

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Análise do ácido linoléico conjugado em carne bovina

por RMN

Roberta Manzano Maria

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Química analítica)

Orientador: Dr. Luiz Alberto Colnago

São Carlos

2009

Dedico este trabalho...

A Deus

*Aos meus pais José Roberto e Roseli
e à minha irmã Renata por todo amor,
carinho, incentivo e compreensão.*

AGRADECIMENTOS

A Deus pela sua infinita bondade e misericórdia que teve comigo, e pela presença sempre em meu coração nos momentos de aflição.

Ao meu orientador Dr. Luiz Alberto Colnago pela enorme contribuição científica e profissional nessa etapa tão importante da minha vida, como também agradeço por acreditar em mim e por toda amizade e dedicação que a mim foram dispensadas. Meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Lucimara Aparecida Forato por sua prestativa ajuda nessa etapa da minha vida.

Aos meus amigos muito especiais do grupo de RMN da Embrapa: Luiza, Gabriela, Maiara, Fabiana, Matheus, Lucinéia, Lucimar, Paulo, Poliana, Netto, Fernando, Giovanni, Thiago, Cátia, Fayene, Lucio pela grande amizade que construímos nessa fase, pelo carinho e pela enorme ajuda.

À todos meus amigos que conquistei na Embrapa Instrumentação Agropecuária e no IQSC.

À Embrapa Instrumentação Agropecuária pela infra-estrutura, por toda ajuda para que esse sonho se realizasse.

À Silvia e à Andréia (IQSC) por toda a atenção e ajuda.

Ao Instituto de Química de São Carlos – USP, por todo o suporte acadêmico.

À Juliana Alberice por suas palavras e grande ajuda que contribuiu para que esse objetivo fosse alcançado.

À minha família, meu pai, minha mãe e minha irmã agradeço de todo o meu coração pelo amor e a presença em minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo suporte financeiro através do processo 135727/2008-1.

Muito obrigada!

RESUMO

A carne bovina é considerada um alimento altamente nutritivo, sendo uma fonte de proteínas e vitaminas, além de minerais tal como ferro e zinco. Por outro lado, a carne vermelha atualmente tem sido associada a doenças cardiovasculares e ao câncer. No entanto, essa associação vem sendo contestada, pois a carne de ruminantes bem como o leite são fontes naturais do ácido linoléico conjugado (CLA, do inglês "*conjugated linoleic acid*"), o qual possui várias propriedades benéficas, como atividade anticarcinogênica, redução de gordura corporal, entre outras. Essas propriedades têm sido observadas em estudos com animais modelos, mas também pesquisas apontam tais benefícios para os humanos. Vários estudos têm sido realizados para aumentar a produção de CLA pelos ruminantes no Brasil. Nesse contexto, se faz necessário o desenvolvimento de métodos rápidos e eficazes para a determinação de CLA em carnes de ruminantes e no leite, pois o método atual é baseado na análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos por cromatografia gasosa, que envolve várias etapas, sendo um método laborioso. Assim, o principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia rápida, baseada na técnica de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) para a determinação do teor do CLA na gordura de carne bovina. Para isso foi avaliada a influência dos principais parâmetros experimentais de RMN de ^1H , como a largura do pulso de radiofrequência, o tempo de repetição, método de excitação seletiva, entre outros parâmetros que podem interferir na razão sinal/ruído e na reprodutibilidade das medidas. Os resultados mostraram que a utilização da RMN de ^1H para a determinação do teor de CLA em carne bovina, além de ser coerente com os dados obtidos por cromatografia gasosa, representa uma abordagem mais rápida e simples para a determinação do teor de CLA em carne bovina.

ABSTRACT

Beef is considered a very nutritive food, since it is a source of proteins and vitamins, besides minerals such as iron and zinc, on the other hand it has been associated to heart diseases and cancer. However, this association has been contested because ruminant meat as well as milk, is a natural source of conjugated linoleic acid (CLA), that has several benefic properties such as anticarcinogenic activity, reduction of body fat and others. These properties have been observed in studies with animals and can be extended to humans. Several studies have been done to increase the concentration of CLA in Brazilian ruminant meat. In this context, it is necessary to develop fast and effective analytical methods to determine CLA in ruminant meat and milk, because the current method, based on the analysis of fatty acid methyl esters by gas chromatography (GC), involves several stages, being laborious. Thus, the main purpose of this work was the development of a fast methodology, based on hydrogen nuclear magnetic resonance technique (^1H NMR) to determine CLA content in beef fat. In consequence, it was evaluated the influence of main experimental parameters from ^1H NMR, such as radiofrequency pulse width, repetition time, method of selective excitation, between others that may interfere in signal-to-noise ratio and reproducibility. The results indicated that the use of ^1H NMR spectroscopy to determine CLA content in beef have high correlation to data obtained by gas chromatography, representing a much faster and simpler methodology to determine CLA content in beef.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos ácidos graxos: (a) oléico,(b) linoléico e (c) linolênico.	18
Figura 2. Estruturas do ácido linoléico (a) e de seus isômeros <i>cis-9, trans-11</i> (b) e <i>trans-10, cis-12</i> CLA (c).	20
Figura 3. Metabolismo lipídico no rúmen e a origem do CLA na carne de ruminantes.	23
Figura 4. Características morfológicas da apoptose e da necrose.	27
Figura 5. Diagrama simplificado das duas principais vias de sinalização da apoptose. (A) via extrínseca (B) via intrínseca.	29
Figura 6. As principais fases do ciclo celular das células que sofrem divisão.	30
Figura 7. Etapas da angiogênese.	34
Figura 8. Demonstração de bovinos terminados em sistema de confinamento (A) e terminados a pasto (B).	37
Figura 9. Espectro de RMN de ^1H do éster metílico do isômero <i>cis-9, trans11</i> CLA.	41
Figura 10. Cortes de carne bovina. Os cortes em destaque foram usados no experimento.	44
Figura 11. Representação da seqüência de pulsos convencional para a aquisição de espectros de RMN de ^1H	47
Figura 12. Representação da seqüência de pulso padrão empregada para análise de RMN de ^{13}C	48
Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C de uma amostra de gordura extraída do músculo contra-filé.	52
Figura 14. Expansão do espectro da Figura 13 na região de 127 a 131 ppm, onde podem ser observados os sinais do $\text{C18:1}\Delta^9$ (AO) e do $\text{C18:2}\Delta^{9,12}$ (AL).	53
Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C da gordura do contra-filé com a seqüência de SSFP promediado por 15 minutos	54
Figura 16. Estrutura química característica de um triglicerídeo (a). Espectro de RMN de ^1H em 400 MHz de gordura intramuscular extraída em CDCl_3 de uma amostra de contra-filé (b).	55
Figura 17. Espectro de RMN de ^1H obtido em 400 MHz da região insaturada do CLA (Amostra padrão - Sigma Aldrich).	57

Figura 18. Espectro de RMN de ^1H da gordura extraída do contra-filé (a) e a expansão da região de 5,0 a 6,5 ppm, na qual é possível observar os sinais característicos do CLA (b) : na amostra analisada (acima) e na amostra padrão (abaixo).	58
Figura 19. Pulso retangular de baixa potência (a) e perfil de excitação resultante (b).	59
Figura 20. a) Perfil no domínio do tempo do pulso formatado do tipo EBURP2;b) Perfil de excitação simulado para o pulso seletivo EBURP2 ⁶⁶	60
Figura 21. Espectro de RMN de ^1H de uma amostra da gordura do músculo do contra-filé utilizando excitação seletiva EBURP2.	61
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H de duas amostras da gordura intramuscular de contra-filé com diferentes teores de CLA.	62
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H obtido para o cálculo do valor médio de CLA em cada amostra analisada.	63
Figura 24. Perfil cromatográfico de uma das amostras analisadas por CG (contra-filé).	65
Figura 25. Comparação entre os métodos de CG e RMN de ^1H para determinação do teor de CLA em carne bovina.	71
Figura 26. Comparação do teor de CLA em diferentes cortes retirados de 3 bovinos obtido por RMN de ^1H	73
Figura 27. Corte cárneo do contra-filé com a porção de gordura intramuscular e a subcutânea.	75
Figura 28. Comparação do teor de CLA extraído de amostras de gordura intramuscular e subcutânea do corte de contra-filé retirados de 14 bovinos distintos.	76
Figura 29. Comparação do teor de CLA obtidos na gordura subcutânea e na gordura intramuscular por RMN de ^1H	77
Figura 30. Espectros de RMN de ^1H em 90 MHz adquiridos com 256 scans, (a) e (b) amostras de contra-filé, (c) padrão do CLA.	79

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Teor do isômero *cis-9, trans-11* CLA em alguns alimentos de origem animal..... **15**
- Tabela 2** - Deslocamentos químicos dos ^{13}C em ppm, para o isômero *cis -9 trans-11* CLA⁶¹ **42**
- Tabela 3** - Deslocamentos químicos típicos para os sinais de RMN de ^1H em lipídeos **56**
- Tabela 4** – Razão de CLA /Glicerol encontrado nas amostras analisadas por RMN de ^1H **64**
- Tabela 5** - Nomenclatura dos ácidos graxos encontrados nas amostras analisadas. **66**
- Tabela 6** - Perfil dos ácidos graxos (g/100g de ácidos graxos totais) em diferentes partes de gordura intramuscular de bovinos obtidos das análises de cromatografia gasosa dos cortes de: contra-filé (intramuscular) (1, 8, 10 , 11, 12), alcatra (2), costela do traseiro (3), lagarto (4 e 5), patinho (6), picanha (7), contra-filé (subcutânea) (9) (ND - não detectado)..... **68**
- Tabela 7** - Teores de CLA encontrado em diferentes cortes cárneos..... **74**
- Tabela 8** - Teores do ácido linoléico conjugado encontrados na gordura subcutânea e na gordura intramuscular do contra-filé. **76**

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

n 6 – ácido linoléico

n 3- ácido linolênico

CLA - Ácido Linoléico Conjugado

AGPs - ácidos graxos poliinsaturados

AGS - ácidos graxos saturados

DNA - *DesoxirriboNucleic Acid* (ácido desoxirribonucléico)

p 53- proteína p53

Apaf 1- fator-1 ativador de protease apoptótica

S - fase de síntese no ciclo celular

MCF-7 - linhagem de célula de câncer de mama

VEGF - fator de crescimento endotelial vascular

PPAR's - receptores ativados do proliferador de peroxissomo

CG - cromatografia gasosa

HPLC – cromatografia líquida de alta performance

Ag⁺-HPCL – cromatografia líquida de alta performance com íons prata

CG-SM – cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa

CG-FTIR- cromatografia gasosa acoplada a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

CDCl₃ – clorofórmio deuterado

TMS – tetrametilsilano

Tp- Intervalo de tempo entre os pulsos

at- tempo de aquisição

Tr- tempo de reciclo

nt- número de espectros promediados

RMN- SSFP – espectros de RMN no estado estacionário de precessão livre

Pbox- Pandora's Box

BURP- Band-selective, Uniform Response, Pure phase pulses

EBURP- Pulso de excitação de 90°

IBURP- Pulso de inversão de 180°

FID – Detector de Ionização de Chama

AO- ácido oléico

AL- ácido linoléico

GSC - gordura subcutânea

GIM - gordura intramuscular

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELA

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Animais ruminantes.....	15
1.2. Composição dos ácidos graxos em bovinos de corte	16
1.3. Ácido linoléico conjugado (CLA)	20
1.4. Produção do CLA.....	21
1.4.1. CLA sintético.....	21
1.4.2. Síntese de CLA no rúmen.....	21
1.5. Efeitos do CLA.....	23
1.5.1. Efeitos antitumorais	24
1.5.2. Mecanismo de ação do CLA.....	26
1.5.2.1. Apoptose	26
1.5.2.2. Angiogênese	33
1.5.3. Mecanismo de ação do CLA na composição corporal	35
1.6. Fatores que influenciam a quantidade de CLA na carne e seus produtos ..	36
1.7. Técnicas de análise de CLA	38
1.7.1. Cromatografia Gasosa e Cromatografia líquida de alta eficiência	39
1.7.2. Ressonância Magnética Nuclear	40
2. OBJETIVOS	43
3. MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1. Amostras utilizadas.....	44
3.2. Preparo das amostras para RMN	45
3.2.1. Extração da gordura bovina intramuscular:	45
3.2.2. Extração da gordura subcutânea:.....	45
3.2.3. Preparo das amostras para CG	45
3.2.4. Transesterificação das amostras	46
3.3. Medidas de RMN de ¹ H e ¹³ C em solução	47
3.4. Excitação seletiva	49
3.5. Análises Cromatográficas do conteúdo de ácidos graxos em carne bovina	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1. Espectros de RMN de ¹³ C.....	51
4.2. Análise da gordura bovina por RMN de ¹ H	54
4.3. Excitação seletiva	59
4.4. Análise quantitativa do teor de CLA por RMN de ¹ H.....	62
4.5. Cromatografia gasosa.....	64
4.6. Comparação entre os métodos de cromatografia gasosa e RMN de ¹ H para a determinação do teor de CLA em carne bovina	71
4.7. Comparação do teor de CLA determinado por RMN de ¹ H em diferentes partes de bovinos.....	72
4.8. Comparação do teor de CLA na gordura intramuscular e na gordura subcutânea de cortes de contra-filé obtido por RMN de ¹ H	74

4.9.	Espectros de RMN de ^1H em 90 MHz.....	78
5.	CONCLUSÃO	80
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1. INTRODUÇÃO

O rebanho comercial bovino brasileiro tem cerca de 190 milhões de cabeças, o que permite a produção de, aproximadamente, nove milhões de toneladas de carcaça/ano¹. O Brasil é o maior exportador de carne bovina no mundo, detendo 25 % do mercado internacional¹.

Para manter e/ou ampliar a participação brasileira no mercado globalizado será necessário produzir cada vez mais carne com qualidade nutricional, sensorial e sanitária. Além disso, com o aumento da idade da população mundial, alimentos com propriedades nutracêuticas se tornam necessários. Tais alimentos, além de nutrir, possuem propriedades que reduzem ou retardam o aparecimento de doenças como câncer, doenças cardiovasculares entre outras¹.

Nesse âmbito, a carne bovina tem sido apontada como um fator aliado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, obesidade, hipertensão e câncer, principalmente devido à presença de gordura saturada e colesterol. No entanto, ao considerar as análises químicas da carne, observam-se baixos teores de gorduras (menos de 5% na porção intramuscular) e baixos teores de colesterol, alcançando cerca de um terço das necessidades diárias de um indivíduo adulto².

Do ponto de vista nutricional, a carne é um alimento altamente benéfico, sendo fonte de aminoácidos essenciais, vitamina A, B₆, B₁₂, D, E; além de minerais como ferro, zinco e selênio entre outros nutrientes³.

Pensando em aumentar o consumo da carne bovina, têm-se intensificado as pesquisas para melhorar a sua qualidade diante dos consumidores. A maior preocupação dos pesquisadores é em relação a parte lipídica deste alimento, a qual constitui um importante componente de uma dieta balanceada e também contribui

para o melhor sabor, aroma e maciez da carne. A carne bovina fornece alguns ácidos graxos considerados essenciais, como o C18:2 ($\Delta^{9,12}$) (ácido linoléico) que são chamados de ácidos graxos ômega - 6 e o C18:3 ($\Delta^{9,12,15}$) (ácido linolênico) que são os ácidos graxos ômega - 3, além de fornecer um importante constituinte que está relacionado com uma série de efeitos benéficos a saúde⁴, como será mostrado a seguir.

Um exemplo dos benefícios da carne de ruminantes, bem como do leite e seus derivados, é que neles encontra-se quantidade satisfatória de Ácido Linoléico Conjugado ou CLA (do inglês, *conjugated linoleic acid*), o qual possui várias propriedades nutracêuticas⁵.

Pariza e colaboradores⁵ reportaram pela primeira vez no ano de 1979 a presença de CLA em carne bovina. Com a evolução das pesquisas, Pariza e colaboradores⁶ no ano de 1983, analisaram e subsequentemente identificaram o CLA como um componente com atividade antitumoral e presente na carne de ruminantes, independente do seu aquecimento e armazenamento.

Foi demonstrado que o CLA participa de vários processos metabólicos benéficos à saúde humana⁴. Vários estudos mostram que o CLA possui atividade anticarcinogênica, antidiabética, reduz a massa corporal gorda e reduz o desenvolvimento de aterosclerose em animais modelos, bem como em seres humanos^{4,5}.

Apesar dos inúmeros benefícios relacionados à saúde, a dose ingerida necessária para exercer tais benefícios ainda precisa ser estabelecida⁷.

Na Tabela 1 têm-se exemplos dos teores de CLA encontrados em alguns alimentos.

Tabela 1 - Teor do isômero *cis-9, trans-11* CLA em alguns alimentos de origem animal.

Alimentos	Teor de <i>cis-9, trans-11</i> CLA (mg/g de gordura)
Leite Integral (ruminante)	4,5-10,1
Carne Bovina (ruminante)	1,2-8,5
Carne de Frango	0,03-0,9
Carne Suína	0,2-0,6

Fonte: Chin *et al.*, 1992⁷

Ingle e colaboradores⁸ relataram que o valor de CLA encontrado nos alimentos é relativamente baixo, havendo a necessidade de implantação de melhores estratégias para aumentar a produção desse ácido graxo nos animais ruminantes. Fatores como o sexo, a idade e a raça do animal são fatores que influenciam na quantidade de CLA, entretanto a dieta é que fornece o substrato para a formação de CLA. Desta forma a dieta é considerada o fator principal que influencia no depósito de CLA pelos ruminantes e conseqüentemente a biodisponibilidade ao consumidor.

1.1. Animais ruminantes

O Brasil é um país com enormes extensões de terra e possui clima e pastagens propícias para a criação de diversos tipos de gados. Entretanto para garantir a longevidade e a produtividade de uma pastagem são evitadas ações que danificam a planta e o solo, sendo adotadas boas práticas de manejo⁹.

Loerch e colaboradores¹⁰ relataram que os animais ruminantes têm a capacidade de coletar, armazenar, processar e aproveitar alimentos fibrosos, inadequados ao consumo humano, convertendo-os em substâncias nutritivas que

posteriormente são aproveitadas para a produção de carne e leite. Essa capacidade é relacionada à extensão da habilidade de microrganismos encontrados no rúmen obterem energia dos carboidratos complexos da parede celular das plantas (celulose, hemicelulose e lignina). O papel desses microrganismos no processo de fermentação ruminal é fundamental para o desenvolvimento eficiente da formulação de dietas que promoverão o aumento de produtividade, minimizando os custos. O objetivo, dessa forma, é fornecer condições adequadas para o desenvolvimento da população microbiana ruminal, através de alterações na concentração e/ou composição desses microrganismos, potencializando espécies benéficas, conforme o interesse da produção de carnes⁹.

Van Soest¹¹ relatou que os triglicerídeos presentes nos vegetais encontram-se principalmente nas sementes, enquanto os lipídios se encontram nas folhas, na forma de compostos de galactose, glicerol e ácidos graxos insaturados. Os lipídios da dieta do animal, principalmente os triglicerídeos, são hidrolisados no rúmen por microrganismos, formando o glicerol e os ácidos graxos. O glicerol é fermentado principalmente a ácido propiônico. O fenômeno mais importante verificado com os ácidos graxos derivados dos triglicerídeos é a biohidrogenação dos ácidos graxos insaturados⁹, como será mostrado na sessão 1.4.2.

1.2. Composição dos ácidos graxos em bovinos de corte

A gordura na carne de bovinos está presente na forma de gordura de membrana, disposta como fosfolipídios; na forma de gordura intramuscular e na forma de gordura subcutânea. A proporção da quantidade de gordura pode variar amplamente dependendo do corte³.

Vale ressaltar que os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeia alifática de comprimento entre 4 e 36 carbonos (C_4 a C_{36}). A nomenclatura para esses compostos especifica o comprimento da cadeia e o número de duplas ligações, separado por dois pontos. Por exemplo, o ácido palmítico, saturado e com 16 carbonos, é abreviado em 16:0; e o ácido oléico, com 18 carbonos e uma dupla ligação, em 18:1 (Δ^9)¹².

French e colaboradores¹³ relataram que a gordura de ruminantes tem maior concentração de ácidos graxos saturados e menor relação de ácidos graxos poliinsaturados e saturados (AGP/ AGS) do que a gordura de animais não ruminantes. Essa diferença é devida à hidrogenação dos ácidos graxos da dieta que ocorre no rúmen.

Duckett¹⁴ observou que a gordura intramuscular é composta por cerca de vinte tipos de ácidos graxos, entretanto, somente seis deles contribuem com aproximadamente 90% do conteúdo total desses ácidos. São os ácidos mirístico, palmítico, palmitoléico, esteárico, oléico e linoléico.

