



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA–UESB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E**  
**CIÊNCIA DE ALIMENTOS**



Área de Concentração: Engenharia de Alimentos e Ciência de Alimentos

**EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A FRAÇÃO LIPÍDICA DO**  
**LEITE EM PÓ DE BÚFALA OBTIDO POR SPRAY DRYER**

**MARIANA FERREIRA ALVES**

**ITAPETINGA**  
**BAHIA – BRASIL**

**2016**

**MARIANA FERREIRA ALVES**

**EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A FRAÇÃO LIPÍDICA DO  
LEITE EM PÓ DE BÚFALA OBTIDO POR SPRAY DRYER**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciências de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”.

**Orientador:** Prof. DSc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

**Co-orientador (a):** Prof.<sup>a</sup> DSc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão

**ITAPETINGA  
BAHIA - BRASIL**

**2016**

637.1

A48e Alves, / Mariana Ferreira

Efeito do tempo de armazenamento sobre a fração lipídica do leite em pó de búfala obtido por spray dryer. / Mariana Ferreira Alves. - Itapetinga: UESB, 2016.

96p.

Dissertação apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciências de Alimentos, para obtenção do título de “Mestre”. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes e co-orientação da Profª. D.Sc. Sibelli Passini Barbosa Ferrão.

1. Bubalinos - Atomização. 2. Leite em pó de búfala – Caracterização - Validação. 3. Leite em pó de búfala - Spray dryer. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Fernandes, Sérgio Augusto de Albuquerque. III. Ferrão, Sibelli Passini Barbosa. IV. Título.

**CDD(21): 637.1**

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535

Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Bubalinos - Atomização
2. Leite em pó de búfala – Caracterização - Validação
3. Leite em pó de búfala - Spray dryer



**Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia**  
Programa de Pós-Graduação  
**Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos**



Áreas de Concentração: Engenharia de Alimentos  
Ciência de Alimentos

**DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO**

**Título:** EFEITO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO SOBRE A FRAÇÃO LIPÍDICA DO LEITE EM PÓ DE BÚFALA OBTIDO POR SPRAY DRYER.

**Autor (a):** MARIANA FERREIRA ALVES

**Orientador (a):** Prof.º Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes

**Co-orientador (a):** Prof.ª Dr.ª Sibelli Passini Barbosa Ferrão

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora.

Prof.º Dr. Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes (UESB)

Prof.ª Dr.ª Cristiane Patrícia de Oliveira (UESB)

Prof.º Dr. Baraquízio Braga do Nascimento Júnior (UESB)

**Itapetinga-BA, 26 de fevereiro de 2016.**

*Ninguém pode chegar ao topo armado apenas de talento.*

*Deus dá o talento;*

*Mas é o trabalho e a persistência*

*que o transformam em sucesso!*

*Ana Pavlovna*

*À Deus*  
*Aos meus pais*  
*Aos meus irmãos*  
*À minha sobrinha Fernanda*  
*Dedico!*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus por dar-me fortaleza e fé em todo momento para que eu pudesse vencer mais uma etapa.*

*Aos meus pais, Fernando (in memorian) e Maria, pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim. Obrigada mãe por todas as suas orações, pelos conselhos e pelo amor incondicional.*

*Aos meus irmãos Igor, Nívea e Péricles e à minha sobrinha Fernanda, por sempre estarem ao meu lado, me apoiando e compartilhando todos os momentos.*

*A todos meus familiares pelo apoio incansável e incentivo sempre.*

*Ao meu namorado João por todo carinho, amor e companheirismo. Sempre acreditando no meu potencial.*

*À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, pela oportunidade de aprendizado e acolhimento durante estes anos.*

*Ao meu orientador, professor Dr. Sérgio Fernandes, pela amizade, confiança, orientação, colaboração e empenho para o desenvolvimento deste trabalho.*

*À minha co-orientadora, professora Dr<sup>a</sup>. Sibelli Ferrão, por contribuir e transmitir os seus conhecimentos para realização desta pesquisa.*

*Aos professores Baraquízio Braga e Cristiane Patrícia, integrantes da banca examinadora, por terem aceitado o convite em contribuir com este trabalho.*

*Às minhas amigas, Marília e Mylena (3M), pela amizade e por terem compartilhado comigo os momentos mais alegres e difíceis durante o mestrado. Em especial a Marília, pelo companheirismo vivenciado e partilhado nos dias cansativos de análises, uma ajudando a outra. Obrigada por tudo Mah!*

*À Daniel, um amigo que conquistei nesse período do curso, obrigada por tudo Dan. Primeiramente pelo incentivo, nunca deixando me desanimar, pela ajuda constante nas análises, sempre com muita disposição e pelo auxílio primordial na finalização deste trabalho. O ótimo convívio que tivemos, consolidou-se em amizade que será eterna.*

*Ao Centro de Estudos e Análises Cromatográficas (CEACROM), em especial as professoras Débora Santana e Milena Duarte, pelo apoio e atenção sempre dispensada.*

*À empresa Vale Dourado por disponibilizar o laboratório para a realização das análises, em especial aos funcionários Leo, Jaiane e Marcus.*

*À Tuka em representação à ESALQ-USP, que contribuiu para realização do trabalho.*

*À capes pela concessão da bolsa.*

*Ao Grupo de Estudos em Leite (GEL).*

*A todos os meus amigos, espalhados por todos os cantos, que sempre me deram força e torceram para que eu pudesse conquistar mais essa vitória.*

*Aos colegas do Mestrado e a todas as pessoas que direta e indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.*

*Meu muito obrigado!*

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

<b>Tabela 1.</b> Composição química do leite de búfala por diferentes autores. ....	200
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros do leite em pó integral, parcialmente desnatado e desnatado de vaca.. .....	244
<b>Tabela 3.</b> Principais ácidos graxos do leite de búfala. ....	277

### CAPÍTULO I

<b>Tabela 1.</b> Valores médios da composição físico-química do leite fluido de búfala.....	52
<b>Tabela 2.</b> Valores médios da composição físico-química do leite em pó de búfala nos diferentes tempos de armazenamento.....	54
<b>Tabela 3.</b> Perfil de ácidos graxos do leite em pó de búfala armazenado por diferentes períodos.....	56
<b>Tabela 4.</b> Perfil de ácidos graxos do leite cru (LC) e do leite em pó (LP) de búfala.....	57
<b>Tabela 5.</b> Indicadores nutricionais do leite cru (LC) e em pó (LP) de búfala.....	59

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Variáveis e níveis empregados no planejamento fatorial fracionado.....	70
---	----

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b> Precisão do método analítico para determinação de óxidos de colesterol em leite em pó de búfala, expressa pelo coeficiente de variação.....	89
<b>Tabela 2.</b> Precisão do método analítico para determinação de colesterol em leite em pó de búfala, expressa pelo coeficiente de variação.....	90
<b>Tabela 3.</b> Resultados dos ensaios de recuperação (%) do colesterol e dos seus óxidos na amostra do leite em pó de búfala.....	91
<b>Tabela 4.</b> Quantidade de colesterol e 25-hidroxicolesterol em mg por 100g de leite em pó de búfala.....	92

