science Ltda**. v.66 p.535-540; 2002.

- MAYES, P.A. Lipídeos de importância fisiológica. In: MURRAY, R.H.; GRANNER, D.K.; MAYES, P.A. et al. (Eds.). **Harper: bioquímica**. São Paulo: Atheneu, 1994. p.142-154.
- McCULLOUGH, F.S.W. Nutritional interest of goat's milk – **Present information and future prospects**. Zaragoza, Spain, 2004 p.1-7, session 5. International symposium (The future of the sheep and goat dairy sectors). 2004.
- MERCK in http://www.merck-chemicals.com/brazil/cloroformio/MDA_CHEM-102442/p_07ub.s1LtJkAAAEW4.EfVhTl.
- MILINSK, M.C.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J.V. et al. Comparative analysis of eight esterification methods in the quantitative determination of vegetable oil fatty acid methyl esters (FAME). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.19, p.1475-1483, 2008.
- MNERIE, D. Lyophilization, Erasmus programme, Politehnica University of Timisoara Romania, České Budějovice, 2008.
- MORETTO, E.; FETT, R. **Óleos e gorduras vegetais (processamento e análises)**. 2. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 1989. 179p.
- NOUROOZ-ZADEH, J.; APPELQVIST, L.A. Cholesterol oxides in swedish foods and food ingredients: milk powder products. **Journal of Food Science**, v.53, p.74-79, 1988.
- ORNELLAS, A., ORNELLAS, L.H. **Alimentação da criança**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1983. 455p.
- QUEIROGA, R. C. R. E.; COSTA, R. G.; BISCONTINI, T. M. B. et al. Influência do manejo do rebanho, das condições higiênicas da ordenha e da fase de lactação na composição química do leite de cabras Saanen. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.430-437, 2007.

- RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L. M.; HARTE, F.; FONTECHA, J. Fatty acid profile and CLA isomers content of cow, ewe and goat milks processed by high pressure homogenization. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p.32-36, 2009.
- ROESE-GOTTLIEB. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists** (W. Horwitz, Ed.), 15th ed. Method 989.05. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, U.S.A 1990.
- SANTOS, S. F.; BOMFIM, M. A. D.; CÂNDIDO, M. J. D. et al. Efeito da casca de mamona sobre a produção, composição e ácidos graxos do leite de cabra. **Archivos de Zootecnia**. v.60, p.113-122, 2011.
- SILVA, M.H.L. **Teor de lipídeos e composição em ácidos graxos do leite humano**. Viçosa, 2001. 81p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- SILVA, M. M. C. **Suplementação de lipídios em dietas para cabras leiteiras**. Viçosa, 2005, 108p. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa. 2005.
- SILVA, P. V. **Leite caprino: caracterização físico-química, perfil de ácidos graxos e avaliação biológica (ratos fêmeas *wistar*)**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial). Universidade Federal de Pelotas, 2009.
- SMEDES, F.; ASKLAND T.K. Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination method. **Marine Pollution Bulletin**, v.38, p.193-201, 1999.
- STEIJNS, J.M. Milk ingredients as nutraceuticals. **International Journal of Dairy Technology**, v.54, p.81-88, 2001.
- TANAMATI, C; OLIVEIRA, C.C.; VISENTAINER, J.V. et al. Comparative study of total Lipids in beef using chlorinated solvent and low toxicity solvents methods. **Journal of the American Chemists' Society**; 82:1-5, 2005.

TONIAL, I.B.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; et al. Avaliação de diferentes métodos de extração lipídica sobre a composição de ácidos graxos poliinsaturados em leite de vaca. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.59, nº1, 2009.

TOUHAMI, M. **Actes du colloque: Le lait de chèvre, un atout pour la santé**. INRA Editions, Paris. n.81, p.93-100, 1997.