Os ácidos graxos insaturados, linoléico ($C_{18}:2 \Delta^{9,12}$), linolênico ($C_{18}:3 \Delta^{9,12,15}$) e araquidônico ($C_{20}:4 \Delta^{5,8,11,14}$) são essenciais, uma vez que não podem ser sintetizados *de novo* pelos animais e sim pelas plantas. Estes ácidos graxos participam de processos importantes em vários metabolismos ativos, sendo também necessários para a formação das paredes celulares e das mitocôndrias. O nosso corpo pode produzir o ácido oléico a partir de compostos saturados, entretanto não produzem quaisquer dos ácidos citados acima, a menos que um deles esteja disponível na dieta. Os ácidos oléico, linoléico e linolênico (Figura 1) pertencem, cada um, a uma família diferente de compostos nos quais a insaturação ocorre nos átomos de carbono 9 (a); no 9 e 12 (b) e no 9, 12 e 15 (c), respectivamente, na

cadeia de hidrocarboneto, numerada à partir do carbono da carboxila. O ácido linoléico é abundante nos óleos vegetais (como em óleos de soja ou milho), mas sua concentração na carne é aproximadamente vinte vezes menor³.

a)



b)



c)



Figura 1. Estruturas dos ácidos graxos: (a) oléico, (b) linoléico e (c) linolênico.

Em um trabalho realizado por Ingle e colaboradores⁸ verificou-se que a composição dos depósitos de lipídios depende da dieta do animal e da necessidade de uso das reservas energéticas em cada momento de sua vida. A composição também é afetada por alterações nas intensidades das taxas de deposição de gordura, que mudam sua forma de armazenamento interna para externa, com o tempo. Além disso, Webb¹⁵ constatou que em animais de vários grupos genéticos o nível de saturação aumenta dos locais mais externos (tecido subcutâneo) para os mais internos. Lawrence e Fowler¹⁶ explicaram que esse fato pode estar ligado às diferenças de temperaturas nos diferentes sítios (localidades) e à necessidade do depósito subcutâneo ter um ponto de fusão menor dos lipídios, uma vez que esses lipídios podem estar expostos às temperaturas mais baixas (clima frio) que os demais.

Visentainer e colaboradores¹⁷ observaram que os ácidos graxos linoléico e linolênico são precursores necessários para a biossíntese de outros ácidos graxos e são considerados essenciais para os mamíferos. Em outro estudo, Williams¹⁸ observou que os ácidos graxos poliinsaturados (AGPs) de cadeia longa, oriundos dos ácidos graxos linoléico (C18:2 n6 $\Delta^{9,12}$) e linolênico (C18:3 n3 $\Delta^{9,12,15}$), oferecem uma proteção contra doenças cardiovasculares, particularmente contra as trombooses.

Desta forma, a razão entre ácidos graxos poliinsaturados e os ácidos graxos saturados (AGP/ AGS), bem como entre ácidos graxos da série n6 e n3 (n6/n3), são considerados importantes índices de avaliação nutricional, sendo recomendada uma razão superior a 0,4 para AGP/AGS e inferior a 4:1 para n6/n3 para uma dieta saudável¹⁹. Alguns autores como Woollett e colaboradores²⁰ e Fagundes²¹ analisaram que em excesso, os ácidos graxos da série n6 produzem eicosanóides inflamatórios e cancerígenos, aumentando o risco de situações como câncer, doenças cardíacas, vasoconstrição, aumento de pressão arterial, elevação da taxa de triglicerídeos entre outras doenças inflamatórias. Em contrapartida, os ácidos graxos da série n3 são antiinflamatórios, antitrombóticos, antiarrítmicos e reduzem os lipídeos no sangue, tendo propriedades vasodilatadoras.

Enser e colaboradores²² observaram que a composição lipídica e de ácidos graxos da carne de bovinos ruminantes pode ser afetada pelo sistema de criação, particularmente a razão n6/n3.

Além dos ácidos graxos poliinsaturados, o ácido linoléico conjugado (CLA), uma mistura de isômeros geométricos e posicionais do ácido linoléico, tem sido considerado importante na dieta humana²³, uma vez que em experimentação animal, pequenas quantidades apresentaram atividade imunoestimulatória, antimutagênica e

antioxidante. Assim, há grande incentivo para a produção de carne com elevadas proporções desse ácido graxo benéfico a saúde.

1.3. Ácido linoléico conjugado (CLA)

O CLA é uma mistura de isômeros posicionais e geométricos do ácido linoléico (C 18:2, *cis*-9, *cis*-12), que são apresentados na Figura 2. O CLA tem o mesmo comprimento de cadeia que o ácido linoléico (C18), no entanto, no CLA as duplas ligações são conjugadas, sem a separação pelo grupo metileno como ocorre no ácido linoléico. Há 56 isômeros geométricos e de posição do CLA, sendo que as duplas ligações podem ser do tipo *cis, cis*; *cis, trans*; *trans, trans*; e *trans, cis*. A gordura de ruminantes contém muitos isômeros de CLA. Entretanto, o *cis*-9, *trans*-11 CLA é o isômero predominante, representando 75 a 90% do total de CLA na gordura de ruminantes, seguido pelo *trans*-10, *cis*-12 CLA que corresponde de 3 a 5% do total de CLA²⁴. Carne e produtos laticínios provindos de animais ruminantes (como leite, manteiga, iogurte e queijo) são as principais fontes naturais de CLA na dieta humana, correspondendo cerca de 1% do total dos ácidos graxos²⁵.

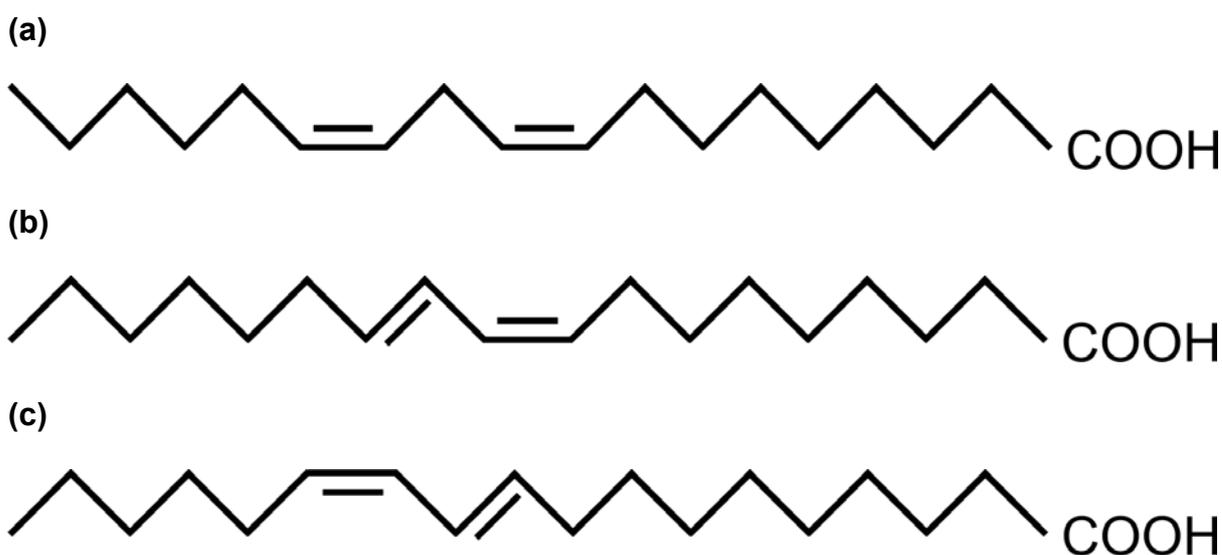


Figura 2. Estruturas do ácido linoléico (a) e de seus isômeros *cis*-9, *trans*-11(b) e *trans*-10, *cis*-12 CLA (c).

1.4. Produção do CLA

O CLA pode ser produzido sinteticamente ou no organismo dos animais ruminantes, sendo que neste caso ele pode ser formado de duas maneiras: 1) pela isomerização e/ou biohidrogenação bacteriana dos ácidos graxos poliinsaturados no rúmen e 2) pela dessaturação do ácido graxo *trans vacênico* pela enzima $\Delta 9$ dessaturase no tecido adiposo e na glândula mamária, como mostrado na Figura 3. No entanto, como será mostrado na sessão 1.4.2, o C18:1 *trans 11* é produzido principalmente através da biohidrogenação ruminal. Este processo é o grande responsável pelo fato de que as maiores fontes de CLA são produtos derivados de ruminantes²⁶.

1.4.1. CLA sintético

O CLA pode ser produzido sinteticamente por diferentes métodos, originando moléculas com variadas conformações posicionais e geométricas dos isômeros conjugados de C18:2 *cis9, cis12*²⁵.

Pode ser obtido a partir da desidratação do óleo de rícino, de tratamentos com álcalis fortes de óleo de girassol a altas pressões e de óleo de cártamo com solução concentrada de hidróxido de potássio em propilenoglicol²⁵.

1.4.2. Síntese de CLA no rúmen

O CLA nos ruminantes origina-se especialmente da isomerização e/ou biohidrogenação bacteriana dos ácidos graxos poliinsaturados no rúmen e da dessaturação do ácido graxo *trans vacênico* no tecido adiposo e glândula mamária²⁶.

A primeira transformação que ocorre no rúmen é a hidrólise das ligações ésteres das moléculas de triglicerídeos pelas lipases microbianas ruminais para a produção dos ácidos graxos livres e a molécula de glicerol. A segunda transformação é a biohidrogenação dos ácidos graxos poliinsaturados. Os principais ácidos graxos poliinsaturados na dieta dos ruminantes são os ácidos linoléico e o linolênico. Como se pode observar na Figura 3, o isômero *cis9, trans11* CLA é um intermediário da biohidrogenação do ácido linoléico a ácido trans-vacênico (C18:1 *trans-11*) e, eventualmente, a ácido esteárico (C18:0)²⁷.

A redução do ácido trans-vacênico (C18:1 *trans-11*) para o ácido esteárico (C18:0) parece ser o passo limitante da biohidrogenação, portanto, tende a se acumular no rúmen. O composto C18:1 *trans-11* é absorvido pelo trato digestivo e transportado pela circulação para os tecidos (inclusive glândulas mamárias), onde origina a forma *cis9, trans11* CLA pela ação da enzima $\Delta 9$ dessaturase²⁷.

Portanto, a presença de CLA no leite e na carne de animais ruminantes é devido ao escape da molécula *cis9, trans11* CLA da completa biohidrogenação ruminal e a absorção do ácido graxo C18:1 *trans-11* nos tecidos com posterior síntese de CLA pela ação da enzima $\Delta 9$ dessaturase (via 1 e 2 no esquema da Figura 3), respectivamente.

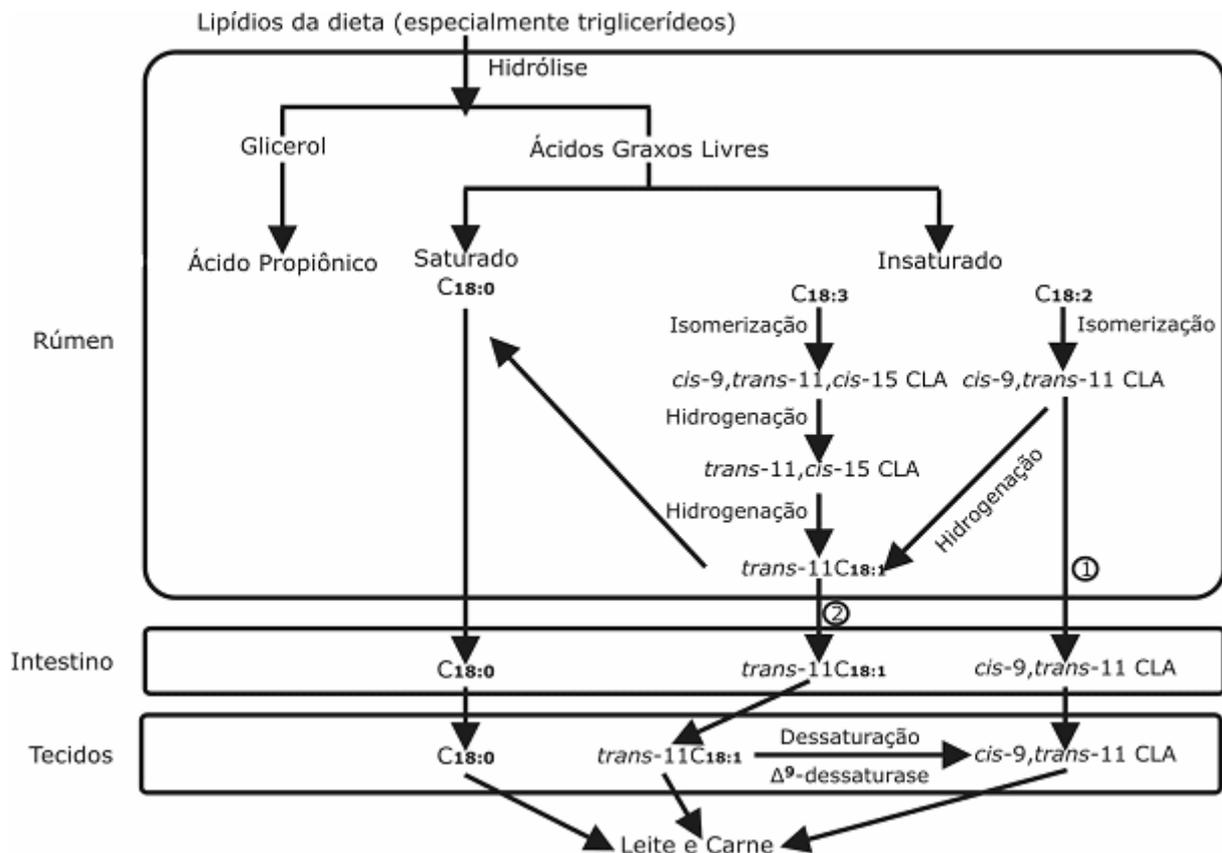


Figura 3. Metabolismo lipídico no rúmen e a origem do CLA na carne de ruminantes. (Adaptado de Tanaka, 2005²⁸).

1.5. Efeitos do CLA

O CLA tem sido relatado como substância nutracêutica que atua sobre o câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, composição corporal e sistema imune. Embora esses resultados derivem de experimentos com animais, esta é uma área de grande interesse de pesquisa, pois os resultados com humanos ainda não são conclusivos²⁹.

Apesar de vários experimentos demonstrarem que o consumo de carne vermelha possui considerável risco para o desenvolvimento do câncer colorretal, as informações parecem controversas. A recomendação geral, reforçada pelos

conselhos nutricionais, é a redução da ingestão de carne vermelha. Paradoxalmente, a carne, juntamente com o leite e produtos laticínios, são praticamente as únicas fontes do ácido linoléico conjugado, um potente fator nutracêutico. O enriquecimento da gordura do leite com CLA deve ser usado em larga escala para a produção de derivados com maior quantidade de CLA como a manteiga, queijo e iogurte. O consumo de produtos naturais, como o leite e a carne, produzem um efeito preventivo sobre o câncer, sem a adição de suplementos orais ou a necessidade de mudanças na dieta²⁹.

Foi também observado que o ácido linoléico conjugado diminui a gênese de tumores em animais. Estudos mostram que o CLA inibe o desenvolvimento de tumores na epiderme e estômago de ratos, bem como câncer de mama de ratas³⁰. Observou-se também que camundongos alimentados com CLA tiveram redução significativa do nível total de colesterol no plasma. Não há estudos suficientes com dados epidemiológicos em humanos, porém muitos estudos em animais têm mostrado a relação dose-resposta com a quantidade de CLA na ração e a extensão do crescimento tumoral³⁰.

1.5.1. Efeitos antitumorais

Segundo Ip³¹, a acumulação preferencial do CLA em lipídios neutros de adipócitos, células características do tecido mamário, explica, em parte, a sensibilidade dos tumores da glândula mamária ao efeito do CLA. Segundo o autor, um “efeito parácrino” em relação ao crescimento das células epiteliais ocorre com o depósito do CLA nos adipócitos, sendo os dois isômeros (*cis*-9, *trans*-11 e o *trans*-10, *cis*-12) envolvidos nesse processo. Esse mesmo autor descobriu que outros fatores estavam envolvidos com a inibição da carcinogênese mamária, como na

ação do CLA relacionada à redução na diferenciação das células do estroma mamário (gordura e tecido fibrótico das mamas) e na redução da capacidade deste estroma em formar redes microcapilares (angiogênese).

Bognoux e colaboradores³² não encontraram relação entre o teor de CLA e a agressividade do câncer, quando comparados o teor de CLA em mulheres que tinham carcinoma invasivo localizado na mama (n=213) com mulheres com tumor benigno (n=84). Particularmente, esse resultado pode ser devido às pequenas concentrações encontradas (média do teor de CLA de 0,44% variando de 0,19 a 0,85%). Entretanto, Knekt e colaboradores³³ mostraram dados epidemiológicos em que populações com maior consumo de leite de animais ruminantes possuem menor incidência de câncer de mama.

Pariza e Hargraves³⁴ relataram que a quantidade ótima de CLA ingerida precisa ainda ser estabelecida. Foi sugerido por esses autores que 95 mg de CLA por dia são suficientes para mostrar efeitos positivos na redução de câncer de mama em mulheres. Esses cálculos são baseados nos dados epidemiológicos ligando o aumento do consumo de leite com a redução do câncer de mama. Por outro lado, Ha e colaboradores³⁵ extrapolaram, a partir de estudos com ratos, que 350 mg de CLA diários são necessários para promover benefícios na saúde humana. Todos esses valores representam estimativas aproximadas e são baseados principalmente em estudos com animais. Deste modo, eles devem ser interpretados cautelosamente até que informações de análise em humanos estejam disponíveis.

1.5.2. Mecanismo de ação do CLA

1.5.2.1. Apoptose

A maioria dos tecidos sofre um constante processo de renovação celular devido ao equilíbrio entre proliferação e morte das células, caracterizada por um processo ativo de alterações morfológicas e bioquímicas, processo denominado apoptose. A apoptose é também considerada um mecanismo de defesa, sendo que quando ocorre invasão por agentes patogênicos, esse processo é ativado, ou mesmo quando há uma lesão interna no DNA^{36,37}.

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas, que a difere do processo de necrose. Como se pode observar na Figura 4, a apoptose (1) é um fenômeno bastante rápido que se caracteriza por ocorrer em células individualizadas geralmente rodeadas por células saudáveis: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas (2). A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta. A membrana celular forma prolongamentos e o núcleo se desintegra em fragmentos envoltos pela membrana nuclear. Esses prolongamentos da membrana celular aumentam de número e tamanho, conseqüentemente, se rompem, originando estruturas contendo o material celular, sem a liberação desse material no meio extracelular. Estas porções são denominadas “corpos apoptóticos” (3). Estes são rapidamente fagocitados pelos macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório³⁷.

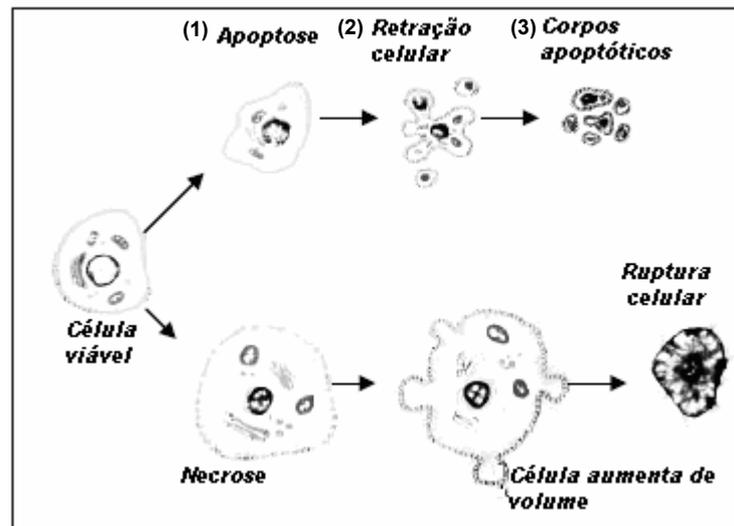


Figura 4. Características morfológicas da apoptose e da necrose. (Grivicich, et al., 2007³⁷)

Como citado anteriormente, diversos estímulos podem induzir a sinalização para ocorrer o processo de apoptose, como danos ao DNA, deprivação de fatores de crescimento, entre outros. Atualmente sabe-se que a apoptose pode ocorrer por diferentes vias, que culminam na ativação de proteases denominada de caspases³⁶.

Dessa forma a apoptose é efetuada principalmente por uma cascata de proteases - as caspases (a maquinaria de demolição celular). As caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) são uma família de cisteína-proteases que clivam seus substratos especificamente após resíduos aspartato. Dois conjuntos de caspases iniciadoras convergem para um conjunto de caspases efetoras³⁸. Classificam-se de acordo com seu papel na apoptose e com seu pró-domínio.

As caspases efetoras iniciam uma via que resulta na clivagem de constituintes celulares, DNA, componentes do citoesqueleto, enzimas etc. Isto reduz a célula a um agregado de entidades delimitadas por membranas que finalmente são fagocitadas pelos macrófagos³⁸.