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1.** Estrutura química do colesterol.....29
- Figura 2.** Formação dos principais óxidos de colesterol encontrados em leite e produtos lácteos. ....31

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Variáveis de maior importância no processo de extração para o colesterol (a), 25-hidroxicolesterol (b) e o 7-cetocolesterol (c) de acordo com Diagrama de Pareto (95% de confiança).....71
- Figura 2.** Superfícies de resposta para extração ótima do colesterol.....73
- Figura 3.** Superfícies de resposta para extração ótima do 25-hidroxicolesterol (25-OH).....74
- Figura 4.** Superfícies de resposta para extração ótima do 7-cetocolesterol (7-ceto).....75

### CAPÍTULO III

- Figura 1.** Cromatograma de amostra do leite em pó de búfala obtido por CLAE-DAD. Picos: 25-hidroxicolesterol e colesterol (a); 7-cetocolesterol (b).....84
- Figura 2.** Cromatograma característico da amostra do leite em pó e espectros de pureza dos picos referentes aos óxidos e ao colesterol: (a) 25-hidroxicolesterol; (b) 7-cetocolesterol e (c) colesterol.....85
- Figura 3.** Curvas analíticas dos padrões de colesterol (a), 25-hidroxicolesterol (b) e 7-cetocolesterol (c).....87
- Figura 4.** Intervalos da Faixa de aplicação das curvas analíticas de colesterol (A), 25-hidroxicolesterol (B) e 7-cetocolesterol (C).....88

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	alfa
$\alpha_s$	alfa s-caseína
$\beta$	beta
cm	centímetro
g	grama
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
$^{\circ}\text{D}$	grau Dornic
$^{\circ}\text{H}$	grau Hortvet
$^{\circ}$	indicativo de ordem
$\kappa$	kappa
L	litro
>	maior
<	menor
$\text{m}^3$	metro cúbico
$\mu\text{g}$	micrograma
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
min	minuto
N	normalidade
$n^{\circ}$	número
$\omega$	ômega
P	peso
%	porcentagem
rpm	rotação por minuto
V	volume

## LISTA DE SIGLAS

AG	Ácido Graxo
AGS	Ácido Graxo Saturado
AGMI	Ácido graxo Monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo Poli-insaturado
CLA	Ácido linoleico conjugado
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
BA	Bahia
CEACROM	Centro de Estudos e Análises Cromatográficas
CEDETEC	Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologias
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de variação
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DP	Desvio padrão
ESD	Extrato seco desengordurado
EST	Extrato seco total
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
n3	Ácidos graxos da família ômega-3
n6	Ácidos graxos da família ômega-6
OsC	Óxidos de Colesterol
p	probabilidade
pH	Potencial hidrogeniônico
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

## SUMÁRIO

RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1 Rebanho bubalino .....	19
2.2 Principais constituintes do leite de búfala .....	19
2.3 Processo de secagem .....	21
2.3.1 Secagem em spray dryer.....	21
2.3.2 Leite em pó .....	22
2.3.3 Composição do leite em pó .....	23
2.3.4 Efeito do tempo de armazenamento sobre o leite em pó.....	24
2.4 Ácidos graxos presentes no leite de búfala.....	26
2.5 Ácido Linoleico Conjugado (CLA).....	28
2.6 Colesterol.....	28
2.7 Óxidos de colesterol .....	30
2.8 Planejamento experimental.....	32
2.8.1 Otimização.....	32
2.8.2 Validação de métodos cromatográficos.....	33
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo Geral .....	36
3.2 Objetivos Específicos .....	36
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37
CAPÍTULOS .....	45
CAPÍTULO I.....	46
RESUMO .....	47
ABSTRACT .....	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.1 Obtenção da matéria prima e local do experimento .....	49
2.2 Produção do leite em pó de búfala.....	49
2.3 Caracterização do leite em pó.....	50
2.4 Análise de ácidos graxos .....	50
2.4.1 Extração dos lipídios totais.....	50
2.4.2 Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos .....	51
2.4.3 Análise Cromatográfica de ésteres de ácidos graxos.....	51
2.4.4 Identificação e análise quantitativa dos ésteres metílicos de ácidos graxos.....	51
2.5 Análises Estatísticas .....	52

3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	52
3.1	Análises físico-químicas do leite de búfala .....	52
3.2	Composição do leite em pó .....	53
3.3	Análise de ácidos graxos .....	55
4.	CONCLUSÃO.....	59
5.	REFERÊNCIAS .....	59
	CAPÍTULO II.....	65
	RESUMO .....	66
	ABSTRACT .....	66
1.	INTRODUÇÃO.....	67
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	68
2.1	Obtenção da matéria prima.....	68
2.2	Otimização.....	69
2.3	Extração .....	69
2.4	Identificação e quantificação .....	69
2.5	Delineamento Experimental .....	70
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	70
4.	CONCLUSÃO.....	75
5.	REFERÊNCIAS .....	75
	CAPÍTULO III .....	77
	RESUMO .....	78
	ABSTRACT .....	78
1.	INTRODUÇÃO.....	79
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	80
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	83
3.1	Identificação dos compostos.....	83
3.2	Validação .....	84
3.2.1	Seletividade .....	84
3.2.2	Linearidade e Faixa de aplicação.....	86
3.2.3	Repetitividade e Precisão intermediária .....	89
3.2.4	Limite de Detecção e Quantificação.....	90
3.2.5	Ensaio de Recuperação .....	91
3.3	Quantificação do colesterol e óxidos de colesterol no leite em pó de búfala.....	92
4.	CONCLUSÃO.....	93
5.	REFERÊNCIAS .....	93
	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	96

## RESUMO

ALVES, M.F. **Efeito do tempo de armazenamento sobre a fração lipídica do leite em pó de búfala obtido por spray dryer.** Itapetinga-BA: UESB, 2016. 96p. (Dissertação - Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).\*

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito do tempo de armazenamento sobre a composição físico-química, o perfil de ácidos graxos, colesterol e seus óxidos (25-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol) em leite em pó de búfala. O leite em pó de búfala foi obtido por secagem atomizada, em mini spray dryer com temperatura do ar de entrada de 140°C e de saída de 80°C, bico injetor de 1,0 mm de espessura com vazão de ar no bico de 40 L/min, vazão do ar de secagem 3 m<sup>3</sup>/min e vazão da bomba peristáltica de 1,07 L/h. Após obtenção do produto, as amostras foram embaladas a vácuo e avaliadas nos tempos: 0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias de armazenamento para a composição físico-química (umidade, gordura, proteínas, cinzas, densidade, acidez, índice de solubilidade e partículas queimadas), análise do perfil de ácidos graxos (AG) e nos tempos 0, 21, 42, 63 e 84 dias para o conteúdo total de colesterol e seus óxidos. Foi realizada a otimização da metodologia para extração do colesterol e dos óxidos de colesterol, por meio de planejamento fatorial fracionado de ordem 2<sup>5-1</sup>, para análise por CLAE e foi feita a validação do método. Os dados obtidos foram interpretados por meio de Análise de Variância e Regressão, ao nível de 5% de significância. Dentre os parâmetros físico-químicos avaliados, o tempo influenciou apenas na absorção de umidade, pois este apresentou um aumento significativo durante o armazenamento. A otimização da metodologia foi alcançada e o método foi validado, podendo então ser detectado, identificado e quantificado o colesterol e os óxidos de colesterol na amostra. O tempo de estocagem não interferiu no perfil de ácidos graxos do leite em pó de búfala. Maiores concentrações de ácidos graxos saturados foram encontradas no leite. A razão n6/n3 e a quantidade de ácidos graxos insaturados apresentaram resultados aceitáveis. Dessa forma, a produção do leite em pó de búfala torna-se viável, pois o mesmo apresentou boas características de qualidade.