Existem duas vias principais para a ativação da apoptose: a via dos receptores de morte e a via mitocondrial (Figura 5). A via dos receptores de morte (via extrínseca) envolve a estimulação de membros da família de receptores do fator de necrose tumoral; sendo a principal caspase iniciadora a caspase 8 (A). A via mitocondrial (via intrínseca) é ativada por fatores internos tais como lesão do DNA, que resulta na transcrição do gene *p53* (comentado mais adiante). A proteína *p53* ativa a via assessória que resulta na liberação do citocromo c da mitocôndria. Como se pode observar a via mitocondrial é definida por um evento importante: a permeabilização da membrana externa da mitocôndria liberando para o citosol algumas proteínas (citocromo c) responsáveis pelo desencadeamento da apoptose. Controlando essa permeabilização da mitocôndria, estão as proteínas da família Bcl-2, que é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente da regulação desse processo. Estão divididas entre proteínas anti-apoptóticas e pró-apoptóticas. Os membros da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) inibem a apoptose, pois previnem a liberação de citocromo c e são, portanto, chamados de reguladores anti-apoptóticos. Por outro lado, os outros membros da família (Bax, BID e Bak) são proteínas pró-apoptóticas³⁶. Estímulos como dano ao DNA leva ao aumento na expressão das proteínas pró-apoptóticas, liberando o citocromo c pela mitocôndria. O citocromo c liberado, por sua vez, forma um complexo com a proteína Apaf-1 (apoptossomo), e juntos, ativam a caspase iniciadora 9³⁸ (B). Este processo resulta na morte celular programada (apoptose).

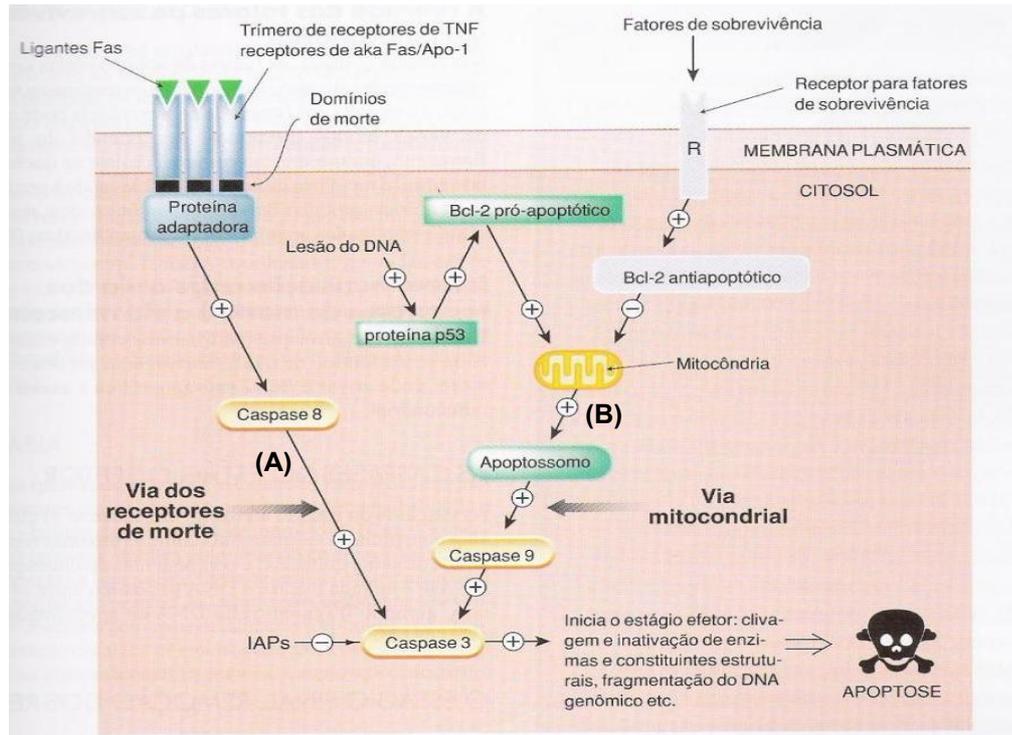


Figura 5. Diagrama simplificado das duas principais vias de sinalização da apoptose. (A) via extrínseca (B) via intrínseca.

(Rang, *et. al.*, 2007³⁸).

O gene *p53* (o “guardião” do genoma) é um gene supressor tumoral encontrado em muitos tumores malignos e benignos. Tem como função primária manter as células em estado de repouso (ponto de controle 1) após um dano no DNA (Figura 6). Esse estado de repouso permite o reparo do DNA, aumentando a chance da célula reparar seu genoma antes do próximo ciclo de replicação do DNA, evitando a fixação de mutações ou mesmo a indução da apoptose. Dessa forma se o reparo for bem sucedido, como se observa na Figura 6, o ponto de controle 1 é transposto e o ciclo celular prossegue para a fase de síntese (S). Caso o reparo não seja bem sucedido, o gene *p53* então desencadeia o suicídio celular, isto é, a apoptose³⁸.

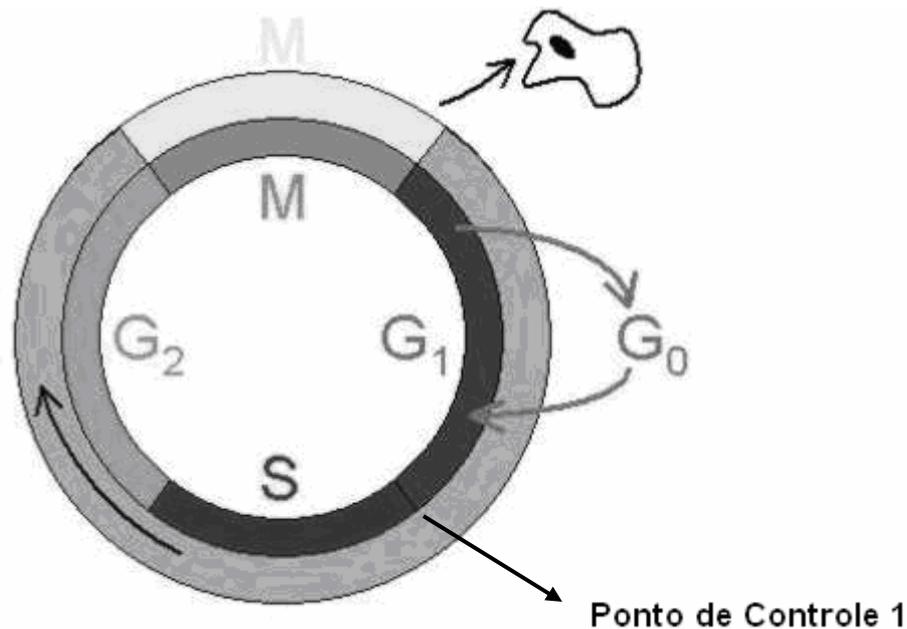


Figura 6. As principais fases do ciclo celular das células que sofrem divisão.

Um dos campos mais estudados na área de *p53* é a sinalização para a apoptose. De fato hoje se sabe que o gene *p53* induz a expressão de diversos genes pró-apoptóticos, como mencionado acima, que participam da via extrínseca e intrínseca da apoptose. Na supressão da tumorigênese há fortes evidências da participação do gene *p53*. A maioria dos cânceres apresenta mutações no *p53* ou defeitos na sua regulação³⁶.

Em células não lesadas, os fatores de sobrevivência (citocinas, hormônios, fatores de contato célula-célula) ativam continuamente os mecanismos anti-apoptóticos. Dessa forma, a retirada da estimulação do fator de sobrevivência causa morte celular por meio da via mitocondrial³⁸.

Assim, segundo Ip³⁹ em animais saudáveis e animais com câncer de mama, o CLA induz a apoptose, como evidenciado pela redução na expressão dos elementos anti-apoptótico, especificamente o gene *bcl-2* em tecido mamário de camundongos.

Para o autor mudanças na expressão de outros genes (bax, bad, bak, p53) não foram observadas.

Wahle e Heys⁴⁰ relataram que estudos com tumores de animais mostraram que o consumo particularmente de CLA alcança considerável benefício no câncer de próstata e de mama. Estes autores demonstraram, em estudos com células cancerosas, que esses ácidos graxos podem inibir a proliferação celular e induzir a célula à morte. Demonstraram também que o CLA aumenta a regulação dos sinais celulares na expressão do gene em células cancerígenas de mama e de próstata em humanos, responsáveis pela indução da apoptose (morte celular programada). Para eles, os dados encontrados sustentam os efeitos anticancerígenos do CLA encontrado em animais modelos e indicam efeitos similares que podem ocorrer em humanos.

Para Belury⁴¹, quando a mistura de isômeros do CLA está presente na alimentação de animais experimentais, a indução da tumorigênese nas mamas, pele e cólon é quimicamente reduzida. Muitos isômeros do CLA são metabolizados sugerindo que esses metabólitos devem ser importantes compostos anticancerígenos. Segundo o autor, o mecanismo da inibição da carcinogênese deve incluir redução da proliferação celular, alterações nos componentes do ciclo da célula e indução da apoptose (morte celular programada).

Estudos realizados por Majumder e colaboradores⁴² mostraram que o CLA inibe a tumorigênese mamária em animais e atenua, tanto em animais como em humanos, a proliferação celular do câncer. Eles estudaram detalhadamente a determinação da modulação do efeito do CLA na expressão do maior proto-oncogênese que regula a proliferação celular e a apoptose em células tumorais de mama.

Para Tanaka²⁸ a apoptose oferece proteção contra a carcinogênese via à morte programada das células. A dieta com CLA induz a apoptose em numerosos tecidos e em cultura de células mamárias epiteliais. Segundo ele, o CLA induz a apoptose associada com a redução do bcl-2, uma proteína relacionada com a sinalização para a morte celular programada.

Islam e colaboradores⁴³ realizaram um estudo que analisaram a linha de células do câncer de mama, MCF-7, com os isômeros *cis9,trans11* e *tran10,cis12* CLA. A ocorrência de mudanças nas características morfológicas e a fragmentação no DNA confirmaram apoptose. Os dados encontrados sugerem que a incorporação do CLA na membrana induz a mediação da apoptose na mitocôndria e pode realçar o efeito anti-proliferativo do CLA em células MCF-7.

Já para Grivicich e colaboradores³⁷, a compreensão dos mecanismos e das alterações nos componentes das vias apoptóticas e sua correlação com a ocorrência do câncer são fundamentais para o desenvolvimento de novas terapias e métodos preventivos para vários tipos de câncer.

Ou e colaboradores⁴⁴ constataram que o CLA é um poderoso agente anticâncer em inúmeros sistemas de modelos tumorais, entretanto, segundo eles, o mecanismo de ação permanece indescritível. Nesse estudo, eles reportam que o isômero *trans10,cis12* CLA, induz a apoptose. Segundo os resultados, os autores demonstram que o isômero *trans10,cis12* CLA disparam a apoptose via *p53* modificado nas células tumorais da mama através do caminho mitocondrial tendo como alvo Bcl-2.

Outro mecanismo o qual se pode explicar a ação do CLA é a angiogênese, que será descrita a seguir.

1.5.2.2. Angiogênese

A angiogênese, que normalmente acompanha a proliferação celular, é a formação de novos capilares a partir de pequenos vasos sanguíneos preexistentes³⁸. É um processo através do qual as células tumorais estimulam a formação dos novos vasos sanguíneos necessários para o fornecimento dos nutrientes essenciais para o crescimento acelerado do tumor⁴⁵. O estímulo angiogênico, no contexto da proliferação celular, inclui a ação de vários fatores de crescimento e citocinas, em particular o VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)³⁸. Como pode se observar na Figura 7, a seqüência de eventos é a seguinte: a membrana basal é degradada localmente por proteases (a) e as células endoteliais migram para fora, formando um broto (b); as células endoteliais que seguem as células líderes proliferam sob a influência do VEGF (c); ocorrendo deposição de matriz em torno do novo capilar (d ,e).

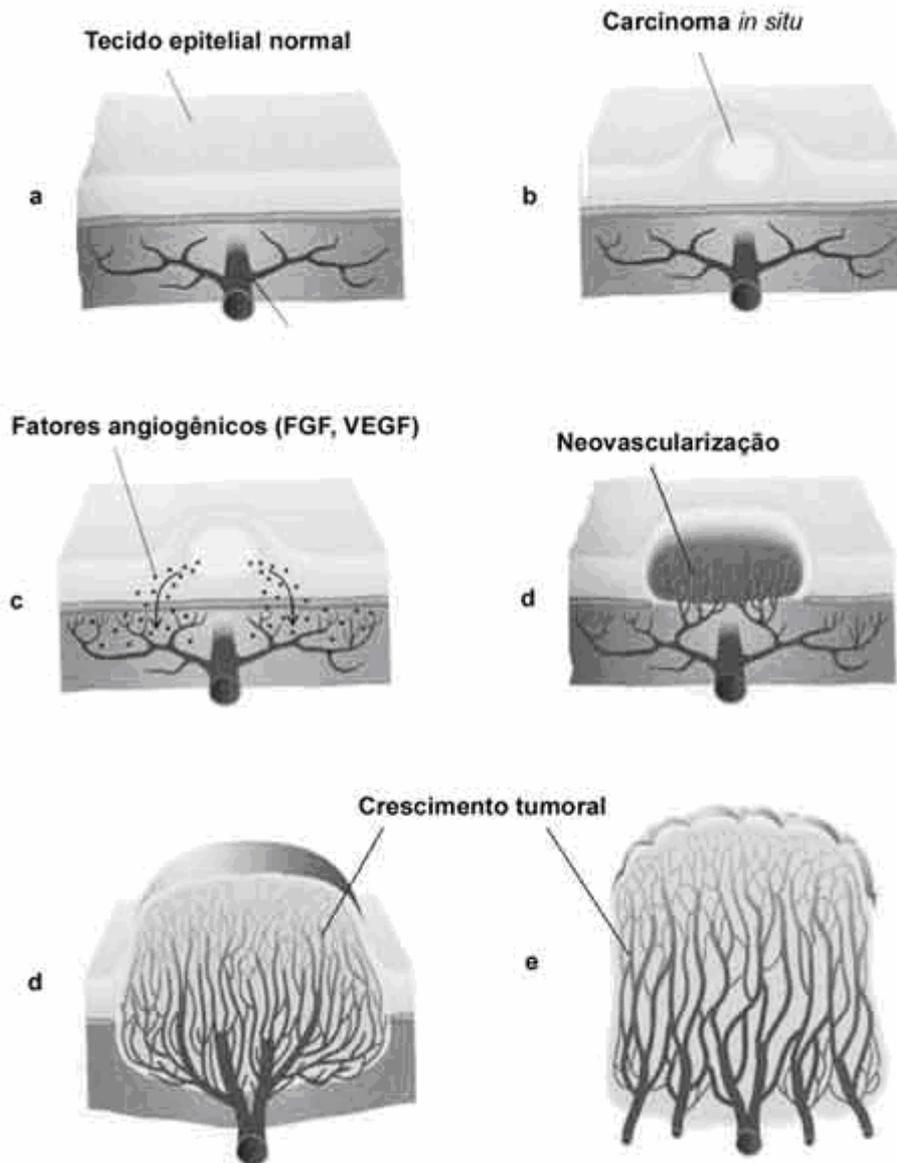


Figura 7. Etapas da angiogênese. (Pinho, 2005⁴⁵).

Pinho⁴⁵ afirma que os grandes avanços ocorridos na área da biologia molecular têm possibilitado uma melhor compreensão dos mecanismos de carcinogênese, em especial a angiogênese. Segundo ele, sabe-se que hoje a angiogênese resulta da liberação local pelo tumor de algumas proteínas com ação estimuladora para o desenvolvimento vascular. Como consequência direta destes

resultados, a terapia anti-angiogênica, baseada na inibição destas moléculas, representa hoje uma das mais promissoras linhas de estudo em oncologia.

Para Masso-Welch e colaboradores⁴⁶ ambos os isômeros *cis-9,trans11* e *trans10, cis12* CLA foram efetivos na inibição da angiogênese *in vitro* na forma dose-dependência. A capacidade do CLA na inibição da angiogênese deve contribuir com eficácia como um agente preventivo.

Além disso, o estudo realizado por Sikorski e colaboradores⁴⁷ também demonstrou resultados indicando que a administração de CLA reduziu significativamente a angiogênese no cerebelo. Os autores relataram o primeiro estudo sobre o efeito anti-angiogênico do CLA no cérebro, e sugerem que o CLA deve ser explorado no tratamento terapêutico para câncer e tumores no cérebro.

1.5.3. Mecanismo de ação do CLA na composição corporal

Banni e colaboradores⁴⁸ listaram duas maneiras de como o CLA pode interferir no metabolismo de lipídios, pela incorporação em tecidos ricos de lipídios neutros ou pela β -oxidação nos peroxissomos. Essas atividades são mais intensas onde há maior concentração do CLA (tecido adiposo e mamário), o que explica a sua função sem alterar o metabolismo como um todo. A β -oxidação no peroxissomo pode ativar os receptores ativados do proliferador de peroxissomo (denominado PPAR) o que pode explicar o aumento de retinol livre causado pelo CLA e a influência na expressão gênica.

Evans e colaboradores⁴⁹ demonstraram que o CLA pode exercer seu efeito na composição corporal principalmente através dos receptores ativados do proliferador de peroxissomo (PPAR's). O PPAR's corresponde a uma grande família

de receptores nucleares, divididos em alfa, gama e delta. Especificamente os PPAR gama se encontram amplamente distribuídos, mas sua presença é maior no tecido adiposo podendo-se considerar que o papel fisiológico deste grupo é a manutenção dos níveis de expressão adequados de moléculas chave na regulação do metabolismo da glicose e dos lipídios.

Risérus e colaboradores⁵⁰ relatam que o CLA reduz a acumulação da massa gorda em animais modelos podendo ter significantes efeitos no metabolismo de glicose e lipídios. Sugere-se que o isômero *trans10, cis12* é o isômero ativo do CLA associado à antiobesidade e à sensibilização da insulina. Os efeitos metabólicos em humanos em geral e os efeitos específicos dos isômeros ainda não estão bem caracterizados.

1.6. Fatores que influenciam a quantidade de CLA na carne e seus produtos

Segundo Depetris e Santini⁵¹ a composição química da carne, bem como o perfil dos ácidos graxos, são modificados consideravelmente pelo plano nutricional e pelo sistema de produção oferecido aos animais. O confinamento (Figura 8A), sistema de alimentação dos animais com alta quantidade de grãos na dieta, resultou em elevadas proporções de ácidos graxos insaturados oléico e linoléico (n6) e baixa proporção do linolênico (n3), conseqüentemente aumentando a relação n6/n3. O sistema de confinamento resultou também em carne com menor concentração de CLA devido à diminuição na biohidrogenação pelas bactérias ruminais. Por outro lado, outro sistema de alimentação baseado em forragens frescas (Figura 8B), resultaram no aumento dos ácidos graxos poliinsaturados da série n3, diminuindo a relação com os ácido graxos da série n6. A elevada porcentagem de ácidos graxos

poliinsaturados da dieta, associados à maior biohidrogenação ruminal, culminaram com maiores porcentagens de CLA na carne, conseqüentemente mais benefícios a saúde.



Figura 8. Demonstração de bovinos terminados em sistema de confinamento (A) e terminados a pasto (B).

Outro estudo realizado por Nuernberg e colaboradores⁵² demonstrou também que o sistema de alimentação de pastagem ou concentrados influencia nas características de qualidade da carne e conseqüentemente na composição lipídica no músculo *Longissimus*. Esses mesmos autores abordaram que o conteúdo de gordura intramuscular é reduzido quando há alterações na dieta do animal, como, por exemplo, substituindo concentrados de alta energia por forragem de baixa concentração energética. Efeitos positivos na composição lipídica da carne foram atingidos com a alimentação realizada no pasto, apresentando melhores valores da

relação n6/n3 e maior quantidade de CLA, o que caracteriza a carne de animais ruminantes alimentados a pasto um produto saudável.

Para Priya e colaboradores⁵³, a quantidade relativa dos isômeros de CLA na carne depende do consumo de alimentos pelos animais durante o período de produção. Alimentar o gado com óleo rico em ácido linoléico por longo período aumenta a quantidade de CLA na carne. Dependendo do tipo e da maturidade relativa do pasto, a carne de gado alimentado a pasto deve conter maior quantidade de CLA do que gado alimentado com grãos ou silagem.

Segundo Shantha e colaboradores⁵⁴ a concentração de CLA na carne parece não ser afetada pelo cozimento ou armazenamento. Os autores analisaram amostras de carnes cozidas a temperatura de 60 e 80 °C em diferentes métodos de aquecimento, e não verificaram diferenças significativas na concentração de CLA. Concluíram que esses métodos de cozimento não causam grandes mudanças na quantidade de CLA quando as concentrações são comparadas analisando miligrama de CLA por grama de gordura do animal. Nesse mesmo estudo mostrou-se também que as condições de armazenamento da carne não alternam o teor de CLA.

1.7. Técnicas de análise de CLA

O CLA tem sido analisado em gordura de ruminantes por cromatografia gasosa (CG) e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

1.7.1. Cromatografia Gasosa e Cromatografia líquida de alta eficiência

Roach e colaboradores⁵⁵ demonstram que a cromatografia gasosa (CG) sozinha não pode separar completamente os isômeros do CLA com ocorrência natural. É necessária a combinação da cromatografia líquida de alta performance com íon prata (Ag^+ -CLAE) e a cromatografia gasosa para oferecer melhor separação desses isômeros com a identificação complementar pela CG acoplada com a espectrometria de massa (CG-EM) e análise CG acoplada com a técnica de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Segundo eles, a Ag^+ - CLAE é uma ferramenta complementar necessária para o isolamento e a separação individual dos isômeros de CLA, bem como a CG-FTIR é necessária para confirmar a configuração da dupla ligação (*cis-trans*; *cis-cis*; *trans-trans*) dos isômeros geométricos do CLA.

Luna e colaboradores⁵⁶ estudaram o uso da cromatografia gasosa e do Ag^+ - CLAE para examinar a temperatura e o tempo da metilação do CLA individual e a mistura dos isômeros do CLA usando ácido sulfúrico como catalisador. Segundo os autores o uso desse ácido como catalisador é coerente em determinadas situações.

Segundo Delmonte e colaboradores⁵⁷, a técnica de Ag^+ -CLAE tem mostrado efeito na resolução da maioria dos isômeros dos ácidos octadienóicos conjugados ($\text{C}18:2 \Delta^{9,12}$), como também o ácido linoléico conjugado (CLA).

Sehat e colaboradores⁵⁸ reportaram o primeiro trabalho sobre a aplicação da cromatografia líquida de alta performance com íon-prata (Ag^+ -CLAE) para a separação de misturas complexas dos isômeros de CLA presentes em fontes comerciais de CLA e em alimentos. Este método, segundo eles, mostra uma clara separação dos isômeros do CLA em três grupos, na configuração do sistema da dupla ligação conjugada *trans-trans*, *cis-trans* ou *trans-cis* e *cis-cis*.

Em outro trabalho, também publicado por Sehat e colaboradores⁵⁹, demonstraram que operando de uma a seis colunas em série de Ag⁺-CLAE em série melhora progressivamente a resolução dos isômeros dos metil ésteres do CLA presente em fontes naturais e em produtos comerciais.

Para Kramer e colaboradores⁶⁰ a melhor técnica analítica para a análise de ácidos graxos, especificamente o CLA, inclui a combinação da CG que usa colunas polares de alta capilaridade (100 m) e Ag⁺-CLAE. Segundo eles, a estrutura química dos ácidos graxos conjugados é um grande desafio em relação à análise dos lipídios devido aos inúmeros possíveis isômeros posicionais e geométricos existentes.

Como pode ser observado, atualmente o método padrão para a determinação de CLA é o método de cromatografia gasosa dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, preparados pela reação de transesterificação. No entanto, esse método envolve várias etapas, havendo a necessidade de etapas de derivatização (reação de transesterificação) e purificação antes da análise cromatográfica. Somente essa última etapa pode demorar cerca de 60 minutos.

Neste trabalho foi desenvolvido um método alternativo de determinação de CLA em gordura de carne bovina por RMN de ¹H, o qual não necessita das etapas de derivatização e purificação. Para disponibilizar a metodologia foi necessário a otimização das condições experimentais de RMN, bem como uso de seqüência de excitação do sinal de interesse, além da validação do método.

1.7.2. Ressonância Magnética Nuclear

A RMN de ¹H e ¹³C vem sendo usada na determinação de estrutura dos isômeros do CLA produzidos sinteticamente. A Figura 9 apresenta um espectro de RMN de ¹H do éster metílico do isômero *cis-9, trans-11* CLA. Na parte superior

dessa figura tem-se assinalado os sinais de RMN e os respectivos hidrogênios do CLA. Os sinais dos quatro hidrogênios dos carbonos insaturados f, g, h e i estão localizados em 5,32; 5,94; 6,30 e 5,69 ppm, respectivamente.

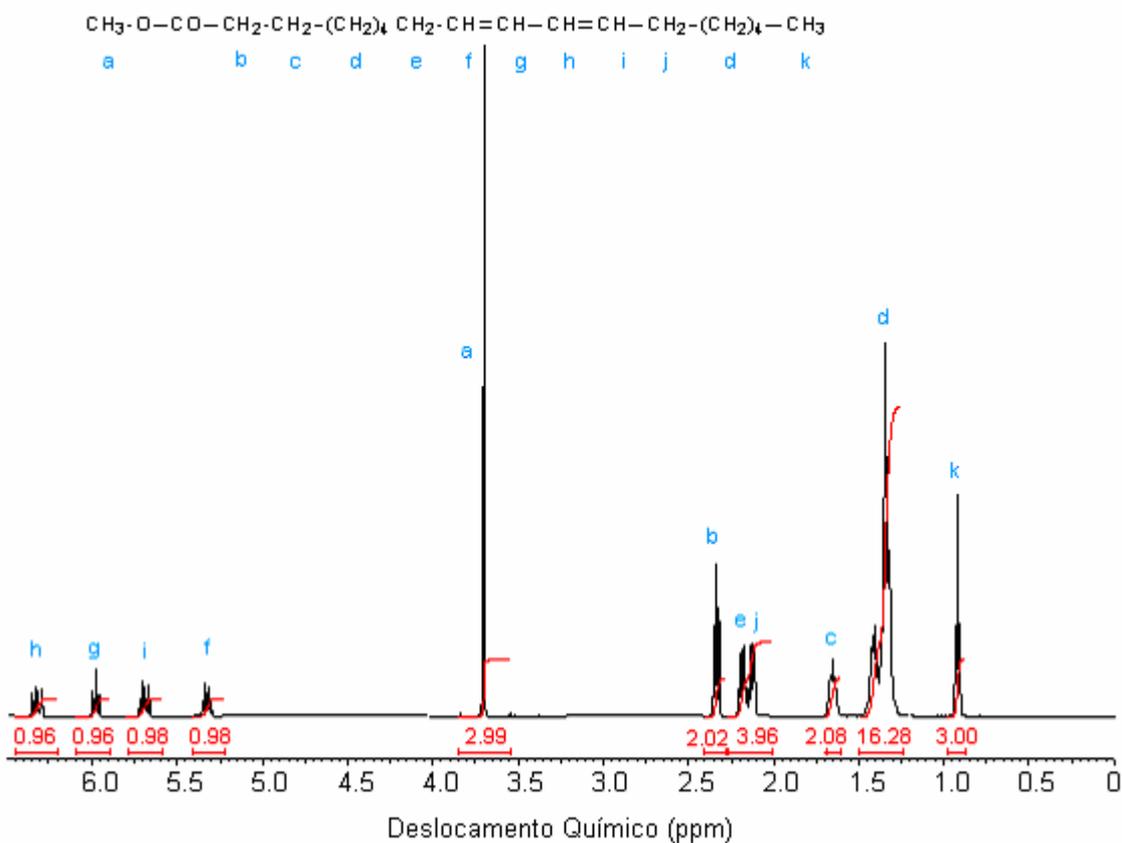


Figura 9. Espectro de RMN de ^1H do éster metílico do isômero *cis-9, trans-11* CLA.

Fonte: www.lipidlibrary.co.uk⁶¹

Na Tabela 2 estão os deslocamentos químicos dos ^{13}C em ppm, para o isômero *cis-9, trans-11* CLA.

Tabela 2 - Deslocamentos químicos dos ^{13}C em ppm, para o isômero *cis*-9 *trans*-11 CLA⁶¹

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9
9c11t	174,32	34,10	24,95	29,06	29,06	29,06	29,06	27,66	129,89
C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	
128,71	125,58	134,76	32,92	29,41	28,95	31,77	22,65	14,12	

2. OBJETIVOS

O objetivo geral desse trabalho de mestrado foi avaliar o uso de RMN de ^1H em alta resolução para a medida do teor de ácido linoléico conjugado (CLA) em carne bovina.

Os objetivos específicos foram:

- a) obter as melhores condições para medidas quantitativas do teor de CLA em gordura bovina por RMN de ^{13}C e ^1H ;
- b) comparar os resultados obtidos por RMN de ^1H com os obtidos por cromatografia gasosa a fim de determinar se há ou não correlação entre as duas medidas;
- c) verificar se o teor de CLA é o mesmo em diferentes partes do boi e
- d) verificar se o teor de CLA é o mesmo na gordura subcutânea e na gordura intramuscular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Amostras utilizadas

A amostra padrão do ácido linoléico conjugado comercial foi obtida da Sigma-Aldrich (05507-1G). As amostras de carne bovina, provenientes de bovinos machos, foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de São Carlos-SP. Analisaram-se cortes de carne de peito (6), costela do traseiro (8), contra-filé (10), picanha (14), alcatra (15), coxão mole (17), lagarto (18), coxão duro (19) e patinho (20). Estes cortes encontram-se ilustrados na Figura 10.

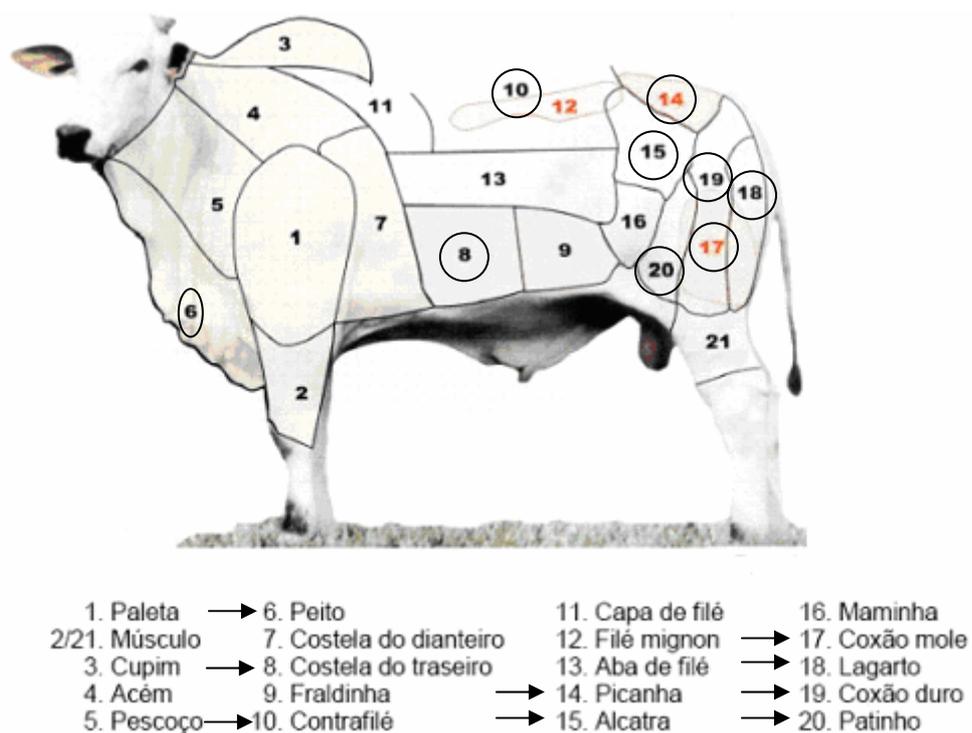


Figura 10. Cortes de carne bovina. Os cortes em destaque foram usados no experimento.

3.2. Preparo das amostras para RMN

As amostras utilizadas nas análises de RMN foram preparadas de acordo com os seguintes procedimentos:

3.2.1. Extração da gordura bovina intramuscular:

Em estabelecimentos comerciais foram adquiridos amostras de aproximadamente cem gramas dos cortes cárneos a serem analisados. Pesou-se aproximadamente um grama de cada amostra (obtidos no centro do corte cárneo), que foi congelada por 24 horas. Esta amostra foi liofilizada por duas horas, posteriormente triturou-se e repetiu-se o processo de liofilização. Em seguida pesou-se 0,2 gramas da mesma e adicionou-se 800 μL de clorofórmio deuterado (CDCl_3). Agitou-se a mistura por aproximadamente quinze minutos, filtrando-a e transferiu-se a solução para tubos de RMN de 5 mm de diâmetro, adicionando TMS.

3.2.2. Extração da gordura subcutânea:

A gordura subcutânea foi obtida das fatias dos cortes do contra-filé. Pesaram-se aproximadamente 0,2 gramas de cada amostra a ser analisada (obtidas do centro da fatia de gordura), que foi congelada por 24 horas. Em seguida liofilizou-se a amostra por duas horas, adicionou-se 600 μL de clorofórmio deuterado (CDCl_3), agitando a mistura por aproximadamente quinze minutos. Filtrou-se a amostra e transferiu-se a solução para tubos de RMN de 5 mm de diâmetro, adicionando TMS.

3.2.3. Preparo das amostras para CG

O preparo inicial das amostras de gordura subcutânea e intramuscular para

análise de cromatografia gasosa foram realizadas como no item 3.2.1 e 3.2.2. Entretanto, para esta análise, adicionou-se 800 µL de clorofórmio, agitando a mistura por aproximadamente quinze minutos. Filtrou-se a amostra, e posteriormente evaporou-se o clorofórmio em temperatura ambiente, congelando o extrato para posterior análise cromatográfica.

3.2.4. Transesterificação das amostras

Realizou-se a transesterificação das gorduras segundo o método descrito por Hartman e Lago⁶² com uma adaptação para a microescala. Inicialmente preparou-se a mistura esterificante adicionando 2 g de cloreto de amônia a 60 mL de metanol seguido pela adição de 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura contida em um balão de fundo redondo adaptado a um condensador foi mantida em refluxo sob agitação por 15 minutos. O reagente obtido foi então estocado em um Erlenmeyer com tampa de vidro, podendo ser utilizado por várias semanas.

Posteriormente, em um tubo de ensaio autoclavável de 20 mL, pesou-se aproximadamente 15 mg de gordura. A seguir, adicionou-se 0,5 mL de uma solução de 0,5 mol/L de hidróxido de sódio em metanol e aqueceu-se o tubo de ensaio por 10 minutos em banho-maria a 90° C. Resfriou-se o material contido no tubo de ensaio em um banho de gelo e adicionou-se 1,5 mL da mistura esterificante preparada segundo o procedimento descrito anteriormente. Aqueceu-se novamente o tubo de ensaio por 10 minutos em banho-maria a 90° C. Resfriou-se novamente o tubo de ensaio em banho de gelo e adicionou-se 5,0 mL de n-heptano e 10 mL de água destilada. Agitou-se o tubo de ensaio algumas vezes e aguardou-se que ocorresse a separação de fases. Com auxílio de uma pipeta Pasteur isolou-se a fase

orgânica superior, correspondente aos ésteres metílicos de ácidos graxos, a qual foi analisada por cromatografia gasosa.

3.3. Medidas de RMN de ^1H e ^{13}C em solução

Os espectros de RMN em alta resolução foram adquiridos em um espectrômetro Varian, modelo Inova 400, com ímã de 9,4 Tesla, equivalente às frequências de 400 MHz para o ^1H e 100 MHz para ^{13}C , empregando-se uma sonda Varian de 5 mm de diâmetro.

Utilizou-se uma sequência convencional para a obtenção dos espectros de hidrogênio, aplicando-se um pulso de duração de $10,5 \mu\text{s}$ (90°). Para a aquisição destes empregou-se 128 scans (nt), at (tempo de aquisição) de 2 s e T_r (tempo de reciclo) de 3 s, resultando em T_p (intervalo de tempo entre os pulsos) de 5 s e janela espectral de 6,4 KHz. Como ilustrado na Figura 11 o tempo T_p é a somatória de at e T_r .

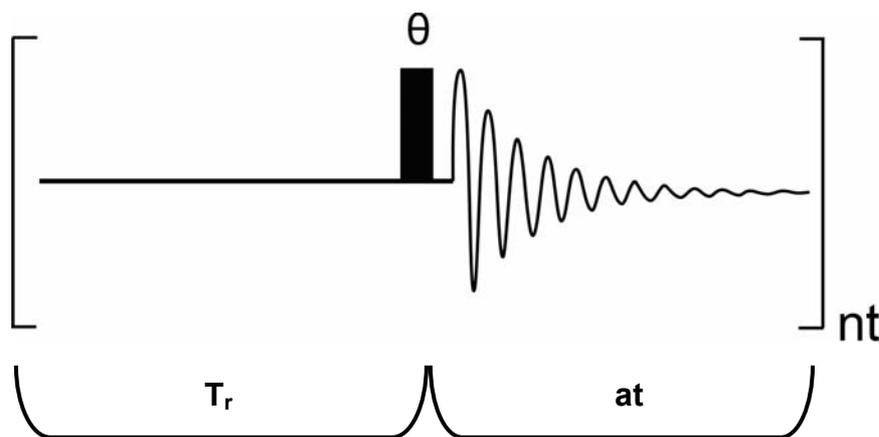


Figura 11. Representação da seqüência de pulsos convencional para a aquisição de espectros de RMN de ^1H .

Para a quantificação do teor de CLA em gordura bovina a partir dos espectros de RMN de ^1H , integrou-se os sinais do glicerol em 4,12 ppm e 4,31 ppm e lhes

foram atribuídos uma área relativa igual a 100. Com isso integrou-se os sinais encontrados em 5,9 ppm e 6,3 ppm. As áreas medidas desses dois sinais foram usadas nas medidas quantitativas.

Os espectros de RMN de ^1H em 90 MHz foram adquiridos em um espectrômetro com imã permanente, Anasazi EFT90. Para a aquisição destes, empregou-se um pulso de duração de $23,8\mu\text{s}$ (90°), tempo de aquisição (at) de 1,7 s, tempo de reciclo (T_r) de 0,1 s e com 256 scans.

Para a obtenção dos espectros de ^{13}C utilizou-se a seqüência padrão⁶³ de RMN de ^{13}C (Figura 12), a qual é composta por um pulso de 30° , seguido de um tempo de aquisição (at) de 900 ms e um tempo de reciclo (T_r) de 480 ms, obtendo-se um T_p de 1,38 s e janela espectral de 25 KHz.

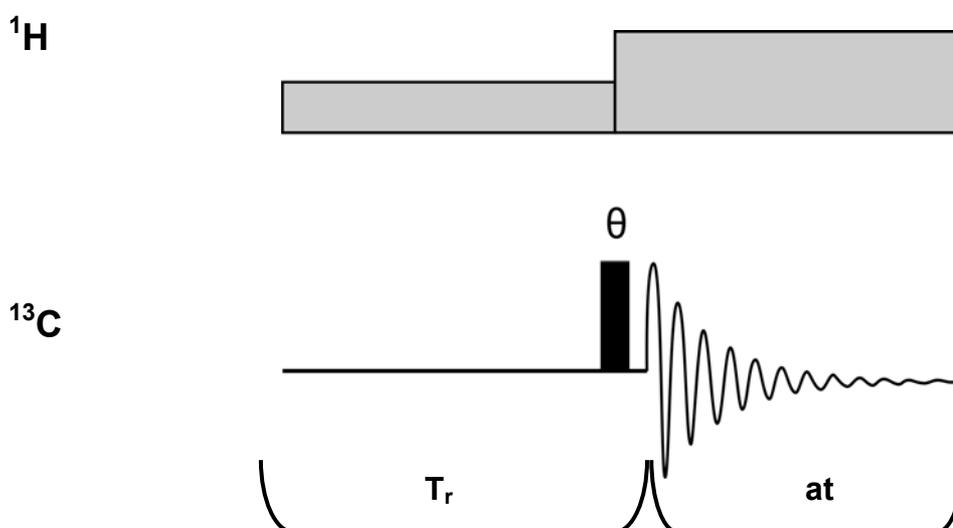


Figura 12. Representação da seqüência de pulso padrão empregada para análise de RMN de ^{13}C .

Para os espectros adquiridos com a seqüência de SSFP (Steady-State free precession) utilizou-se pulso de 60° , at (tempo de aquisição) de 299,7 ms e T_r (tempo de reciclo) de $300\mu\text{s}$, obtendo-se um T_p (intervalo de tempo entre os pulsos) de 300 ms.

3.4. Excitação seletiva

Para a melhor visualização dos sinais de interesse, hidrogênios ligados aos carbonos insaturados do ácido linoléico conjugado, foi utilizada neste estudo a ferramenta encontrada no equipamento da VARIAN-NMR denominada como Pandora's box (Pbox). O Pbox tem por objetivo simplificar a geração e o uso de diferentes formas de onda em experimentos de RMN para excitação seletiva.

Neste trabalho utilizou-se a forma de pulsos de excitação de 90°, usando um pulso simples de excitação, o membro EBURP2 da família BURP.

3.5. Análises Cromatográficas do conteúdo de ácidos graxos em carne bovina

As análises cromatográficas das amostras de carne bovina foram realizadas na Universidade Estadual Paulista – campus de Jaboticabal (Departamento de Tecnologia- FCAV/UNESP) no Laboratório de Bioquímica de Microrganismos e Plantas. As condições de análise foram:

a) cromatógrafo a Gás CG-14B, Shimadzu;

b) coluna capilar, sílica fundida, OMEGAWAX250 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) no. cat 24136-SUPELCO;

c) programação de temperatura da coluna:

50° C por dois minutos, aquecimento 4 °C/min até 220 °C, permanecendo nesta temperatura por mais 25 minutos;

d) temperatura do injetor: 250°C;

e) temperatura do detector: 280°C;

f) velocidade do gás de arraste (H₂): 1mL/min;

g) SPLIT: 1/100;

h) volume de injeção: 1 µL;

i) detector FID (Detector de Ionização em Chama) e

j) padrão utilizado: Padrão de ácidos graxos Sigma (no. cat 189-19).

Para a determinação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi utilizada a eluição de soluções padrões e para a quantificação utilizou-se o método de normalização das áreas dos picos, onde a concentração dos picos foi determinada pela razão da sua área com a área total de todos os ésteres metílicos identificados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Espectros de RMN de ^{13}C

Inicialmente utilizou-se os espectros de RMN de ^{13}C , que tem maior dispersão espectral que os espectros de RMN de ^1H , para se observar a presença do CLA na gordura bovina.