**Palavras-chave:** atomização, bubalinos, caracterização, validação.

---

\*Orientador: Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, DSc., UESB e Co-orientadora: Sibelli Passini Barbosa Ferrão, DSc., UESB.

## ABSTRACT

ALVES, M.F. **Storage time effect on the lipid fraction of milk buffalo milk powder obtained by spray drying.** Itapetinga-BA: UESB, 2015. 96p. (Dissertation - Master in Engineering and Food Science).\*

The objective of this study was to evaluate the effect of storage time on the physical and chemical composition, fatty acid profile, cholesterol and their oxides (25-hydroxycholesterol and 7-cetocolesterol) in buffalo milk powder. The buffalo milk powder was obtained by spray drying, mini-spray dryer with inlet air temperature of 140°C and 80°C output nozzle of 1.0 mm in thickness with a flow of air in the nozzle 40 L / min , drying air flow rate 3 m<sup>3</sup> / min and flow rate of the peristaltic pump of 1.07 L / hr. After obtaining the product, the samples were vacuum packed and evaluated at times: 0, 30, 60, 90, 120 and 150 days of storage for the physico-chemical composition (moisture, fat, protein, ash, density, acidity index solubility and burnt particles), profile analysis of fatty acids (FA) and at 0, 21, 42, 63 and 84 days for the total content of cholesterol and their oxides. Optimization methodology for the extraction of cholesterol and cholesterol oxides was conducted by means of fractional factorial design order of 2<sup>5-1</sup> for analysis by HPLC and was taken to validate the method. The data were interpreted by variance and regression analysis, the 5% level of significance. Among the physicochemical parameters evaluated, only time influenced the moisture absorption, as it showed a significant increase during storage. The optimization methodology has been achieved and the method has been validated and can then be detected, identified and quantified cholesterol and cholesterol oxides in the sample. The storage time did not affect the profile of fatty acids in milk buffalo milk powder. Higher concentrations of saturated fatty acids found in milk. The reason n6/n3 and the amount of unsaturated fatty acids showed acceptable results. Thus, the production of milk in buffalo milk powder becomes feasible, because it had good quality features.

**Keywords:** atomization, buffaloes, description, validation.

---

\*Advisor: Sérgio Augusto de Albuquerque Fernandes, DSc., UESB and Co-advisor: Sibelli Passini Barbosa Ferrão, DSc., UESB.

## 1. INTRODUÇÃO

A bubalinocultura tem se destacado em todo o mundo, em função de seu papel na produção de proteína de origem animal, especialmente a produção de leite, com destaque para a Índia e Paquistão. No Brasil, o grande interesse pela bubalinocultura leiteira verificado nos últimos anos tem determinado a maior produção e consequente utilização do leite desta espécie na produção de derivados. Além disso, os bubalinos são extremamente rústicos e apresentam alta capacidade de adaptação, podendo sobreviver em diversos ambientes, com grandes variações de clima, relevo e vegetação, tornando esta atividade cada vez mais viável economicamente.

O grande problema dessa espécie é a questão da sazonalidade, que prejudica a distribuição da oferta do leite de búfala à indústria, pois no período de entressafra há queda aproximada de 60% na produção e na oferta do leite. O mercado brasileiro tem demanda dos produtos derivados do leite de búfala constante durante o ano, o que faz com que na época de maior produção o leite seja vendido por um preço inferior, impedindo o crescimento produtivo nas propriedades rurais.

Uma alternativa para dar maior rentabilidade ao leite é a transformação do produto na forma de pó por meio da sua secagem. Entre os métodos, a secagem por atomização (spray dryer) é o mais utilizado, por gerar produto de boa qualidade com gasto de energia relativamente baixo quando comparado com outros métodos de secagem. Para o leite de búfala, essa tecnologia é particularmente promissora por ser uma possível alternativa de contornar o problema da oscilação da produção e da oferta do leite em período de baixa produção, assegurando dessa forma o atendimento ao mercado consumidor durante todo o ano como também a sua expansão às regiões mais afastadas do centro produtor.

O prazo de validade do leite em pó pode ultrapassar 12 meses, com isso é importante avaliar as mudanças físico-químicas, as alterações na concentração dos ácidos graxos, no colesterol e na formação de óxidos de colesterol durante o seu armazenamento.

O conhecimento do perfil de ácidos graxos da gordura do leite e seus derivados são importantes, devido à sua possível influência sobre a saúde humana, pois alguns ácidos graxos saturados (AGS) estão associados ao risco de desenvolverem a aterosclerose.

O colesterol é um composto lipídico muito susceptível à oxidação, sendo o processo oxidativo influenciado por diversos fatores. Esses processos ocorrem principalmente durante o processamento de alimentos, dando origem aos produtos conhecidos como óxidos de colesterol (OsC). Estes óxidos apresentam características citotóxicas, aterogênicas,

cancerígenas e mutagênicas. O armazenamento ao longo prazo e o processamento térmico favorece a formação dos óxidos de colesterol.

Na identificação e quantificação do colesterol e seus óxidos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a técnica mais empregada, principalmente por utilizar pequenas temperaturas durante a análise, evitando assim a oxidação do colesterol. Para garantir que a metodologia analítica gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a matriz em estudo, é necessária que ela seja validada. A validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer.

Devido à necessidade de estudos que aprofundem conhecimentos de como a produção e o período de estocagem do leite em pó de búfala podem influenciar nas suas características, objetivou-se obter leite em pó de búfala e avaliar a influência do período de armazenamento sobre a composição físico-química, o conteúdo total de colesterol e dos óxidos de colesterol (25-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol) e o perfil de ácidos graxos do produto obtido.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Rebanho bubalino**

Os búfalos domésticos pertencem à família *Bovidae*, a subfamília *Bovinae* (mesma classificação dos bovinos) e à espécie *Bubalus bubalis*, que apresentam duas variedades a *Bubalus bubalis* var. *bubalis* e a *Bubalus bubalis* var. *kerebau*. Os búfalos são encontrados em todos os continentes, contudo, o continente asiático, em especial a Índia, é considerada o local de origem da espécie (BORGHESE & MAZZI, 2005).

A introdução do rebanho bubalino no Brasil ocorreu, oficialmente, em 1895 na Ilha de Marajó, no Estado do Pará, onde os primeiros animais foram introduzidos, entre eles, os da raça Carabao, seguida dos búfalos de origem Italiana, e a partir desse cruzamento surgiram os búfalos pretos de Marajó, raça semelhante ao búfalo mediterrâneo italiano (ZAVA, 1984).