Os espectros de RMN de ^{13}C foram obtidos através de uma sequência padrão⁶³ e promediados por duas horas. A Figura 13 apresenta um espectro de RMN de ^{13}C de uma amostra da gordura intramuscular extraída de contra-filé. Neste espectro observam-se os sinais dos carbonos metílicos na região de 14 ppm; dos metilênicos na região de 20 a 35 ppm; os sinais característicos do glicerol na região de 61 a 70 ppm; o sinal característico dos carbonos insaturados do ácidos graxos na região de 130 ppm e os sinais característicos dos carbonos das carboxilas em 172 ppm.

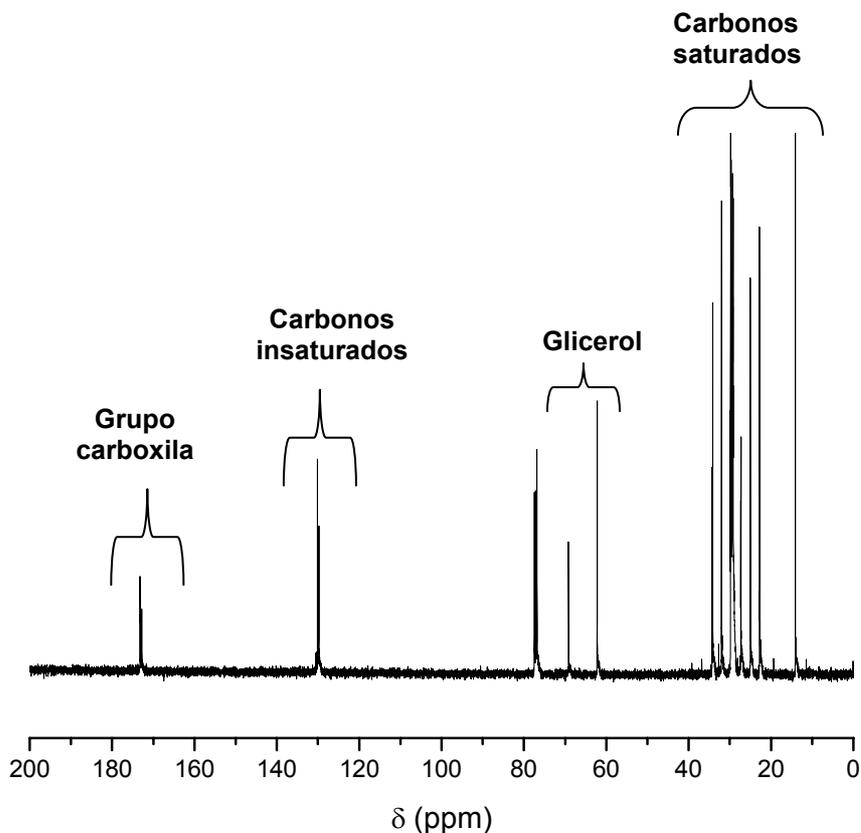


Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C de uma amostra de gordura extraída do músculo contra-filé.

Na Figura 14 tem-se uma expansão dos sinais de dupla ligação entre 127 e 131 ppm. Nesta região pode se identificar dois sinais intensos em 129,7 e 130,0 ppm, característicos do ácido oléico, que é o principal ácido graxo insaturado da gordura bovina e representa cerca de 40% do teor de ácidos graxos totais. Também pode se observar os quatro sinais de menor intensidade em 127,9; 128,1; 130,2 e 130,3 ppm, relativos aos carbonos insaturados do ácido linoléico. Como esperado, apesar de algumas horas de aquisição, não foi possível observar os sinais do isômero *cis9, trans11* CLA, que é o mais abundante entre os isômeros do CLA, visto que estes apresentam menor concentração em relação aos demais ácidos graxos da

amostra. Os sinais dos carbonos insaturados do CLA ocorrem em 129,9; 128,7; 125,6 e 134,8 ppm.

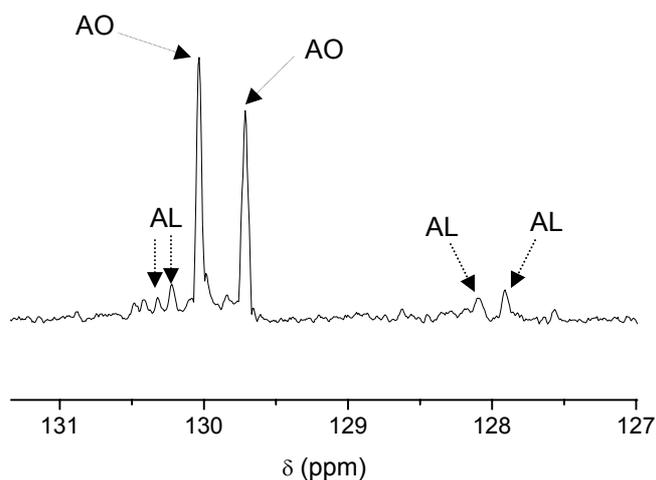


Figura 14. Expansão do espectro da Figura 13 na região de 127 a 131 ppm, onde podem ser observados os sinais do C18:1 Δ^9 (AO) e do C18:2 $\Delta^{9,12}$ (AL).

Outra tentativa para se observar os sinais de RMN de ^{13}C do CLA em gordura bovina foi empregando-se a sequência de Precessão Livre no Estado Estacionário (Steady State Free Precession - SSFP). Esta sequência possibilita a aquisição rápida de espectros de ^{13}C (Figura 15) com redução significativa do tempo de análise, quando comparada a sequência convencional⁶⁴. Apesar disso, também não foi possível visualizar os sinais característicos do CLA.

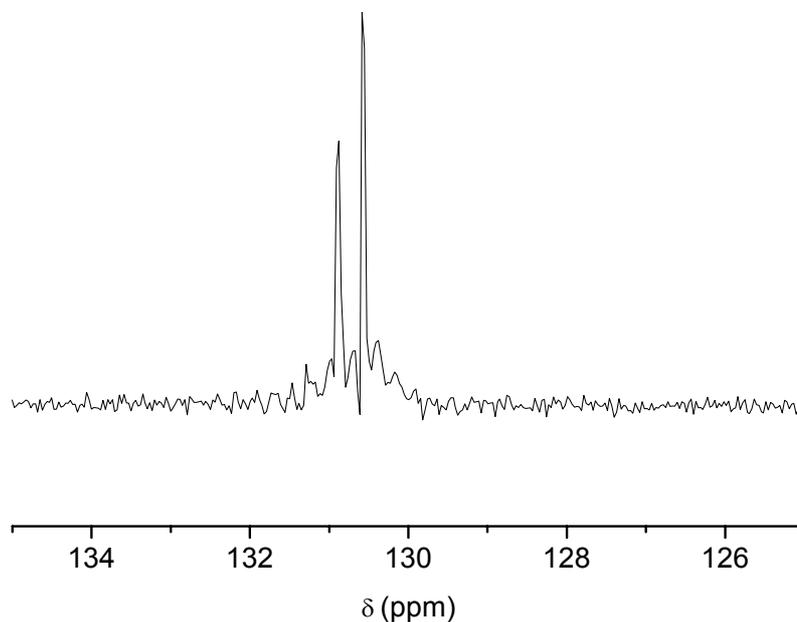


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C da gordura do contra-filé com a sequência de SSFP promediado por 15 minutos

Dessa forma, não foi possível observar os sinais característicos do CLA pelos núcleos de ^{13}C , visto que este ácido graxo possui baixa concentração em relação aos demais ácidos graxos da amostra. Conseqüentemente, para a determinação do teor de CLA nas amostras de gordura bovina utilizou-se apenas RMN de ^1H , que é mais sensível.

4.2. Análise da gordura bovina por RMN de ^1H

No espectro de RMN de ^1H da gordura intramuscular obtida de uma amostra de contra-filé (Figura 16) observam-se os deslocamentos químicos típicos de gordura bovina: os hidrogênios dos grupos metilas terminais dos ácidos graxos em 0,92 ppm (número um); os hidrogênios dos grupos metilenos em 1,33 ppm (número dois), bem como o sinal três ao cinco; os hidrogênios externos do glicerol (número

Tabela 3 - Deslocamentos químicos típicos para os sinais de RMN de ^1H em lipídeos

$\delta(\text{ppm})$	Atribuição
0,92	$-\text{CH}_3$
1,33	CH_2-CH_2-
1,61	$-\text{COCH}_2\text{CH}_2-$
2,07	$=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$
2,27	$-\text{COCH}_2$
2,78	$=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{}$
4,12 ; 4,31	$\text{CH}_2\text{OCO}-$
5,30	$\text{CHOCO}-$
5,34	$-\text{CH}=\text{}$

(Rutar, 1989⁶⁵).

No espectro da Figura 16 não foi possível observar os sinais dos hidrogênios de carbono insaturados do CLA, como no espectro da Figura 17.

No espectro da Figura 17 visualizam-se quatro sinais do isômero *cis9,trans11* CLA, sendo dois multipletos (5,32 e 5,69 ppm) e dois tripletes (5,94 e 6,30 ppm) atribuídos aos hidrogênios externos (9 e 12) e aos internos (10 e 11), respectivamente. O hidrogênio referente ao sinal em 5,94 ppm (10) acopla com os hidrogênios 9 e 11 e o referente ao sinal em 6,30 ppm (11) acopla com os hidrogênios 10 e 12. Os hidrogênios referentes ao sinal em 5,32 ppm acoplam com os hidrogênios 8 e 10, e o em 5,69 ppm com os hidrogênios 11 e 13.

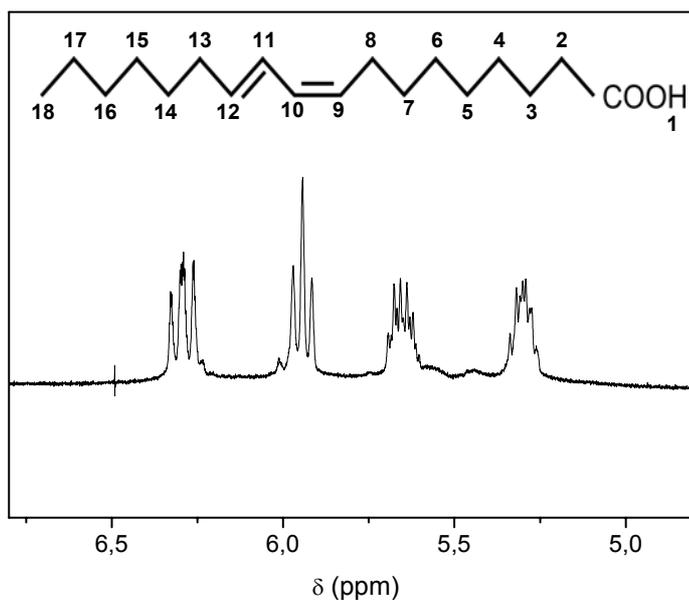


Figura 17. Espectro de RMN de ^1H obtido em 400 MHz da região insaturada do CLA (Amostra padrão - Sigma Aldrich).

Para a observação dos sinais dos hidrogênios dos carbonos insaturados do CLA foi necessário fazer uma ampliação dos espectros de RMN das amostras analisadas na região de 5 a 6,5 ppm (Figuras 18a e b). Nesta figura pode-se ver que os hidrogênios ligados aos carbonos insaturados encontram-se em 6,30, 5,94 e 5,69 ppm. O sinal que seria esperado em 5,32 ppm não pode ser identificado na gordura bovina pois se sobrepõem aos dos outros ácidos graxos presentes na amostra.

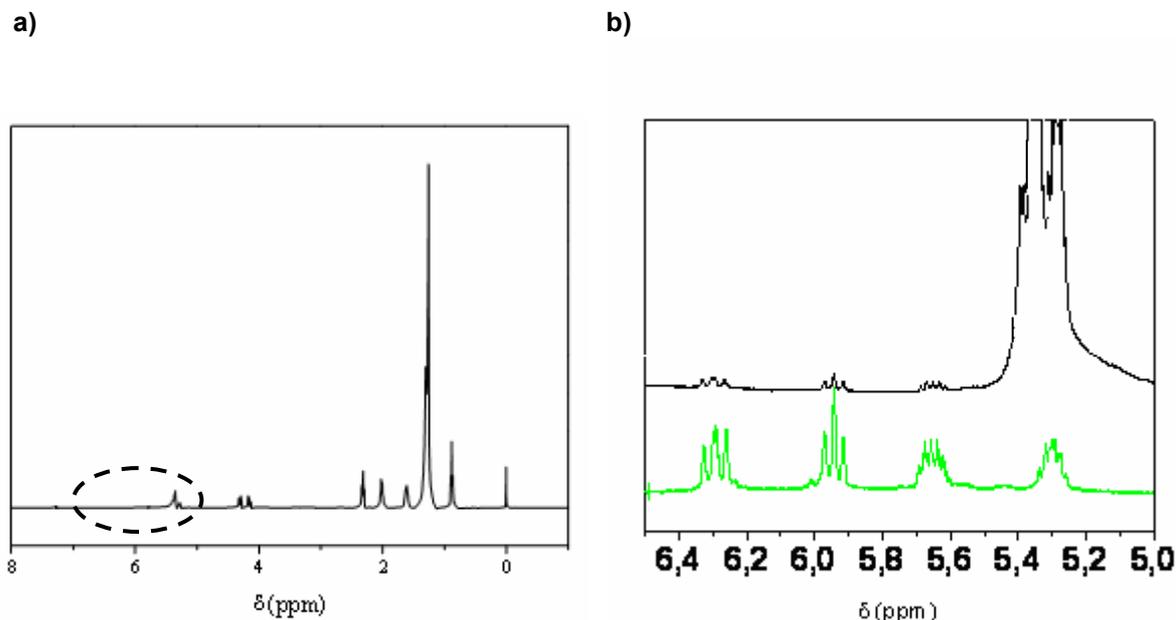


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H da gordura extraída do contra-filé (a) e a expansão da região de 5,0 a 6,5 ppm, na qual é possível observar os sinais característicos do CLA (b) : na amostra analisada (acima) e na amostra padrão (abaixo).

Na região expandida (Figura 18b) pode-se visualizar dois tripletos característicos do isômero *cis9, trans11* CLA, localizados em 5,94 e 6,30 ppm dos hidrogênios 10 e 11 (Figura 17), visto que em algumas amostras o sinal em 5,69 ppm é sobreposto por alguns sinais desconhecidos.

Estes sinais característicos também possuem valores de constantes de acoplamento (J) compatíveis com os dados encontrados na literatura. Segundo a literatura, o valor da constante de acoplamento J para a ligação *cis* é de 11 Hz enquanto para a ligação *trans* é de 15 Hz. Estes valores estão condizentes com os valores de J encontrados nos espectros desse estudo, visto que o J para o sinal referente a 5,94 ppm foi de 10,75 Hz (ligação *cis*) e o J para o sinal referente a 6,30 ppm foi de 13 Hz (ligação *trans*).

4.3. Excitação seletiva

Como pode se observar na Figura 18a, a visualização do sinal do CLA presente na amostra de contra-filé fica prejudicada pela presença dos outros sinais de alta intensidade como é o caso do metileno dos ácidos graxos em 1,33 ppm. Como os sinais de CLA não se sobrepõem a dos outros ácidos graxos, avaliou-se o uso de técnicas de excitação seletiva para melhorar a identificação dos mesmos.

Na maioria dos experimentos de RMN são utilizados pulsos de curta duração e com alta potência, os chamados de “*hard pulses*” ou pulsos duros. Entretanto, em experimentos onde se deseja obter uma excitação seletiva, utilizam-se pulsos longos e com baixas potências, os quais excitam somente uma região selecionada no espectro. Estes pulsos são comumente referidos como “*soft pulses*” ou pulsos moles⁶⁶.

O formato do pulso seletivo mais simples é um pulso retangular longo e de baixa potência (pulso mole) em relação ao usual pulso duro retangular e de curta duração. Entretanto, pulsos com formatos retangulares fornecem um perfil de excitação indesejável, na forma de “*side-lobes*” que se estende além da janela espectral de excitação, resultando em uma seletividade baixa (Figura 19)⁶⁶.

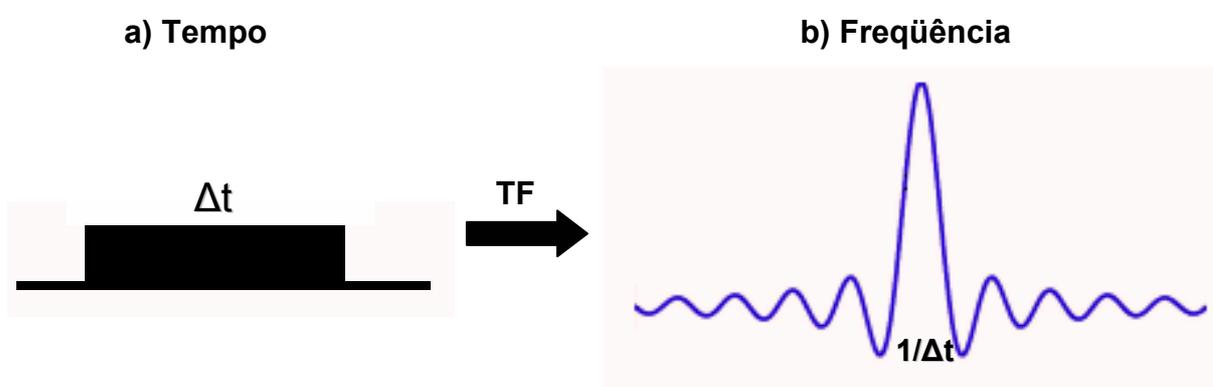


Figura 19. Pulso retangular de baixa potência (a) e perfil de excitação resultante (b).

Este efeito indesejável pode ser suprimido pela atenuação das bordas dos pulsos de radiofrequência, como os perfis encontrados nos chamados pulsos “formatados”, os quais são utilizados em uma variedade de pulsos de excitação seletiva utilizados em RMN de alta resolução⁶⁶.

Os pulsos formatados mais elaborados são utilizados com o objetivo de produzir um perfil próximo ao “top-hat” ou topo de chapéu (Figura 20a), e ainda manter a uniformidade de fase para todas as ressonâncias excitadas dentro de uma janela espectral pré-definida. Os pulsos formatados do tipo BURP (*Band-selective, Uniform Response, Pure phase pulses*), especialmente o pulso de excitação EBURP2 e o pulso de inversão IBURP2, são gerados por procedimentos computacionais que resultam em perfis de pulsos exóticos (Figura 20b) e direcionam os vetores de magnetização através de trajetórias mais tortuosas⁶⁶.

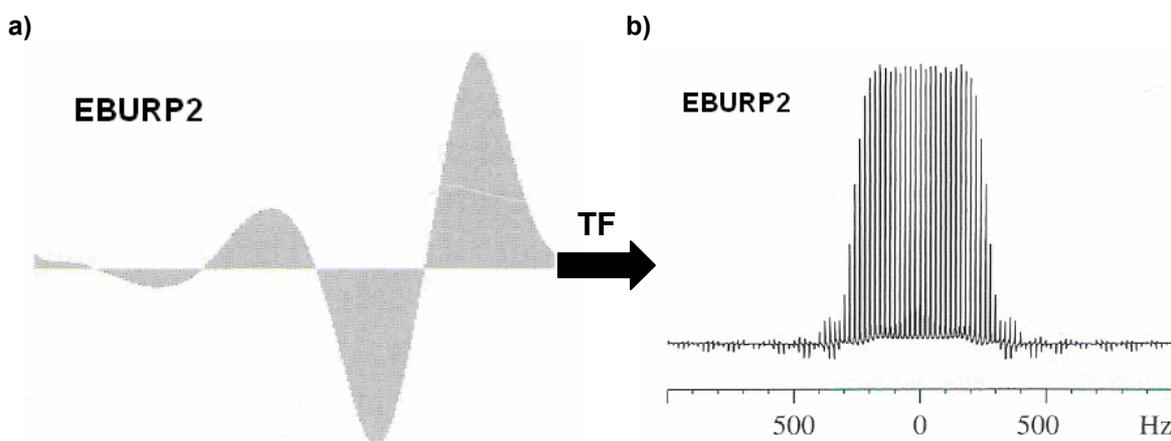


Figura 20. a) Perfil no domínio do tempo do pulso formatado do tipo EBURP2; b) Perfil de excitação simulado para o pulso seletivo EBURP2⁶⁶.

Dessa forma, para a melhor visualização do sinal de interesse, os hidrogênios ligados aos carbonos olefinicos do CLA, foi utilizada nesse estudo a ferramenta denominada como Pandora’s box (Pbox).

Na Figura 21 tem-se um espectro de uma amostra de gordura bovina com excitação seletiva (EBURP2) no sinal de CLA, em 6,3 ppm. Nesta figura pode-se ver que o sinal excitado seletivamente (em 6,3 ppm) tem alta intensidade comparado, por exemplo, ao sinal mais intenso em 1,33 ppm, obtido no espectro normal (Figura 18).