O rebanho bubalino mundial está estimado em aproximadamente 200 milhões de cabeças, o que reflete o crescente interesse mundial nesta espécie (FAO, 2013). O Brasil possui maior rebanho bubalino na América do Sul, com aproximadamente 1,78 milhões de cabeças, concentrado majoritariamente na região Norte, destacando-se os Estados do Pará (38%), Amapá (18,4%) e Maranhão (6,5%) (GUTIERREZ et al., 2005; IBGE, 2010).

Cerca de 90 milhões de toneladas de leite de búfala foram produzidos em 2009, o que representa 13% da produção mundial de leite, com taxa de crescimento anual de aproximadamente 3,1% em comparação ao crescimento de 1,3% do aumento da produção anual de leite de vaca (IDF, 2010).

Apesar de ser uma espécie que contribui com a produção mundial de leite de forma expressiva, a estacionalidade reprodutiva (concentração dos partos em determinada época do ano) é um fator que interfere negativamente na produção, oferta e comercialização dos seus produtos lácteos, resultando em perdas econômicas para o setor (CAMPANILE et al., 2007; CARVALHO, BERNARDES & BARUSELLI, 2011). A resolução desse problema tem sido buscada com o uso de técnicas de desestacionalização reprodutiva, assim como técnicas de processamento do leite fluido, como congelamento de coalhada ou até mesmo a sua produção em pó.

### **2.2 Principais constituintes do leite de búfala**

O leite de búfala é um dos leites mais ricos do ponto de vista de composição. Particularmente a gordura constitui a principal fração do leite de búfala, sendo responsável pelo seu alto valor energético e nutritivo. Apresenta também, características muito

particulares que contribuem para sua fácil identificação físico-química e organoléptica. Quando comparado ao leite de vaca, apresenta sabor mais adocicado, maior porcentagem de componentes como gordura, proteína, lactose, sólidos totais, cálcio e fósforo. Possui menos água e é muito mais branco devido à ausência quase total do  $\beta$ -caroteno (pró-vitamina A) em sua gordura (JUNIOR et al., 2009).

Alguns fatores influenciam diretamente na composição química do leite de búfala, tais como raça, estágio de lactação, idade, manejo, sanidade, condições climáticas, alimentação e período do ano (MACEDO et al., 2001; AMARAL et al., 2005; EL-SALAM & EL-SHIBINY, 2011). Apresentando assim, composição variada a depender dos fatores.

Os teores médios dos componentes do leite de búfala encontrados na literatura variam de acordo com diferentes autores (Tabela 1). Em bubalinos, o teor de gordura no leite varia 4,26% a 8,3%, este teor mais elevado é uma característica particular da espécie, independente das condições experimentais (CAMPANILE et al., 2007; CALDEIRA et al., 2010; RANGEL et al., 2011; PIGNATA et al., 2014). Nutricionalmente, a gordura apresenta níveis apreciáveis de ácidos graxos essenciais ao organismo (FIGUEIREDO, JUNIOR & TORO, 2010).

**Tabela 1.** Composição química do leite de búfala por diferentes autores.

Fonte	Parâmetros (%)				
	Gordura	Proteína	Lactose	EST	Cinzas
Verruma & Salgado (1994)	8,20	4,50	-	17,0	0,70
Amaral et al. (2004)	6,83	4,19	-	17,19	-
Campanile et al. (2007)	8,30	4,70	4,90	18,50	-
Caldeira et al. (2010)	5,50	3,90	5,20	15,70	-
Pignata et al. (2014)	4,26	3,05	4,27	12,47	-
Rangel et al. (2011)	7,26	4,51	-	17,15	-

Os ácidos graxos presentes na gordura do leite de búfala em maior concentração, quando comparados com o leite bovino, são os ácidos cáprico, mirístico, palmítico, esteárico, palmitoléico e linoleico e em menor concentração os ácidos graxos butírico e oleico. Outra característica peculiar do leite bubalino é seu baixo teor de colesterol (PIGNATA et al., 2014).

O teor de proteína do leite bubalino varia de 3,05 a 4,70%. As proteínas do leite de búfala são constituídas de 77 a 79% de caseínas e de 21 a 23% de proteínas do soro, com as

frações  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\kappa$  correspondendo a 4%, 6,3%, 35% e 4% do total dos diferentes tipos de caseínas, respectivamente (EL-SALAM & EL-SHIBINY, 2011).

No leite bubalino, o teor de lactose varia entre 4,27% e 5,20%, sendo o constituinte que menos varia no leite, devido à sua osmolalidade (SUTTON, 1989).

Como resultado desta composição, o percentual de extrato seco total (EST) ou sólidos totais, que é composto por todos os componentes do leite com exceção da água (TONHATI, MENDONZA-SANCHEZ & SENO, 2005), para o leite de búfala varia entre 12,47 e 18,50%. Esse valor mais elevado de sólidos totais é um grande diferencial para indústria de processamento de leite, pois um aumento de 0,5% nos sólidos corresponde a um acréscimo de 11% no rendimento do leite em pó (CFIS, 2005).

Em comparação com outras espécies, o leite de búfala apresenta valores elevados de macro constituintes. Apresenta densidade entre 1,025 g/L e 1,047 g/L; pH entre 6,41 e 6,47; acidez entre 0,14 e 0,20 gramas de ácido láctico por 100 mL de leite (alta acidez justificada pelo elevado teor de proteínas, em especial a caseína); índice crioscópico entre -0,531 e -0,548°H; minerais entre 0,79 e 0,83%, sendo que, desse total, até 25% é de cálcio (EL-SALAM & EL-SHIBINY, 2011).

## **2.3 Processo de secagem**

### **2.3.1 Secagem em spray dryer**

O processo de secagem está entre as tecnologias mais importantes para a conservação do leite, com a finalidade de obter um produto estável, de baixa umidade, com mínimas alterações sensoriais e as propriedades funcionais apropriadas para o uso o qual vai ser destinado, prolongando dessa forma sua vida útil (MEDEIROS, MEDEIROS & PASSOS, 2009).

Existem diversas técnicas de desidratação para a conservação de alimentos, entre elas se destacam a secagem por atomização, rolo ou tambor de secagem e liofilização. A escolha da técnica é ditada pela natureza do produto que será secado, pelo formato que se deseja dar ao produto, pelas condições de operação e por fatores econômicos (JINAPONG, SUPHANTHARIKA & JAMNONG, 2008; SCHIEBER; ESQUIVEL & JIMÉNEZ, 2012).

A secagem por atomização (spray dryer) é a que apresenta maior destaque na produção do leite em pó, devido à redução de custos, tempo de secagem curto, secagem eficaz e alta taxa de remoção de umidade (TAMIME, 2009). Consiste basicamente de três etapas

fundamentais. Na primeira etapa o fluido é disperso como gotículas, o que aumenta sua área superficial. Na segunda etapa, ocorre contato destas com uma corrente de ar aquecido, havendo transferência de calor. Na terceira etapa acontece a evaporação do solvente e a formação da partícula sólida (OLIVEIRA & PETROVICK, 2009).

Essas fases do processo de atomização interferem nas características do pó final. Dessa forma, a maneira de atomizar e as propriedades do líquido atomizado influenciam no tamanho da partícula sólida, densidade, aparência e umidade. Já o contato líquido, ar quente e a evaporação influenciam na densidade do pó, aparência, umidade, retenção de aroma e sabor (AMIOT, 1991). A secagem por spray dryer diminui o risco de degradação química/biológica e reduz os custos de transporte e armazenamento (GHARSALLAOUI et al., 2007).

### **2.3.2 Leite em pó**

A industrialização do leite bubalino no Brasil é uma realidade, pois, além do queijo Muçarela, diversos laticínios têm elaborado vários derivados a partir deste leite (GUERRA, NEVES & PENA, 2005).

Entre as diversas tecnologias para o seu aproveitamento, tem-se a secagem do leite para obtenção do produto em pó. Neste tipo de processo o leite pode ser conservado por um período de tempo muito maior, com custos reduzidos de embalagem, armazenamento e transporte, podendo ser uma saída para a baixa disponibilidade de leite fluido de búfala em determinadas épocas do ano (PRADO, PARADA & SOCCOL, 2008; KITAMURA et al., 2009).

O leite em pó é definido como o produto obtido por desidratação do leite de vaca integral, desnatado ou parcialmente desnatado e apto para a alimentação humana, mediante processos tecnologicamente adequados (BRASIL, 1997). No Brasil, a legislação define apenas o produto derivado do leite de vaca, mas leites de outras espécies também podem ser produzidos em escala comercial.

O leite em pó é classificado como: i) leite integral, contendo no mínimo 26% de gordura e menos que 4% de umidade em sua composição; ii) leite desnatado, contendo um máximo de 1,5% de gorduras e menos que 5% de umidade, e iii) leite parcialmente desnatado, com porcentagem de matéria gorda variando entre 1,5-25,9% e umidade inferior a 4%. O produto que apresentar o mínimo de 12% e o máximo de 14,0% de matéria gorda poderá, opcionalmente, ser denominado como "leite em pó semidesnatado" (BRASIL, 1997).

O leite in natura é composto majoritariamente por água, aproximadamente 87,5%. A transformação do leite fluido em leite em pó envolve operações unitárias, evaporação e

secagem por pulverização (atomização, nebulização), restando o extrato seco do leite e uma pequena quantidade de água (cerca de 2,5% a 4,0%) (MEDEIROS et al., 2014).

Em geral, o leite em pó tem grande atuação dentro da categoria de alimentos, sendo comumente usado em produtos de panificação e confeitaria, chocolate, queijo, sorvete, iogurte, entre outros. As propriedades funcionais do leite em pó podem influenciar de maneira decisiva em como o produto deve ser produzido, como deve ser distribuído, quanto tempo deve ser armazenado, como também qual deve ser o apelo nutricional para o consumidor (OLDFIELD & SINGH, 2005; SHARMA, JANA & CHAVAN, 2012).

### **2.3.3 Composição do leite em pó**

As características do leite em pó podem variar de acordo com a sua composição e pelo tratamento em que o leite é submetido durante as etapas de concentração e secagem. Por isso é necessário avaliar os parâmetros de qualidade para o leite em pó, pois ajudará a definir o produto, os critérios do processo de produção e os fenômenos que influenciam no seu comportamento. Para o leite de vaca, por exemplo (Tabela 2), observam-se alguns parâmetros que são estudados para avaliar a qualidade do leite em pó de vaca.

O entendimento dessas propriedades ajuda a definir o produto, os parâmetros de produção e os fenômenos que influenciam no seu comportamento (VISSOTTO et al., 2006).

Muitos fatores podem ocasionar alterações nas propriedades físicas e químicas do leite em pó integral, reduzindo sua vida útil e seu valor comercial, destacando-se a umidade, acidez, teor de gordura, proteína, índice de solubilidade e partículas queimadas. Entre estes, o que mais se destaca é a umidade, que quando elevada pode resultar na aglomeração do produto e na oxidação lipídica, afetando a qualidade do produto final (NADAL et al., 2007).

Na literatura há poucos estudos sobre a composição do leite em pó de búfala. Alguns desses trabalhos, foi realizado por Hammes et al. (2015) que encontraram resultados para a composição do leite em pó de búfala parcialmente desnatado de 4,34% de gordura, 46,6% proteína, 7,84% de cinzas e 41,22% de lactose. Outro estudo avaliando as características físico-químicas do leite bubalino em pó integral apresentou os seguintes resultados: 3,4% de umidade, 23,2% de proteínas, 46,1% de gordura e 4,2% de cinzas (GUERRA, NEVES & PENA, 2005).

**Tabela 2.** Parâmetros do leite em pó integral, parcialmente desnatado e desnatado de vaca.

Parâmetros	Integral	Parcialmente Desnatado	Desnatado	Métodos de análise
Matéria Gorda (%m/m)	Maior ou igual a 26,0	1,5 a 25,9	Menor que 1,5	FIL 9C:1987
Umidade (%m/m)	Máx. 3,5	Máx. 4,0	Máx. 4,0	FIL 26:1982
Acidez titulável (mL NaOH 0,1 N/10g sólidos não gordurosos)	Máx. 18,0	Máx. 18,0	Máx. 18,0	FIL 86: 1981
Índice de Solubilidade (ml)	Máx. 1,0	Máx. 1,0	Máx. 1,0	FIL 129A:1988
Partículas Queimadas (máx.)	Disco B	Disco B	Disco B	ADMI 916

Fonte: (BRASIL, 1997).

É importante conhecer a acidez total do produto, por ser indicativa da presença de microrganismos na matéria-prima do leite em pó, podendo causar alteração no sabor do leite em pó. A gordura além de servir como fonte de energia é meio de veiculação das vitaminas lipossolúveis (vitaminas A, D, E e K), e a determinação de seu teor serve também para caracterizar o leite em: integral, parcialmente desnatado ou desnatado (INMETRO, 1998).

Para manter as características sensoriais aceitáveis é estabelecido o prazo de validade do leite em pó, que geralmente é de 6 meses a temperatura ambiente, mas que pode ultrapassar os 12 meses se embalado de forma apropriada, com atmosfera modificada e injeção de gases inertes (PERIN et al., 2012).

### 2.3.4 Efeito do tempo de armazenamento sobre o leite em pó

A principal razão para a produção de leite em pó é prolongar o seu período de vida de prateleira e para facilitar o armazenamento e manuseio. Quando armazenado em condições adequadas, o leite em pó integral tem prazo de validade de 12 meses e o leite em pó desnatado superior a 24 meses. O período de vida útil de leite em pó é geralmente estabelecido para justificar segurança microbiológica e para manter as características organolépticas aceitáveis

(cor e sabor). Embora o leite em pó seja microbiologicamente estável e aceitável, muitas alterações físico-químicas, tais como a cristalização da lactose, a aglomeração de partículas, oxidação de gordura, reações enzimáticas e de Maillard, podem ocorrer durante o armazenamento, e estas modificarem as propriedades físicas e funcionais (fluidez, propriedades de reconstituição, emulsionantes e propriedades de formação de espuma) dos pós (THOMAS et al., 2004).