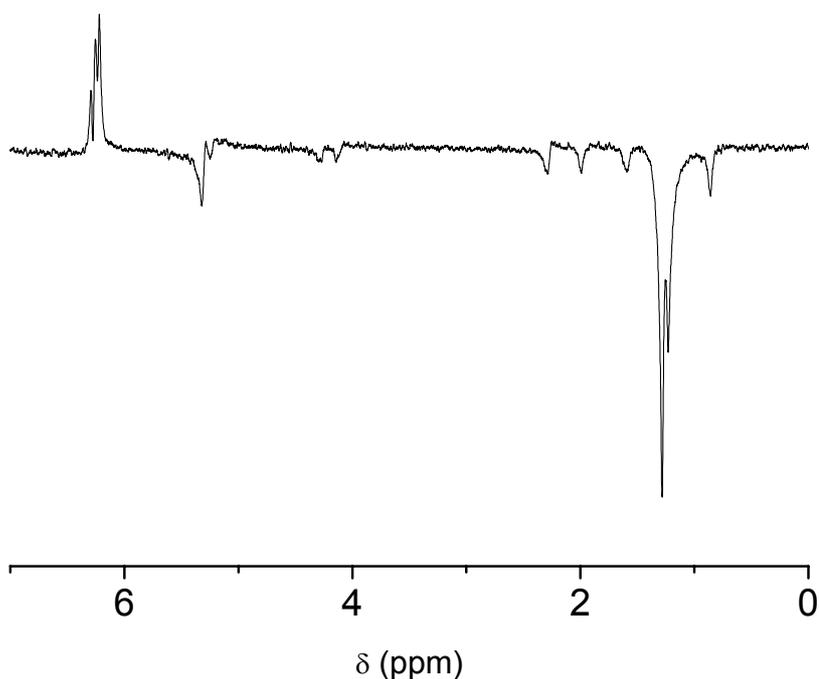


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H de uma amostra da gordura do músculo do contra-filé utilizando excitação seletiva EBURP2.

No entanto, este tipo de excitação seletiva não pode ser utilizado nos passos seguintes do trabalho, pois, apesar de resultar em uma maior razão sinal/ruído para os sinais de interesse do CLA, o sinal do glicerol (em 4,12 e 4,31 ppm) empregado como referência nas integrações apresentou distorções na fase, impossibilitando seu uso em análises quantitativas. Por esta razão, passou-se a usar os espectros obtidos com a seqüência de RMN de ^1H não seletiva.

4.4. Análise quantitativa do teor de CLA por RMN de ^1H

Na Figura 22 são apresentados os espectros de RMN de ^1H de duas amostras de gordura bovina. Nesses espectros pode-se ver que há uma diferença marcante entre a intensidade dos sinais característicos do CLA (em 6,3 ppm) entre as duas amostras. O espectro (b) apresenta maior intensidade do sinal do CLA, indicando um maior teor desse ácido graxo em relação a amostra do espectro (a).

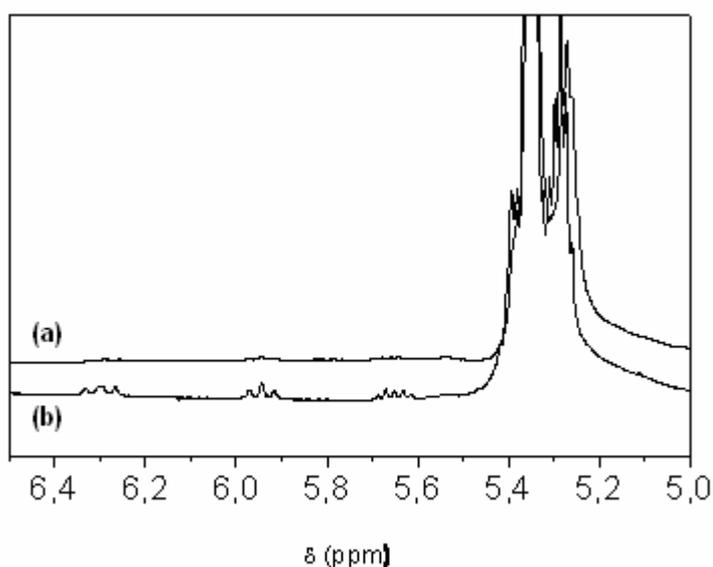


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H de duas amostras da gordura intramuscular de contra-filé com diferentes teores de CLA.

Essa diferença do teor de CLA encontrado nas amostras da Figura 22 pode estar relacionada às diferenças na dieta, as condições de criação ou idade do animal. Como, por exemplo, o estudo realizado por Noci e colaboradores⁶⁷ em que demonstraram que esta diferença pode estar relacionada principalmente à alimentação dos animais, uma vez que observaram que bovinos alimentados com ração de silagem e concentrado (70:30), aumentam o teor de CLA na gordura intramuscular e também melhoram a razão de ácidos graxos poliinsaturados por ácidos graxos saturados, do que aqueles animais alimentados com maior conteúdo

de concentrado. Porém, no presente estudo, isto não pode ser afirmado, pois não foram obtidas informações prévias sobre a alimentação dos animais.

Para a análise do teor de CLA em gordura bovina pelos espectros de RMN de ^1H (Figura 23), integrou-se o sinal do glicerol em 4,12 e 4,31 ppm a qual foi atribuída uma área relativa igual a 100. Com isso, integrou-se os sinais encontrados em 5,9 e 6,3 ppm. As áreas medidas desses dois sinais foram usadas nas medidas quantitativas.

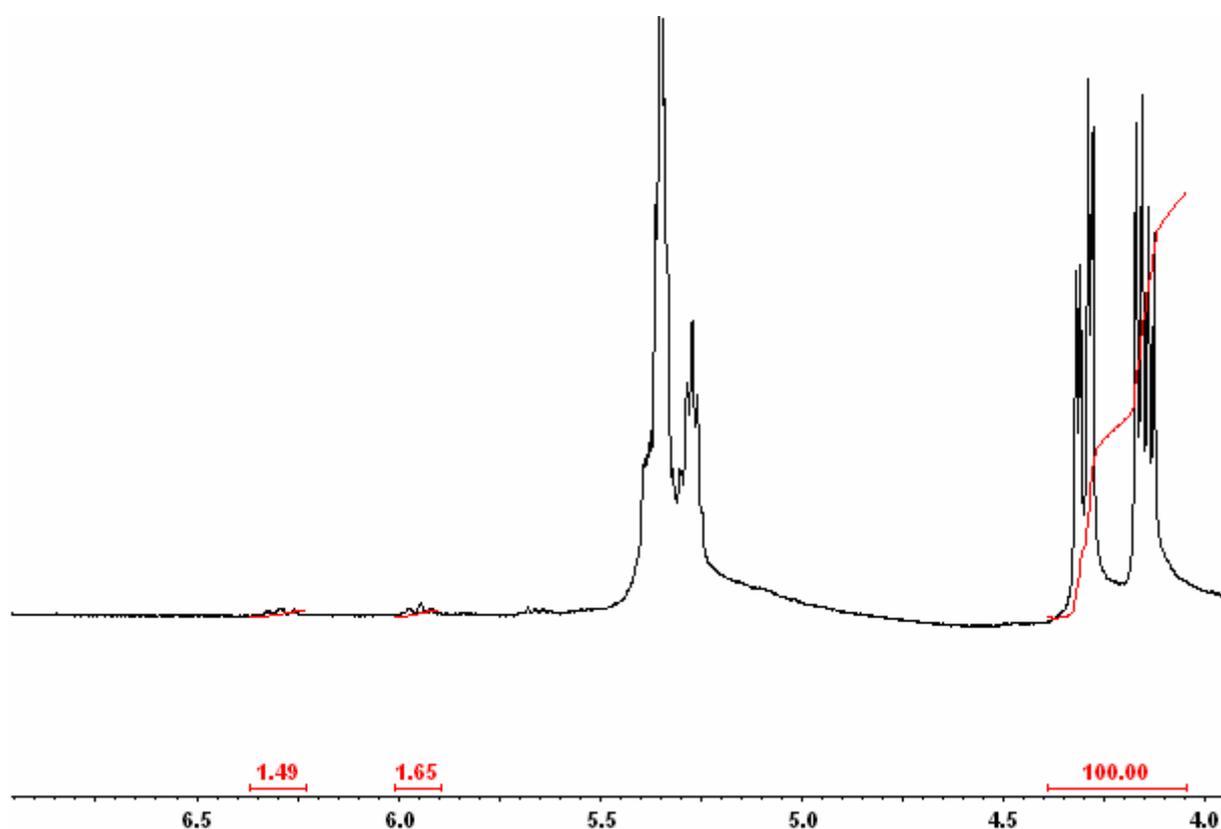


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H obtido para o cálculo do valor médio de CLA em cada amostra analisada.

Com esse método foram analisadas amostras de cortes de patinho, alcatra, picanha, lagarto, costela bovina e contra-filé (intramuscular e subcutânea). Na Tabela 4 observam-se os valores do teor de CLA encontrados em cada corte cárneo analisado.

Tabela 4 – Razão de CLA /Glicerol encontrado nas amostras analisadas por RMN de ^1H .

Amostras*	Razão do CLA/Glicerol
Patinho (6)	0,38
Alcatra (2)	0,47
Picanha (7)	0,49
Lagarto (4)	0,59
Contra-filé (intramuscular) (8)	0,61
Contra-filé (intramuscular) (12)	0,75
Costela do traseiro (3)	0,63
Contra-filé (intramuscular) (10)	0,90
Lagarto (5)	0,98
Contra-filé (intramuscular) (11)	1,03
Contra-filé (intramuscular) (1)	1,38
Contra-filé (subcutânea) (9)	1,51

* Os números em parênteses correspondem ao número da amostra analisada por cromatografia gasosa (Tabela 6).

Para verificar a capacidade de quantificação do teor de CLA por RMN de ^1H , compararam-se os resultados dessas medidas com os obtidos pelo método tradicional de cromatografia gasosa.

4.5. Cromatografia gasosa

Os mesmos extratos dos cortes cárneos analisadas por RMN de ^1H foram transesterificadas com metanol e analisadas por cromatografia gasosa.

Na Figura 24 é apresentado um dos cromatogramas de uma das amostras de gordura bovina. Analisando-se os diferentes tempos de retenção comparando com os padrões foi possível identificar a presença dos ácidos graxos listados na Tabela 5.

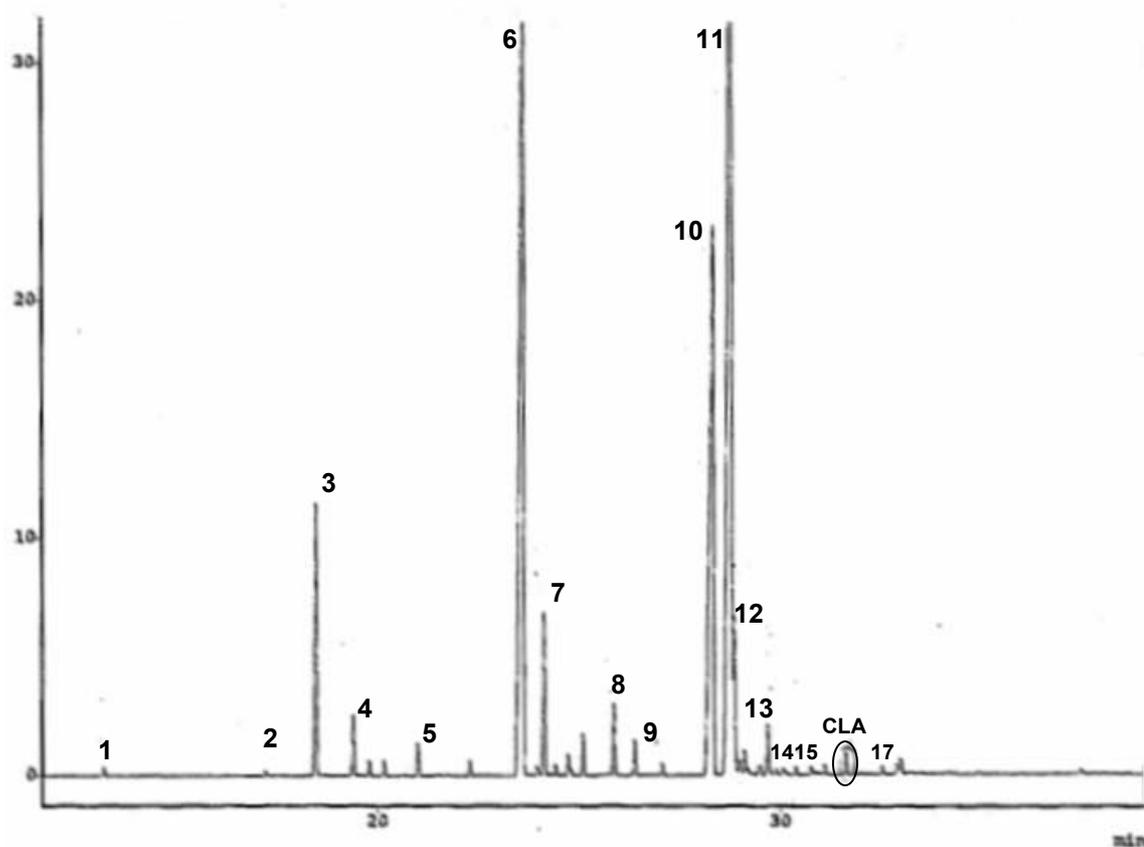


Figura 24. Perfil cromatográfico de uma das amostras analisadas por CG (contra-filé).

Na Tabela 5 estão relatados os ácidos graxos encontrados na Figura 24 segundo a nomenclatura IUPAC e a nomenclatura usual.

Tabela 5 - Nomenclatura dos ácidos graxos encontrados nas amostras analisadas.

Simbologia	Número representado no cromatograma (25)	Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura usual
10:0	1	Ácido decanóico	Ácido cáprico
12:0	2	Ácido dodecanóico	Ácido láurico
14:0	3	Ácido tetradecanóico	Ácido mirístico
14:1	4	Ácido cis-9 tetradecenóico	Ácido miristoléico
15:0	5	Ácido pentadecanóico	Ácido pentadecílico
16:0	6	Ácido hexadecanóico	Ácido palmítico
16:1	7	Ácido 6-hexadecenóico	Ácido palmitoléico
17:0	8	Ácido heptadecanóico	Ácido margárico
17:1	9	Ácido 8-heptadecenóico	
18:0	10	Ácido octadecanóico	Ácido esteárico
18:1n-9	11	Ácido 9-octadecenóico	Ácido oléico
18:1n-7	12	Ácido 11-octadecenóico	Ácido vacênico
18:2n-6	13	Ácido 9,12-octadecadienóico	Ácido linoléico
18:3n-6	14	Ácido 6,9,12-octadecatrienóico	Ácido γ -linolênico
18:3n-3	15	Ácido 9,12,15-octadecatrienóico	Ácido (α -)linolênico
18:2 cis-9,trans-11	16	Ácido cis-9, trans-11 octadecadienóico	CLA (ácido linoléico conjugado)
20:0	17	Ácido eicosanóico	Ácido araquídico

Foram analisadas a gordura intramuscular dos cortes de patinho, alcatra, picanha, lagarto, contra-filé (intramuscular e subcutânea) e a costela do traseiro. Os dados de cromatografia gasosa (Tabela 6) apresentam que cerca de 90% do conteúdo total dos ácidos graxos é composto por sete ácidos graxos: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoléico (16:1), esteárico (C18:0), oléico (C18:1n9c), linoléico (C18:2n6c) e o eicosatrienóico (C20:3n3). Entre estes, como se pode observar os principais ácidos graxos encontrados foram os ácidos oléico (C18:1n9c),

palmitico (C16:0) e esteárico (C18:0), representando cerca de 80% do total dos ácidos graxos. Os valores observados na gordura intramuscular das carnes estudadas foram semelhantes ao relatado por Duckett¹⁴ no ano de 2001.

Os ácidos esteárico (C18:0) e oléico (C18:1n9c) nas amostras analisadas constituem aproximadamente 55% dos ácidos graxos totais (17% e 38%, respectivamente). Em relação a esses ácidos graxos monoinsaturados com a configuração *cis* (como é o caso do ácido graxo oléico), Cifuni e colaboradores⁶⁸ demonstraram que estes possuem ação hipocolesterolêmica, com a vantagem adicional de não reduzir o colesterol HDL, protegendo contra doenças coronarianas. Já relacionado com o esteárico (C18:0) que é saturado, French e colaboradores⁶⁹, relataram ter efeito nulo, pois se transforma em ácido oléico (C18:1n9c). O ácido oléico é considerado o de maior concentração na carne de novilhos e esta relacionado com a qualidade sensorial da carne.

Tabela 6 - Perfil dos ácidos graxos (g/100g de ácidos graxos totais) em diferentes partes de gordura intramuscular de bovinos obtidos das análises de cromatografia gasosa dos cortes de: contra-filé (intramuscular) (1, 8, 10 , 11, 12), alcatra (2), costela do traseiro (3), lagarto (4 e 5), patinho (6), picanha (7), contra-filé (subcutânea) (9) (ND - não detectado)

Ácidos graxos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
C10:0	0,05	0,09	0,08	0,10	0,05	0,07	0,06	0,07	0,06	0,07	0,07	0,07
C12:0	0,13	0,12	0,14	0,11	0,07	0,11	0,09	0,06	0,11	0,13	0,10	0,10
C14:0	3,88	4,10	4,21	3,64	2,81	4,52	3,87	2,54	3,69	4,06	4,16	3,87
C14:1	1,06	0,64	0,67	0,57	0,67	0,90	1,13	0,35	1,41	1,27	1,75	0,79
C15:0	0,63	0,52	0,87	0,54	0,59	0,49	0,40	0,19	0,88	0,57	0,51	0,58
C16:0	25,44	27,66	26,92	31,00	28,16	28,18	28,64	28,74	25,02	29,46	29,16	28,27
C16:1	3,38	2,47	2,59	2,86	2,91	2,63	3,96	2,14	4,15	4,10	5,38	2,89
C17:0	1,21	1,14	1,57	1,24	1,28	1,15	1,03	1,10	1,34	1,11	0,91	1,27
C 17:1	0,92	0,53	0,79	0,74	0,85	0,56	0,88	0,55	1,18	0,92	0,97	0,74
C18:0	14,82	24,60	21,92	18,63	18,86	18,42	12,66	19,74	14,31	12,51	10,09	17,97
C18:1n9c	40,73	31,85	33,03	35,55	37,05	38,84	40,50	38,43	40,57	40,78	41,68	37,73
C18:1n7c	3,94	3,13	4,25	2,49	3,27	2,06	2,22	2,37	4,08	2,74	2,88	3,38
C18:2n6c	1,27	1,88	1,30	1,11	1,25	0,91	1,95	1,49	0,78	0,80	0,81	0,86
C18:3n6	0,14	0,15	0,25	0,12	0,17	0,12	0,08	0,10	0,19	0,11	0,08	0,15
C18:3n3	0,48	0,23	0,33	0,26	0,47	0,16	0,62	0,53	0,27	0,28	0,26	0,31
CLA	1,37	0,4	0,63	0,44	0,74	0,37	0,41	0,51	1,46	0,72	0,75	0,59
C 20:0	0,12	0,2	0,20	0,13	0,14	0,14	0,08	0,23	0,20	0,10	0,09	0,13
C20:1n9	0,24	0,12	0,12	0,22	0,20	0,28	0,14	0,19	0,19	0,14	0,15	0,13
C20:2	0,03	0,03	0,04	0,06	0,11	0,03	0,05	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
C20:3n6	0,05	0,03	0,04	0,10	0,11	0,03	0,17	0,10	0,04	0,04	0,04	0,05
C20:3n3	0,11	0,11	0,05	0,09	0,24	0,03	0,79	0,39	0,04	0,06	0,09	0,09
C20:5n3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,27	0,15	ND	ND	0,04	ND

Observando a Tabela 6, nota-se que o ácido graxo mirístico (C14:0) representou apenas cerca de 4% do total de ácidos graxos encontrados na carne de bovinos, enquanto que o palmítico (C16:0), aproximadamente 28%. De acordo com French e colaboradores⁶⁹ o ácido mirístico é o mais indesejável, uma vez que este, juntamente com o ácido palmítico, enriquece os fosfolipídios das membranas celulares, interferindo com a função normal dos receptores de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), reduzindo sua absorção e aumentando sua concentração no plasma, sendo portanto considerados aterogênicos²⁰. Entretanto, o ácido mirístico é considerado o mais aterogênico, possuindo um potencial de elevar o colesterol em quatro vezes mais que o ácido palmítico

Como pode ser observado na Tabela 6 os percentuais encontrados dos ácidos graxos linoléico - n6 (C18:2n6c) foram de 0,78 a 1,95% e dos ácidos graxos linolênicos -n3 (C18:3n3) foram de 0,16 a 0,62 % bem como a relação entre eles (n6/n3). A razão n6/n3 média encontrada nesse estudo foi de 3,43. Este valor encontra-se dentro do recomendado pelo ministério da saúde da Inglaterra (HMSO¹⁹, 1994), que é de no máximo 4,0. Isto porque em excesso, os AG da série n6 produzem eicosanóides inflamatórios e cancerígenos, aumentando risco de situações como câncer, morte súbita, doenças cardíacas, vasoconstrição, aumento de pressão arterial, elevação da taxa de triglicerídeos, depressão entre outras doenças inflamatórias. Em contrapartida, Woollett e colaboradores²⁰ e Fagundes²¹ relatam que os ácidos graxos da série n3 são antiinflamatórios, antitrombóticos, antiarrítmicos e reduzem os lipídeos do sangue, tendo propriedades vasodilatadoras.