A extensão dessas alterações é fortemente dependente das condições de armazenagem (temperatura, umidade relativa e do tempo) e, por isso, a compreensão das alterações físico-químicas que ocorrem nas condições de armazenamento é muito útil para prever o comportamento do pó na sua utilização final (KIM, CHEN & PEARCE, 2009).

Se durante o tempo de estocagem do leite em pó ocorrer uma alta absorção de umidade, este poderá provocar a cristalização da lactose, pois no leite em pó recém-fabricado, a lactose está no estado metaestável (como o vidro), mas durante o armazenamento ela é transformada em cristais estáveis. Dessa forma, a atividade de água é aumentada e então inicia-se reações químicas que podem deteriorar o alimento (RIBEIRO & ELISENA, 2007). Nesta mesma situação pode ocorrer a migração da gordura do interior da partícula para superfície do pó, tornando-o mais susceptível a oxidação lipídica. Com essa migração, o leite torna-se mais hidrofóbico, afetando os parâmetros de solubilidade, molhabilidade e escoamento do leite em pó (KIM, CHEN & PEARCE, 2009).

O armazenamento com exposição ao oxigênio ou à luz pode causar alteração na concentração de ácidos graxos e a formação dos óxidos de colesterol, como o 7-Cetocolesterol (7-ceto) e o 25-hidroxicolesterol (25-OH) (GUARDIOLA et al., 1996; MAZALLI & BRAGGAGNOLO, 2007).

O processo de desidratação e/ou armazenagem influenciam o teor de óxido de colesterol em amostras de leite em pó. Angulo et al. (1997) comprovaram a ocorrência dessa oxidação pela relação direta com condições de armazenagem estudadas - de até 12 meses, na ausência de luz, sob nitrogênio ou ar atmosférico, a 32°C ou 55°C - em leite desnatado em pó e em leite integral em pó de vaca, estudo no qual o 7-ceto foi o óxido de maior formação entre os analisados.

O prazo de validade comercial do leite em pó é bastante longo, com isso, o colesterol torna-se susceptível a oxidação durante o tempo de armazenagem. A sua utilização como ingrediente em formulações alimentares que posteriormente serão submetidos ao processo de aquecimento, também preocupa pela oxidação adicional do colesterol (TENUTA-FILHO et al., 2003).

Com isso, é necessário definir o prazo de vida de prateleira dos produtos em pó, em especial o leite pó, pois fatores como: exposição ao oxigênio, variáveis de processamento do pó, a umidade do produto, a exposição à luz e a temperatura de estocagem podem influenciar a vida útil e a sua aceitação sensorial (LLOYD, HESS & DRAKE, 2009).

## **2.4 Ácidos graxos presentes no leite de búfala**

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com longas cadeias laterais de hidrocarbonetos. Ocorrem, em geral, esterificados como componentes de vários lipídeos (VOET, VOET & PRATT, 2002). O número de saturações, o tamanho de sua cadeia carbônica e sua isomeria (cis ou trans) são critérios utilizados na classificação dos ácidos graxos (BYERS & SCHELLING, 1993).

A identificação dos ácidos graxos presentes no leite é essencial. De acordo com Fernandes (2004) o leite é composto principalmente por ácidos graxos saturados e insaturados (Tabela 3).

De forma geral, os principais ácidos graxos presentes no leite de búfala são: os ácidos graxos saturados palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0); os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) representam aproximadamente 36% da gordura do leite de búfala, predominando o oleico (C18:1 cis 9) e palmitoléico (C16:1 cis 9). Por sua vez, os poliinsaturados (AGPI) que se destacam são: ácido linoleico conjugado (CLA), em especial o ácido C18:2 cis9 trans 11 (ácido rumênico) e o ácido linolênico (C18:3,  $\omega$ -3) (MELÍCIO et al., 2005; FERNANDES et al., 2005; CALDEIRA et al., 2010; PIGNATA et al., 2014).

Há uma crescente preocupação por parte dos consumidores, com o conteúdo de gordura e colesterol dos produtos de origem animal (HARRIS, CROSS & POND, 1993). Têm-se buscado diminuir a concentração de ácidos graxos saturados nesses produtos, em especial os comprovadamente relacionados com problemas de saúde, que possuem maior efeito hipercolesterolêmico ou aterogênico, como o ácido láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0), assim como, a manutenção ou elevação dos ácidos AGPI.

Embora a gordura do leite de búfala seja rica em ácidos graxos saturados, outros componentes do leite são considerados como benéficos para a saúde humana. Os ácidos graxos poli-insaturados, o ômega-3 e ômega-6, são essenciais ao homem. A família ômega 3 (PUFA  $\omega$ -3) compreende o ácido graxo essencial alfa-linolênico (C18:3,  $\omega$ -3) e o ômega-6 compreende o ácido graxo essencial linoléico, que pode originar o ácido araquidônico (LIRA et al., 2004).

**Tabela 3.** Principais ácidos graxos do leite de búfala.

<b>Nome comum</b>	<b>Nome Sistemático</b>	<b>Símbolo</b>
<b>Ácido Graxos Saturados</b>		
Butírico	Tetranóico	C4:0
Capróico	Hexanóico	C6:0
Caprílico	Octanóico	C8:0
Cáprico	Decanóico	C10:0
Láurico	Dodecanóico	C12:0
Mirístico	Tetradecanóico	C14:0
Palmítico	Hexadecanóico	C16:0
Esteárico	Octadecanóico	C18:0
Araquídico	Ecosanóico	C20:0
Beênico	Docosanóico	C22:0
Lignocérico	Tetradocosanóico	C24:0
<b>Ácidos Graxos Insaturados</b>		
Palmitoléico	9-hexadecenóico	C16:1
Oléico	9-octadecenóico	C18:1
Linoléico	9,12-octadecadienóico	C18:2
$\alpha$ -linolênico	9,12,15-octadecatrienóico	C18:3
$\gamma$ -linolênico	6,9,12-octadecatrienóico	C18:3
Araquidônico	5,8,11,14-eicosatetraenóico	C20:4

Fonte: Adaptado de Fernandes (2004).

O ácido linolênico (C18:3,  $\omega$ -3) e ácido linoleico conjugado (CLA) especialmente ácido rumênico (C18: 2,  $\omega$ -6, cis-9, trans-11), têm mostrado efeitos positivos para a saúde em modelos animais, tais como prevenção de tumores de glândulas mamárias e pele (ZOTOS & BAMPIDIS, 2014). E para saúde humana, apresenta efeitos fisiológicos benéficos frente a algumas doenças como o câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, composição corporal e sistema imune (CARVALHO, MELO & MANCINI-FILHO, 2010).

A composição em ácidos graxos dos alimentos é de grande importância, principalmente os insaturados, aos quais são atribuídos inúmeros benefícios ao organismo humano. A ingestão desses ácidos promove à redução do colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade, sem reduzir as lipoproteínas de alta de densidade (HDL) (MIHAYLOVA & PEEVA, 2007).