A relação dos ácidos graxos poliinsaturados e os ácidos graxos saturados, AGP/AGS, na carne de ruminantes é desfavoravelmente baixa, por causa da hidrogenação dos ácidos graxos não saturados realizados pelos microrganismos

no rúmen⁶⁸. A razão AGP/AGS média encontrada nos dados de cromatografia gasosa foi de 0,05 (Tabela 6). Este valor foi inferior ao observado por French e colaboradores⁶⁹ para novilhos terminados em pasto (0,13). Apesar dessa biohidrogenação dos ácidos graxos não saturados, segundo Raes e colaboradores⁷⁰ um maior teor de ácidos graxos n3 encontrados, podem ser de animais a pastejo, pela maior concentração do ácido C18:3n3 no pasto, enquanto, que os animais com maior teor de n6, podem ser de animais alimentados com grãos, devido a maior presença dos ácidos graxos n6 nestes .

Na Tabela 6 também é apresentado o teor de CLA encontrado em cada amostra analisada por cromatografia gasosa de diferentes cortes cárneos do boi. As análises revelaram o teor de CLA em cada amostra, sendo a variação do teor encontrado de (0,37 a 1,46%). Estes valores referem-se à mistura diastereoisomérica *cis/trans*, uma vez que a separação destes isômeros não é obtida por cromatografia gasosa, conforme já relatado por Roach e colaboradores⁵⁵. Seria necessária a combinação da cromatografia líquida de alta performance com íons de prata e a cromatografia gasosa para oferecer a total separação desses isômeros. Na Tabela 6 podem ser observadas variações dos teores de CLA de acordo com a localização da gordura no animal. Esse fato corrobora com o trabalho de Webb¹⁵, em que afirma que há diferenças de teor de CLA para diferentes cortes em relação ao perfil de ácidos graxos em animais ruminantes.

4.6. Comparação entre os métodos de cromatografia gasosa e RMN de ^1H para a determinação do teor de CLA em carne bovina

Apesar da cromatografia gasosa ser a técnica padrão para determinação de CLA, esse método envolve várias etapas, havendo a necessidade da derivatização (reação de transesterificação) e de purificação antes da análise cromatográfica.

Nesse contexto, buscou-se uma metodologia mais rápida para a determinação do teor de CLA em amostras de carne bovina. Dessa forma, comparou-se por cromatografia gasosa e por RMN de ^1H , o teor de CLA encontrado nas amostras de alguns cortes bovinos (patinho, alcatra, picanha, lagarto, costela bovina e contra-filé – intramuscular e subcutânea). Os valores obtidos por ambas as técnicas estão representada no gráfico da Figura 25.

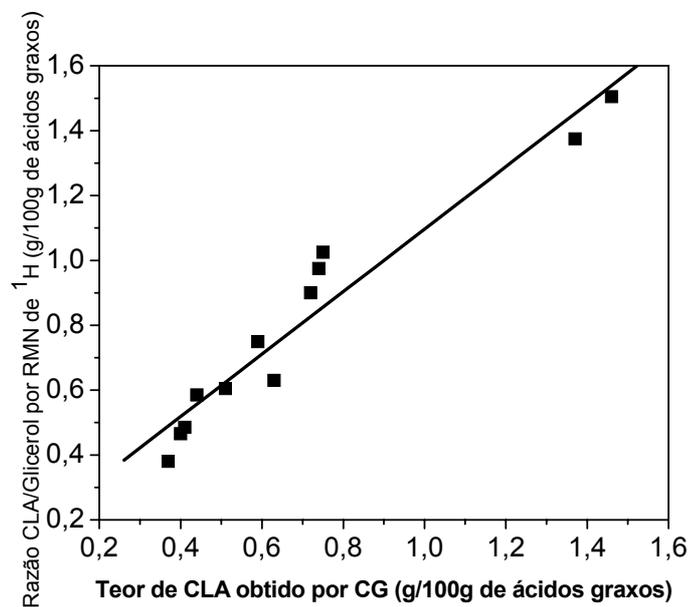


Figura 25. Comparação entre os métodos de CG e RMN de ^1H para determinação do teor de CLA em carne bovina.

De acordo com o gráfico da Figura 25, pode se verificar que as duas técnicas resultam em valores compatíveis, apresentando uma correlação satisfatória ($R = 0,97$).

Geralmente os ácidos graxos em carne bovina são analisados por cromatografia gasosa. Na maioria dos casos a gordura precisa ser convertida em ésteres metílicos antes da análise por CG, sendo o tempo total requerido para essa etapa em torno de 30 minutos. Posteriormente, na análise cromatográfica o tempo requerido para cada amostra de gordura bovina é em torno de 60 minutos. A preparação da amostra para análise por RMN de ^1H consome menor tempo, visto que não é necessária a reação de transesterificação antes da análise, bem como o tempo para aquisição do espectro de RMN de ^1H requer somente alguns minutos. Dessa forma para analisar 30 milhões de cabeças abatidas por ano no Brasil, pelo método de CG levaria aproximadamente 3400 anos. Dessa forma, a RMN de ^1H que leva alguns minutos para a análise, apresentou-se como um método alternativo confiável, rápido e simples para a determinação do teor de CLA nas amostras de carne bovina.

4.7. Comparação do teor de CLA determinado por RMN de ^1H em diferentes partes de bovinos

Cientes de que há grande variação nos componentes químicos e físicos entre os cortes de carne bovina, que pode ser atribuída a fatores ligados à raça, sexo, idade, alimentação e localização anatômica do corte, buscou-se, também avaliar especificamente o teor do CLA entre os cortes de carne: picanha, coxão duro,

contra-filé e ponta de peito. Esses cortes foram selecionados para representar locais distintos nos bovinos, como mostrado na Figura 10 sessão 3.1.

Segundo Luchiari ⁷¹, no sistema de comercialização predominante no Brasil, os quartos da carcaça são separados em cerca de 20 cortes comerciais. Como foi dito anteriormente, há na literatura vários trabalhos buscando obter alterações no perfil de ácidos graxos do músculo contra-filé de bovinos, utilizando estratégias com dietas diferentes. Da mesma forma, o efeito obtido através dessas modificações em outros cortes, além do contra-filé, é pouco conhecido.

As percentagens de CLA encontradas pela técnica de RMN de ¹H quantitativa estão descritos na Figura 26.

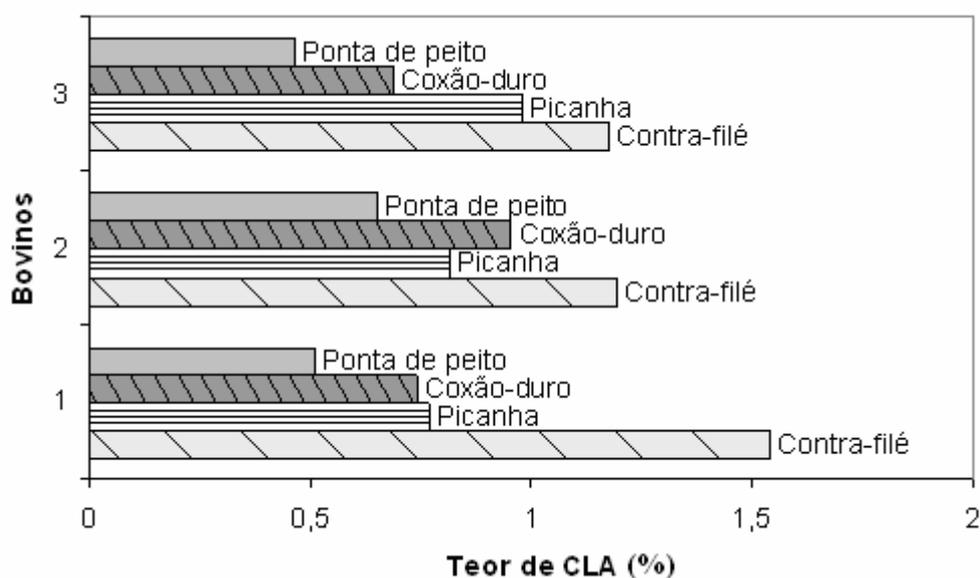


Figura 26. Comparação do teor de CLA em diferentes cortes retirados de 3 bovinos obtido por RMN de ¹H.

As percentagens de CLA encontrados foram semelhantes entre a picanha (0,85%) e o coxão duro (0,79%). Verificou-se um teor baixo no corte de ponta de peito (0,54%), contudo no corte do contra-filé encontrou-se um teor de CLA mais elevado (1,30%) (Tabela 7).

Tabela 7 - Teores de CLA encontrado em diferentes cortes cárneos

	Ponta de peito	Contra-filé	Coxão duro	Picanha
CLA (Média ± dp)	0,54 ± 0,23	1,30 ± 0,510	0,79 ± 0,354	0,85±0,274

Para Luchiari⁷¹ e Marques e colaboradores⁷² existe uma grande variação na percentagem de lipídios totais na carne bovina. Segundo dados da literatura^{73,74} o teor de lipídeos é influenciado por vários fatores como sexo, idade, estado de manutenção e a dieta, bem como a localização anatômica do corte cárneo, sendo que a razão existente para o teor de lipídeos encontrados na carne é proporcional para o teor de CLA.

Dessa forma, a variação da percentagem de CLA observado dos diferentes cortes avaliados foi de 0,54% na ponta de peito a 1,30% no contra-filé. Essa variação pode ser devido à localização anatômica dos cortes, pois de acordo com Luchiari⁷¹, a porcentagem de gordura total é variável nos diferentes músculos, com valores em torno de 2% nos músculos da perna, até a 13% nos músculos abdominais.

Através das análises realizadas, verificou-se que o corte que apresentou um aspecto melhor em relação ao seu possível efeito benéfico para a saúde humana foi o contra-filé, em função do maior teor de CLA encontrado.

4.8. Comparação do teor de CLA na gordura intramuscular e na gordura subcutânea de cortes de contra-filé obtido por RMN de ¹H

De acordo com Costa e colaboradores⁷⁵, a espessura de gordura subcutânea exigida nas carcaças pelos frigoríficos brasileiros situa-se entre 3 a 6 mm, pois

abaixo de 3 mm ocorre o escurecimento da parte externa dos músculos que recobrem a carcaça, depreciando o seu valor comercial. Devido a este motivo, foram realizadas análises por RMN de ^1H do teor de CLA na gordura subcutânea (GSC) e na gordura intramuscular (GIM) ao redor do músculo do contra-filé (Figura 27). A GIM representa o marmoreio da carne, sendo considerada uma característica importante, pois está relacionada com as características sensoriais da carne⁷⁶.

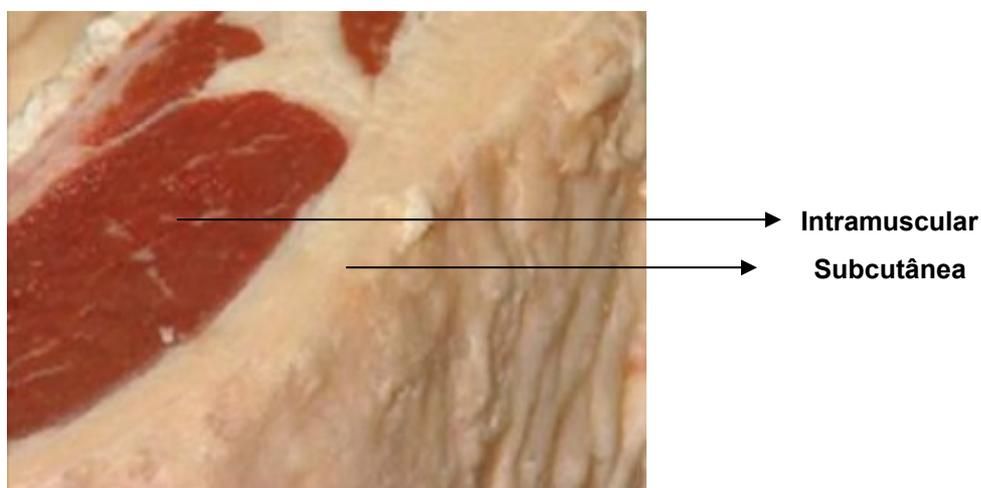


Figura 27. Corte cárneo do contra-filé com a porção de gordura intramuscular e a subcutânea.

Analisou-se a correlação do teor de CLA encontrada na gordura subcutânea e na gordura intramuscular obtidas a partir de 14 amostras de contra-filé. Na Figura 28 observa-se que na maioria das amostras de contra-filé analisadas, o teor de CLA encontrado na gordura subcutânea é maior do que o encontrado na gordura intramuscular.

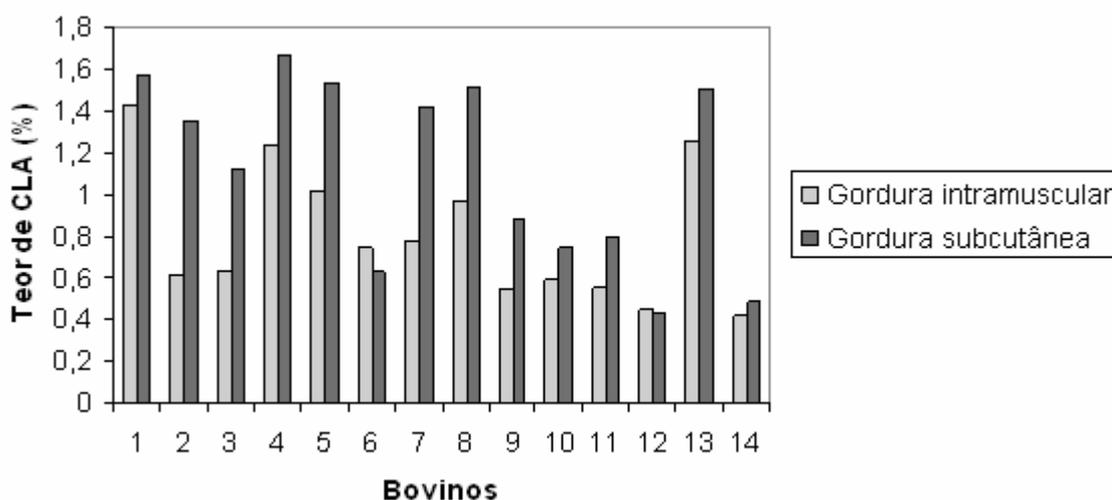


Figura 28. Comparação do teor de CLA extraído de amostras de gordura intramuscular e subcutânea do corte de contra-filé retirados de 14 bovinos distintos.

Os valores para o teor médio de CLA na gordura subcutânea (GSC) foi de 1,12% e para a gordura intramuscular (GIM) foi de 0,80% (Tabela 8), portanto o teor de CLA encontrado na GSC é aproximadamente 28% maior do que o encontrado na GIM.

Tabela 8 - Teores do ácido linoléico conjugado encontrados na gordura subcutânea e na gordura intramuscular do contra-filé.

	Subcutânea	Gordura intramuscular
Ácido linoléico conjugado (Média ± dp)	1,12 ± 0,23	0,80 ± 0,17

Estes resultados estão de acordo com os valores obtidos por Ingle e colaboradores⁸, em que a composição do perfil lipídico depende da dieta do animal e da necessidade de uso das reservas em cada etapa de sua vida. Esse perfil é afetado também por alterações nas intensidades das taxas de deposição de gordura que mudam sua forma de armazenamento interno (perimental, omental e de

descarte) para a externa com o tempo. Dessa forma, é possível que os efeitos das dietas na alteração do perfil lipídico são maiores na GSC do que na GIM.

Na Figura 29 estão relacionados os teores de CLA encontrados na gordura subcutânea (GSC) e na gordura intramuscular (GIM).

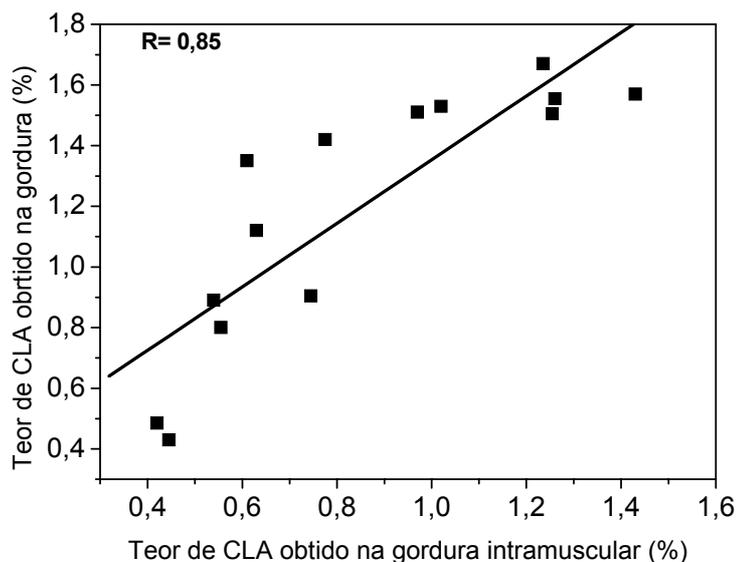


Figura 29. Comparação do teor de CLA obtidos na gordura subcutânea e na gordura intramuscular por RMN de ^1H .

Na Figura 29 pode se observar uma boa correlação entre o teor de CLA encontrado na gordura subcutânea (GSC) e na intramuscular (GIM), indicando que pode-se determinar o teor de CLA na GSC e ter uma estimativa do teor de CLA encontrado na GIM.

No gráfico da Figura 29 nota-se também que alguns animais apresentaram valores muito próximos na GSC (0,44%) e na GIM (0,43%). Essa diferença em relação aos demais animais pode estar relacionada ao fato de que animais castrados possuem um conteúdo similar de ácidos graxos na GSC como na GIM⁷⁷. Porém, como não foram obtidas informações prévias sobre o sistema de criação dos animais analisados, não se podem afirmar essas informações nesse estudo.

4.9. Espectros de RMN de ^1H em 90 MHz

Foi também avaliado o uso de um espectrômetro de 90 MHz, de baixo custo, baseado em imã permanente. Este equipamento é aproximadamente três vezes mais barato que o espectrômetro de 400 MHz e não usa hélio e nitrogênio líquidos, sendo, portanto apropriado para uso industrial.

Dessa forma realizou-se a análise de RMN de ^1H de duas amostras de contra-filé e do CLA puro (Figura 30). No espectro do CLA puro (Figura 30c) pode-se observar que neste campo magnético não se observa a mesma separação espectral e padrão de acoplamento dos espectros obtidos em 400 MHz (Figura 18b). Em 90 MHz os sinais dos hidrogênios dos carbonos insaturados do CLA apresentam um espectro de 2ª ordem. Mesmo assim, é possível observar em 6,3 ppm que o espectro da Figura 30a apresentou maior intensidade em relação ao espectro da Figura 30b, representando um maior teor de CLA na amostra.

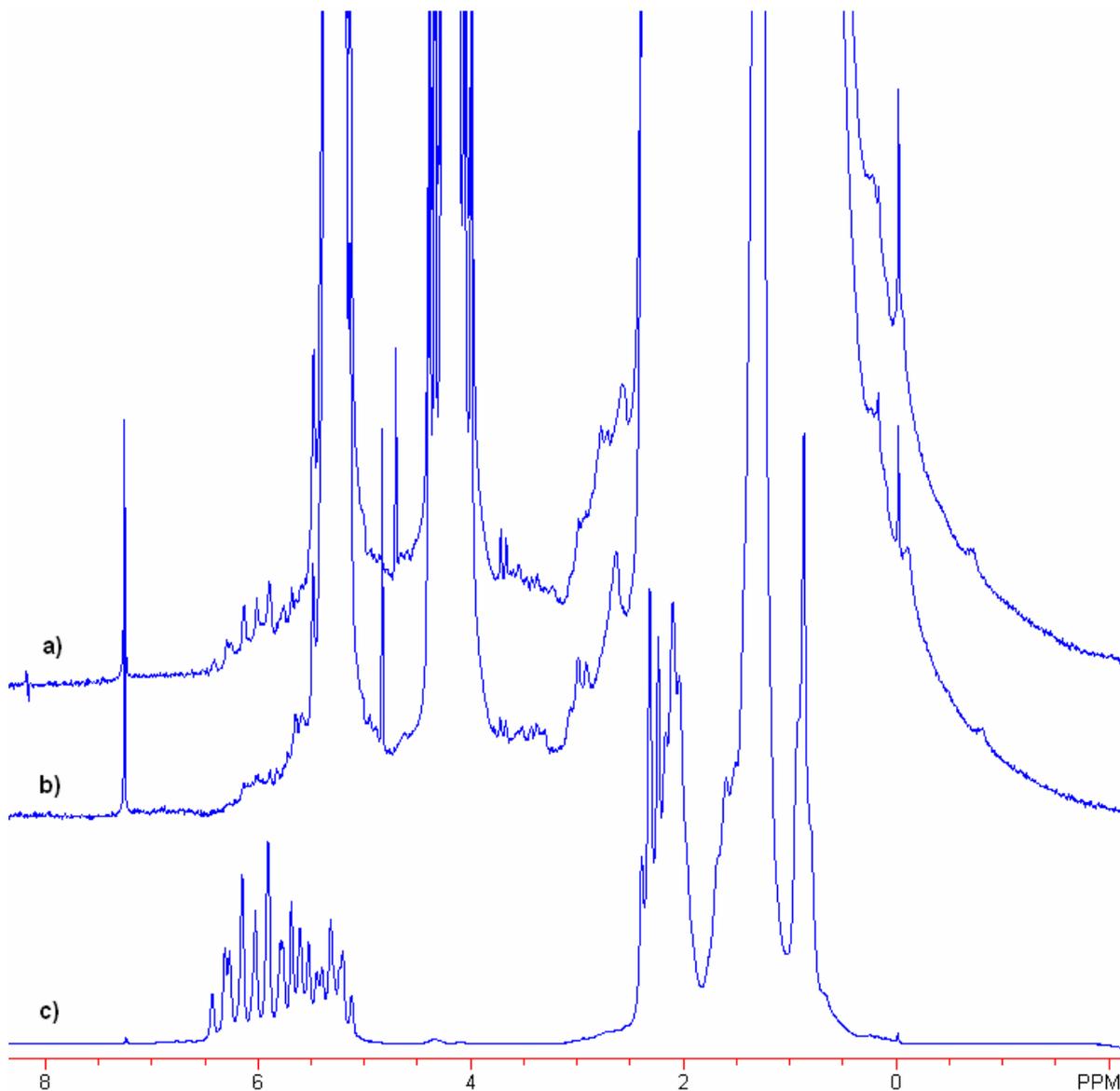


Figura 30. Espectros de RMN de ^1H em 90 MHz adquiridos com 256 scans, (a) e (b) amostras de contra-filé, (c) padrão do CLA.