## **2.5 Ácido Linoleico Conjugado (CLA)**

O ácido linoleico conjugado - CLA é um componente característico da gordura presente no tecido adiposo de ruminantes, o qual é formado no rúmen como intermediário da biohidrogenação do ácido linoléico isomerase (ELIAS et al., 2004). Apresenta um ou mais isômeros posicional e geométrico do ácido linoléico (cis-9, cis-12, ácido octadecadienóico), contendo duplas ligações conjugadas. Tais ligações encontram-se nas posições 9 e 11 ou 10 e 12, podendo ser de configuração cis ou trans. O ácido linoléico conjugado possui estrutura diferenciada, sendo apontado como possível substância anticancerígena, anti-aterosclerose, anti-obesidade e como modulador da imunidade (SANHUEZA, NIETO & VALENZUELA, 2002).

Em produtos lácteos, a composição do ácido Linoleico Conjugado (CLA) varia de 2 a 37 mg/g de lipídeos. Essa variação pode estar relacionada a diversos fatores, dentre eles, fatores ambientais, como a origem geográfica e fatores genéticos e fisiológicos relacionados aos animais, e à dieta das vacas. O processamento do leite também pode afetar, em situações nas quais são utilizadas diferentes culturas lácteas no caso da fermentação, tratamento térmico e o período de maturação (NUNES & TORRES, 2010).

Estudos sobre as quantidades diárias de CLA na dieta de homens e mulheres em vários países já foram realizados, com isso, foi observado que as estimativas de ingestão de CLA variam de 0,3 a 1,5g/pessoa por dia e parecem depender do sexo e da quantidade de alimentos de origem animal ou vegetal na dieta (JIANG, WOLK & VESSBY, 1999).

Por apresentar vários efeitos benéficos à saúde humana (SANHUEZA, NIETO & VALENZUELA, 2002), o CLA tem sido fonte de várias pesquisas que propõem aumentar o seu teor na dieta humana a partir do aumento do teor de CLA nos produtos de origem animal (BAUMAN et al., 1999; PARIZA, PARK & COOK, 2001).

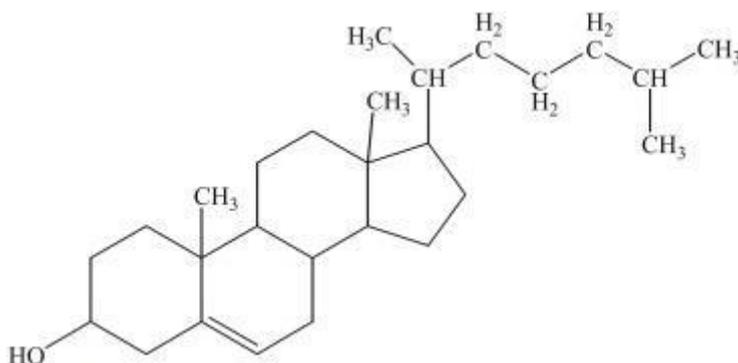
## **2.6 Colesterol**

O colesterol é álcool policíclico de cadeia longa, cuja estrutura química contém múltiplos anéis de hidrocarbonetos (Figura 1). Desempenha papel essencial na estrutura de muitas membranas, é precursor metabólico das várias formas da vitamina D e dos hormônios esteroidais. Ainda participa da síntese dos ácidos biliares, na digestão e absorção dos lipídios e vitaminas lipossolúveis (CONNOR & CONNOR, 2002).

Segundo Souza & Visentainer (2011), a maior parte do colesterol do organismo, aproximadamente 70%, origina-se da biossíntese no fígado (colesterol endógeno), enquanto

apenas 30% é fornecido pela dieta (colesterol exógeno), por meio da ingestão de alimentos de origem animal, como ovos, carnes, leite e derivados.

**Figura 1.** Estrutura química do colesterol.



Fonte: JOHN et al. (2015).

Quando em excesso (hipercolesterolemia), o colesterol pode se depositar nas paredes das artérias determinando aterosclerose (FORNES et al., 2002). Por outro lado, alguns estudos relatam que, por apresentar baixa reatividade o colesterol pode não ser o causador primário da aterosclerose (POLI, BIASI & LEONARDUZZI, 2013). As lesões nas paredes das artérias podem ser causadas pelos produtos de sua oxidação, formados durante o processamento, preparação e armazenamento dos produtos alimentares. Quando essas lesões já estão formadas, o colesterol é depositado nas paredes dos vasos sanguíneos, causando a aterosclerose (BOSINGER, LUF & BRANDL, 1993).

As instituições internacionais de saúde, sugerem que a ingestão máxima de colesterol seja de 300 mg por dia para a população adulta (WHO/FAO, 2003).

O colesterol pode ser determinado por vários métodos de análise, tais como, gravimetria, colorimetria, fluorimetria e cromatografia. A cromatografia gasosa e a líquida são os métodos mais adequados para a determinação de colesterol, devido à sua capacidade para separar e quantificar este composto a partir de outros similares (DANESHFAR, KHEZELI & LOFTI, 2009). A cromatografia gasosa (CG) já foi a técnica analítica mais utilizada para a quantificação do colesterol e outros esteróis. No entanto, colunas de CG são muito eficientes para a separação de colesterol, mas, por vezes, pode ocorrer a sobreposição de colesterol com outros esteróis (FENTON, 1992; DINH et al., 2011). Esta desvantagem pode ser facilmente resolvida utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), especialmente CLAE de fase inversa. Além disso, CLAE tem a principal vantagem de ser

levada a baixa temperatura e assim, evitar a oxidação do colesterol (RAMALHO, CASAL & OLIVEIRA, 2011).

Bauer et al. (2014) encontraram valores de colesterol entre 4,28 a 8,87 mg.100mL<sup>-1</sup> de colesterol no leite bovino cru. Pignata et al. (2014) encontraram 9,30 mg.100ml<sup>-1</sup> e 13,10 mg.100ml<sup>-1</sup> de colesterol em leite de búfala e vaca, respectivamente. Por sua vez, Tenuta-Filho et al. (2003) relatam valores médios de 22,81 mg.100g<sup>-1</sup> de colesterol para o leite em pó integral de vaca. O que confirma que apesar do teor de gordura ser maior no leite de búfala, o mesmo, apresenta baixa concentração de colesterol.