Para aplicações comerciais este instrumento poderá ser usado para classificar a carne em diferentes teores de CLA (baixo, médio e alto). Dessa forma, a RMN de ^1H em 90MHz consiste em uma ferramenta mais barata e simples para a análise e controle do CLA em carne bovina.

5. CONCLUSÃO

O trabalho mostrou a viabilidade do emprego de nova metodologia de RMN de ^1H para agilizar e reduzir custos para a pesquisa e controle do CLA na carne bovina. A utilização da RMN de ^1H em 400 MHz para a determinação do teor de CLA em carne bovina, além de ter sido coerente com os dados obtidos pela técnica de cromatografia gasosa, se apresentou como um método rápido e simples para a determinação do teor de CLA.

Verificou-se que o uso de pulsos seletivos de RMN de ^1H possibilitou uma melhor visualização dos sinais característicos do isômero cis-9, trans-11 CLA, entretanto não pode ser aplicado na análise quantitativa devido à inversão de fase do pico utilizado como referência (glicerol).

Observou-se uma variação do teor de CLA encontrado em diferentes cortes cárneos, sendo que a amostra de ponta de peito apresentou menor teor, enquanto o de contra-filé apresentou maior teor de CLA. Através das análises realizadas, verificou-se que o corte que apresentou um aspecto melhor em relação ao seu possível efeito benéfico para a saúde humana foi o contra-filé, em função do maior teor de CLA encontrado.

Além disso, observou-se também que o teor de CLA encontrado na gordura subcutânea é maior do que o teor encontrado na gordura intramuscular. Esta diferença pode ser atribuída à composição do perfil lipídico presente na dieta dos animais bem como da necessidade do uso das reservas energéticas em cada etapa da vida do animal.

Os espectros de RMN de ^1H (90 MHz) poderá se tornar uma ferramenta para análise qualitativa do teor de CLA presente em carne bovina em nível comercial.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE (ABIEC). **Bom resultado apesar das adversidades**. Disponível em: <<http://www.abiec.com.br/imprensa.asp?idnews=354>>. Acesso em: 26 fev. 2009.
- 2- JIMÉNEZ-COLMENERO, F.; CARBALLO, J.; COFRADES, J. Healthier meat and meat products: their role as functional foods. **Meat Science**, v. 59, n. 1, p. 5-13, 2001.
- 3- LAWRIE, R.A. **Ciência da carne**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384 p.
- 4- OLIVO, R. Carne bovina e saúde humana. **Revista Nacional da Carne**. 332.ed. São Paulo: BTS, 2004. 332 p.
- 5- PARIZA, M.W.; ASHOOR, S.H.; CHU, F.S.; LUND, D.B. Effect of temperature and time on mutagen formation in pan-fried hamburger. **Cancer Letters**, v. 7, p. 63-69, 1979.
- 6- PARIZA, M. W.; LORETZ, L. J.; STORKSON, J. M. ; HOLLAND, N. C. Mutagens and modulador of mutagens in fried ground beef. **Cancer Research**, v. 43, p. 2444s-2446s, 1983.
- 7- CHIN, S.F.; LIU, W.; STORKSON, J.M.; HÁ, Y.L.; PARIZA, M.W. Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. **Journal Food Composition Analysis**, v. 5, p. 185-197, 1992.
- 8- INGLE, D. L.; JOHNSON, De; BAUMAN, De; MELLENEBE, R. W. Lipogenesis and lipolysis of sheep adipose-tissue during fattening. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 203, 1972.
- 9- REVISTA rural . **Digestão microbiana em ruminantes**. Disponível em: <http://www.revistarural.com.br/Edições/2003/Artigos/rev64_nutrição.htm>. Acesso em: 10 jul. 2008.
- 10- LOERCH, S.C.; BERGER, L.L.; GIANOLA, D. Effects of dietary protein source and energy level on *in situ* nitrogen disappearance of various protein sources. **Journal of Animal Science**, v. 56, n.1, p. 206-216, 1983

11- VAN SOEST, P. J. **Nutritional ecology of the ruminant**. 2. ed. Ithaca: Cornell University, 1994. p. 476.

12- NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 975 p.

13- FRENCH, P.; STANTON, C.; LAWLESS, F.; O'RIORDAN, E.G.; MONAHAN, F.J.; CAFFREY, P.J.; MOLONEY, A.P. Fatty acid composition, including conjugated linoleic acid, of intramuscular fat from steers offered grazed grass silage, or concentrate-based diets. **Journal of Animal Science**, v. 78 , n.11, p. 2849-2855, 2000

14- DUCKETT, S.K. Effect of nutrition and management practices on marbling deposition and composition. **Certified Angus Beef LLC**, Manhattan, 2001. Disponível em :< <http://www.certifiedangusbeef.com/cab/sd/articles/duckett.html>>. Acesso em : 20 mar. 2009.

15- WEBB, E.C. Effect of anatomical location on the composition of fatty-acids in double-muscled. Belgian Blue cows. **Meat Science**, v. 50, p. 45-53, 1998.

16- LAWRENCE, T.J.L. ; FOWLER, V.R. **Growth of farm animals**. New York : CAB International, 1997. 331 p.

17- VISENTAINER, J.V.; FRANCO, M.R.B.; VISENTAINER, J.E.L. Essencialidade dos ácidos graxos de cadeia longa no homem: uma análise crítica. **Revista Nacional da Carne**, v. 27, n. 315, p. 84-88, 2003.

18- WILLIAMS, C.M. Dietary fatty acids and human health. **Annales Zootechnie**, v. 49, p. 165-189, 2000.

19- COMMITTEE ON MEDICAL ASPECTS OF FOOD POLICY. Nutritional Aspects of Cardiovascular Disease. London:Department of Healthy, 1994. p. 37-46. (Report on Healthy and Social Subjects, n.46) HMSO , 1994.

20- WOOLLETT, A.L.; SPADY, K.D.; DIETSCHY, M.J. Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low-density lipoprotein receptor activity and production rate. **Journal of Lipid Research**, v. 33, p. 77-88, 1992.

21-FAGUNDES, L.A. **Ômega-3 e Ômega-6**: o equilíbrio dos ácidos gordurosos essenciais na prevenção de doenças. Porto Alegre: Fundação de Radioterapia do Rio Grande do Sul, 2002. p.111.

22- ENSER, M.; SCOLLAN, N.; GULATI, S.; RICHARDSON, I.; NUTE, G.; WOOD, J. The effects of ruminally-protected dietary lipid on the lipid composition and quality of beef muscle. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF MEAT SCIENCE AND TECHNOLOGY, 47., 2001, Krakovia. **Proceedings...** Krakovia: ITAL, 2001, p. 12-13.

23- IP, C. Review of the effects of trans fatty acids, oleic acid, n-3 polyunsaturated fatty acids, and conjugated linoleic acid on mammary carcinogenesis in animals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, p. 1523-1529, 1997.

24- YURAWECZ, M. P.; KRAMER, J. K. G.; MOSSOBA, M. M.; ROACH, J. A. G.; SEHAT, N.; EULITZ, K.; FRITSCH, J.; KATAOKA, A.; KU, Y. Analytical methodology for CLA. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CLA, 1., 2001, Alesund. **Proceeding...** Alesund: Natural ASA, 2001. p. 14.

25- CHOUINARD, P. Y.; BAUMAN, B. A.; BAUMGARD, M. A. An update on conjugated linoleic acid. In: CORNELL NUTRITIONAL CONFERENCE FEED MANUFACTORY, 1., 1999, Ithaca. **Proceedings...** Ithaca: Cornell university, 1999. p. 93-101.

26- SCHMID, A.; COLLOMB, M.; SIEBER, R.; BEE, G. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: a review. **Meat Science**, v. 73, p. 29-41, 2006.

27- KEPLER, C. R.; HIRONS, K. P.; MCNEILL, J. J.; TOVE, S. B. Intermediates and products of the biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 241, p. 1350-1354, 1996.

28- TANAKA, K. Occurrence of conjugated linoleic acid in ruminant products and its physiological functions. **Animal Science Journal**. v. 76. p. 291-303, 2005.

29- EYNARD, A. R.; LOPEZ, C. B. Conjugated linoleic acid (CLA) versus saturated fats/cholesterol: their proportion in fatty and lean meats may affect the risk of developing colon cancer. **Lipids Health Disease**, v. 2, p. 1476-1511, 2003.

30- MACDONALD, H. B. Conjugated linoleic acid and disease prevention: a review of current knowledge. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 19, n. 90002, p. 111-118, 2000.

31- IP, C. CLA and cancer prevention. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CLA, 1., 2001, Alesund, **Proceedings...** Alesund: Natural ASA, 2001. p. 6-7.

32- BOGNOUX, P.; LAVILLONNIERE, F.; GARAUD, P.; JOURDAN, M. L.; SEBEDIO, J. L.; CHAJES, V. CLA in experimental mammary tumors and in breast cancer. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON CLA, 1., 2001, Alesund. **Proceedings...** Alesund: Natural ASA, 2001. p. 9.

- 33- KNEKT, P. R.; JARVINEN, R.; SEPPANEN, R.; PUKKALA, E.; AROMAA, A. Intake of dairy products and the risk of breast cancer. **Journal of Cancer**, v. 73, p. 687-691, 1996.
- 34- PARIZA, M. W.; HARGRAVES, W. A. A beef-derived mutagenesis modulator inhibits initiation of mouse epidermal tumors by 7,12-dimethylbenzanthracene. **Carcinogenesis**, v. 6, p. 591-593, 1985.
- 35- HA, Y. L.; GRIMM, N. K.; PARIZA, M. W. Anticarcinogens from freid ground beef: heat-altered derivatives of linoléico acid. **Carcinogenesis**, v. 8, p. 1881-1887, 1987.
- 36- FIGUEIREDO, L.C.; CORDEIRO, L.N.; ARRUDA, A.P.; CARVALHO, M.D.F.; RIBEIRO, E. M.; COUTINHO, H.D.M.C. Câncer de pele: estudo dos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 3, p. 179-183, 2003.
- 37- GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.
- 38- RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. p. 829.
- 39- IP,C.; THOMPSON, M.; SING, M.; SCIMECA, J.A. Conjugated licoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. **Cancer research**, v. 54, p. 1212-1215, 1994.
- 40- WAHLE, K.W.J.; HEYS, S.D. Cell signal mechanisms, conjugated linoleic acids (CLAs) and anti-tumorigenesis. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 67, p. 183-186, 2002.
- 41- BELURY, M.A. Inhibition of carcinogenesis by conjugated linoleic acid: Potential mechanisms of action. **The Journal of Nutrition**, v.132, p. 2995-2998, 2002.
- 42- MAJUNDER, B.; WAHLE, K.W.J.; MOIR, S.; SCHOFIELD, A.; CHOE, S.N.; FARQUHARSON, A.; GRANT, I.; HEYS, S. D. Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. **The FASEB Journal**, v. 16, p. 1447-1449, 2002.

43- ISLAM, MOHAMMAD A.; KIM, YOUNG S.; JANG, WOOK J.; LEE, SEON M.; KIM, HOON G.; KIM, SO Y.; KIM, JEONG O.; HA, YEONG L. A mixture of trans, trans conjugated linoleic acid induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells with reciprocal expression of Bax and Bcl-2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 5970-5976, 2005.

44- OU, L.; IP, C.; LISAFELD, B.; IP, M.M. Conjugated linoleic acid induces apoptosis of murine mammary tumor cells via Bcl-2 loss. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 356. p. 1044-1049, 2007.

45- PINHO, M.S.L. Angiogênese : o gatilho proliferativo. **Revista Brasileira Coloproctologia**, v. 25. n. 4, p. 396-402, 2005.

46- MASSO-WELCH, P.A.; ZANGANI, D.; IP, C.; VAUGHAN, M.M.; SHOEMAKER, S.; RAMIREZ R. A.; IP. M.M. Inhibition of angiogenesis by the cancer chemopreventive agent conjugated linoleic acid. **Cancer Research**, v. 62, p. 4383-4389, 2002.

47- SIKORSKI, A.M.; HEBERT, N.; SWAIN, R.A. Conjugated Linoleic Acid (CLA) inhibits new vessel growth in the mammalian brain. **Brain Research**, v. 1213, p. 35-40, 2008.

48- BANNI, S.; CARTA, G.; ANGIONE, E.; MURRU, E.; SCANU, P.; MELIS, M.P.; BAUMAN, D.E.; FISHER, S.M.; IP, C. Distribution of conjugated linoleic acid and metabolites in different lipid fractions in the rat liver. **Journal of Lipid Research**, v. 42, p. 1056-1061, 2001.

49- EVANS, M. E.; BROWN, J. M.; MCINTOSH, M. K. Isomer-specific effects of conjugated linoleic acid (CLA) on adiposity and lipid metabolism. **Journal of Nutrition Biochemistry**, v. 13, p. 508-516, 2002.

50- RISÉRUS, U.; ANNIKA, S.; BASU, S.; VESSBY, B. CLA and body weight regulation in humans. **Lipids**, v. 38, n. 2, p. 133- 137, 2003.

51- DEPETRIS, G.; SANTINI, F.J. **Sistemas de alimentación y su impacto sobre las características químicas y organolépticas de la carne en bovinos**. Estación Experimental Agropecuaria Balcarce – Grupo de nutrición, metabolismo y calidad de producto, 2005. Disponível em: < www.inta.gov.ar/balcarce>. Acesso em : 02 fev. 2009.

- 52- NUERNBERG, K.; DANNENBERGER, D.; NUERNBERG, G. Effect of a grass-based and a concentrate feeding system on meat quality characteristics and fatty acid composition of *Longissimus* muscle in different cattle breeds. **Livestock Production Science**, v. 94, p. 137–147, 2005.
- 53-PRIYA, S. M.; TIMOTHY, A.M.; SHANNON, S.; JENNIFER, A.; VERN, B.; DUANE, M.; EDWARD, C.; LAKI, G.; JOHN, B.; ERASMUS, O.; RANDALL, J.W.; ZAHIR, M. Conjugated linoleic acid- enriched beef production. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p. 1207-1211, 2004.
- 54- SHANTHA, N.C.; CRUM, A.D.; DECKER, E.A. Evaluation of conjugated linoleic acid concentrations in cooked beef. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1757-1760, 1994.
- 55- ROACH, J.A.G.; MOSSOBA, M.M.; YURAWECZ, M.P.; KRAMER, J.K.G. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. **Analytica Chimica Acta**, v. 465, p. 207-226, 2002.
- 56- LUNA, P.; JUÁREZ, M.; FUENTE, M.A. Gas chromatography and silver-ion high-performance liquid chromatography análisis of conjugated linoleic acid isomers in free fatty acid form using sulphuric acid in methanol as catalyst. **Journal of Chromatography A**, v. 1204, p. 110-113, 2008.
- 57- DELMONTE, P.; YURAWECZ, M.P.; MOSSOBA, M.M.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; KRAMER, J.K. Improved identification of conjugated linoleic acid isomers using silver-ion HPLC separations. **Journal AOAC International**, v. 87, n. 2. p. 563-8, 2004.
- 58- SEHAT, N.; YURAWECZ, M.P.; ROACH, J.A.; MOSSOBA, M.M.; KRAMER J.K.; KU, Y. Silver-ion high-performance liquid chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. **Lipids**, v. 33, n. 2, p. 217-21, 1998.
- 59- SEHAT, N.; RICKERT, R.; MOSSOBA, M.M.; KRAMER, J.K.; YURAWECZ, M.P.; ROACH, J.A.; ADLOF, R.O.; MOREHOUSE, K.M.; FRITSCHKE, J.; EULITZ, K.D.; STEINHART, H.; KU, Y. Improved separation of conjugated fatty acid methyl acid methyl esters by silver ion-high- performance liquid chromatography. **Lipids**, v. 34, n. 4, p. 407-13, 1999.
- 60-KRAMER, J.K.G.; HERNANDEZ-CRUZ, C.; DENG, Z.; ZHOU, J.; JAHREIS, G.; DUGAN, M.E. Analysis of conjugated linoleic acid and trans 18:1 isomers in synthetic and animal products. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 1137-45, 2004.

61-THE LIPID LIBRARY. Lipid Chemistry, biology and analysis. NMR spectroscopy of fatty acids and their derivatives. Disponível em:< <http://www.lipidlibrary.co.uk>> Acesso em: 26 fev. 2009.

62- HARTMAN,L.; LAGO, R.A.C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475-476, 1973.

63- BRAUN, S. ; KALINOWSKI, H.O. ; BERGER, S. **150 and more basic NMR experiments**. Weinheim: VCH, 1998. 610 p.

64- AZEREDO, R.B.V.; COLNAGO, L.A.; ENGELSBERG, M. Quantitative analysis using steady- state free precession nuclear magnetic resonance. **Analytical Chemistry**, v. 72, p. 2401-2405, 2000.

65- RUTAR, V. Magic angle spinning spectroscopy of liquids as a nondestructive method to study plant seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, p. 67-70, 1989.

66- CLARIDGE, T.D.W. **High-resolution NMR techniques in organic chemistry**. Amsterdam: Pergamon, 1999. 382p.

67- NOCI, F.; O'KIELY, P.; MONAHAN, F. J.; STANTON, C.; MOLONEY, A. P. Conjugated linoleic acid concentration in m. *Longissimus dorsi* from heifers offered sunflower oil based concentrates and conserved forages. **Meat Science**, v. 69, p. 509-518, 2005.

68- CIFUNI, G.F.; NAPOLITANO, F.; RIVIEZZI, A.M.; BRAGHIERI, A.; GIROLAMI, A. Fatty acid profile, cholesterol content and tenderness of meat from Podolian young bulls. **Meat Science, Barking**, v. 67, n. 2, p. 289-297, 2004.

69- FRENCH, P.; O'RIORDAN, E.G.; MONAHAN, F.J. Fatty acid composition of intra-muscular triacylglycerols of steers fed autumn grass and concentrates. **Livestock Production Science**, v. 81, p. 307-317, 2003.

70- RAES,R.; BALCAEN,A.; DIRINCK,P.; DE WINNE A.; CLAYES,E.; DEMEYER, D.; DESMET, S.; Meat quality, fatty acid composition and flavour analysis in Belgian retail beef. **Meat Science, Barking**, v. 65, n. 4, p.1237-1246, 2003.

71- LUCHIARI FILHO, A. **Pecuária da carne bovina**.2.ed. São Paulo:[s.n.], 2000.

- 72- MARQUES, J.A.; PRADO, I.N.; MOLETTA, J.L.; PRADO, I.M.; PRADO, J.M.; MACEDO, L.M.A.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M. Características físico-químicas da carcaça e da carne de novilhas submetidas ao anestro cirúrgico ou mecânico terminadas em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 4, p.1514-1522, 2006.
- 73- VAZ, F.N.; RESTLE, J.; FEIJÓ, G.L.; BRONDANI, I.L.; ROSA, J.R.; SANTO, A.P. Qualidade e composição química da carne de bovinos de cortes inteiros ou castrados de diferentes grupos genéticos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 518-525, 2001.
- 74- RODRIGUES, V.C.; CHOI, N.J.; KURT, E.; FISHER, A.V.; ENSER, M.; WOOD, J.D. Manipulating the fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n.1, p.115-124, 2001.
- 75- COSTA, E.C.; RESTLE, J.; VAZ, F.N. Características da carcaça de novilhos Red Angus superprecoces abatidos com diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 119-128, 2002a.
- 76- COSTA, E.C.; RESTLE, J.; BRONDANI, I.L. Composição física da carcaça, qualidade da carne e conteúdo de colesterol no músculo *Longissimus dorsi* de novilhos Red Angus superprecoces, terminados em confinamento e abatidos com diferentes pesos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 1, p. 417-428, 2002b. Suplemento.
- 77- FRITSCHÉ, S.; FRITSCHÉ, J. Occurrence of Conjugated linoleic acid isomers in beef. **Journal American Oil Chemists Society**, v. 75, n.10, p. 144, 1998.