## 2.7 Óxidos de colesterol

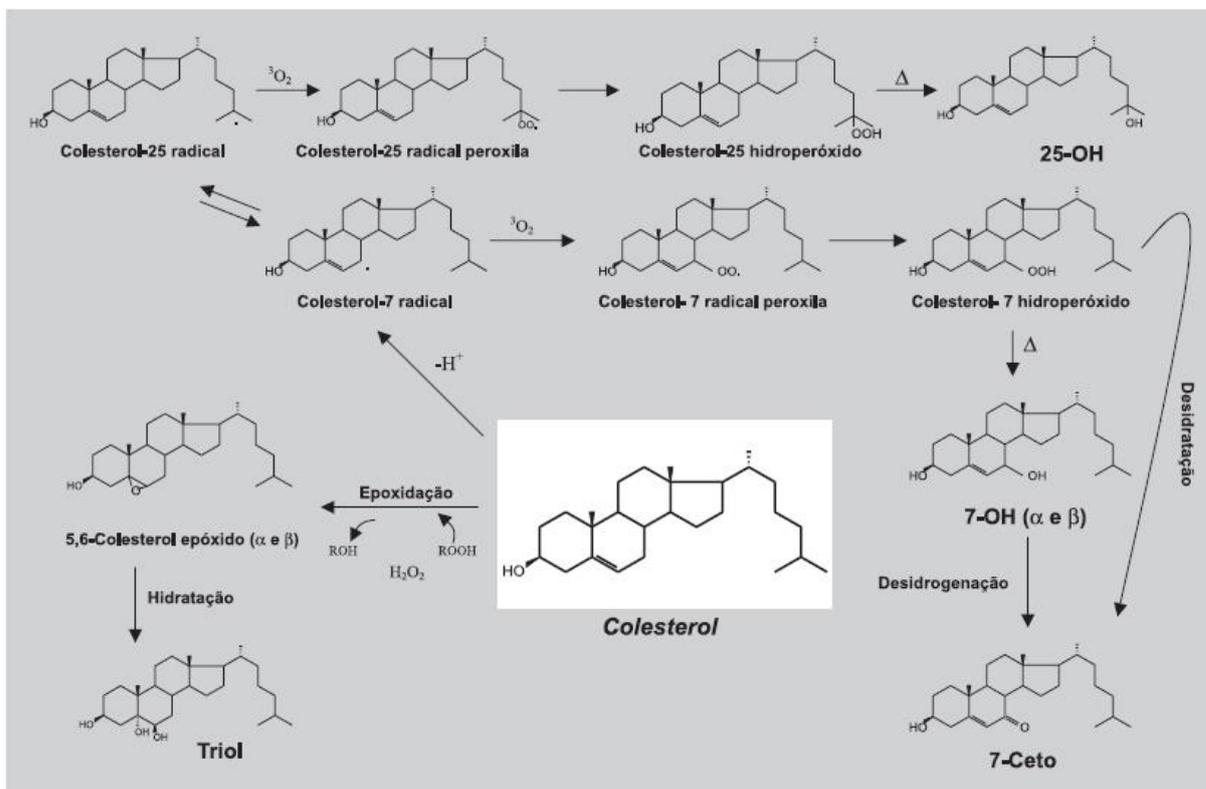
Outro aspecto importante relativo à presença de colesterol em alimentos está no fato comprovado de que o colesterol pode sofrer oxidação, formando óxidos de colesterol (OsC). Estes, podem ser formados tanto de forma endógena, basicamente no fígado e nos tecidos geradores de hormônios esteróides (córtex supra-renal, gônadas), quanto ingeridos na dieta (SALDANHA et al., 2006). As principais fontes de OsC estão presentes em nossa dieta e são encontrados em alimentos processados de origem animal como carnes, ovos, manteiga, leite em pó, queijos (O'BRIEN et al., 2000) e pescado (GUARDIOLA et al., 2002; SALDANHA et al., 2006), assim como em alimentos que em sua fabricação utilizam ingredientes como manteiga, ovos ou leite (ADDIS, GUARDIOLA & CODONY, 1996; GUARDIOLA et al., 2002).

Os óxidos de colesterol são um grupo de esteróis semelhantes ao colesterol, que contém um grupo funcional adicional, tal como, uma hidroxila, cetona ou um grupo epóxido, no núcleo do esterol ou na cadeia lateral da molécula (UBHAYASEKERA, VERLEYEN & DUTTA, 2004). Os óxidos de colesterol surgem após a abstração de um átomo de hidrogênio, seja pela ação de radiação, calor ou radicais livres (Figura 2). Os primeiros radicais livres formados parecem estar localizados nas posições 7 e 25. Os óxidos formados na posição 7, como 7-OH ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e, após desidratação, o 7-cetocolesterol, são os encontrados de forma mais abundante, devido a sua maior estabilidade. Posteriormente, outros óxidos são formados, por meio de mecanismos de reação bimolecular, em que os 5,6-colesterol-epóxidos ( $\alpha$  e  $\beta$ ) são formados pela interação do colesterol e um hidroperóxido, e posterior hidratação para formação de Triol (LERCKER & RODRIGUEZ-ESTRADA, 2000).

Já foram identificados mais de 80 produtos da oxidação do colesterol, sendo o 7-cetocolesterol, 20-hidroxicolesterol, 25-hidroxicolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol, 5,6-colesterol-epóxidos ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e colestanoetriol (Triol), os mais comumente

encontrados nos alimentos, sendo o primeiro destes considerado como possível indicador da oxidação do colesterol (MORALES-AIZPÚRUA & TENUTA-FILHO, 2002; ALINA et al., 2012).

**Figura 2.** Formação dos principais óxidos de colesterol encontrados em leite e produtos lácteos.



Fonte: MORALES-AIZPÚRUA & TENUTA-FILHO, 2002.

A formação do 7-cetocolesterol se dá durante o aquecimento dos isômeros  $\alpha$  e  $\beta$  do 7-hidroperoxicolesterol, bastante encontrado nos alimentos, o que provoca sua desidratação. Em função disso, tem sido proposto usá-lo como indicador da oxidação do colesterol (MORALES-AIZPÚRUA & TENUTA-FILHO, 2005).

O leite em pó integral possui entre 26 e 40% de gordura, tornando-o um produto altamente susceptível à oxidação (LLOYD, HESS & DRAKE, 2009). A importância da oxidação do colesterol em alimentos se dá pelo fato de sua suscetibilidade química e, principalmente, em razão dos óxidos formados apresentarem propriedades biológicas deletérias, com características aterogênicas, citotóxicas, cancerígenas e mutagênicas, entre outras. Por isso, a formação e a ingestão desses compostos precisam ser examinadas.

Na literatura, ainda é muito vago o conhecimento que permita estabelecer limites seguros para a ocorrência desses óxidos em alimentos, o mesmo acontecendo em relação à sua

ingestão. Óxidos de colesterol não ocorrem em alimentos frescos, ou ocorrem em quantidades mínimas, o que significa dizer que o processo oxidativo se dá durante o processamento e/ou armazenamento (TENUTA-FILHO et al., 2003). Entre os alimentos, a gema do ovo em pó contém os mais altos níveis de óxidos de colesterol ( $55-113 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ ), com predominância dos epóxidos (SARANTINOS, O'DEA & SINCLAIR, 1993). O armazenamento da manteiga durante 4 meses acarretou aumento nos níveis dos isoméricos 5,6-colesterol-epóxidos e quando submetida ao aquecimento durante 10 minutos entre 150 e 200°C, aumento gradual em óxidos de colesterol foi observado, com o total de 0-2,5µg/g (NOUROOZ-ZADEH & APPELQVIST, 1998).

O leite e os produtos lácteos são submetidos a diferentes operações durante o seu processamento, o que pode incluir tratamentos térmicos moderados ou severos, podendo levar a indesejáveis mudanças nos lipídios ou proteínas. Variações no tratamento térmico podem ocasionar a produção de óxidos de colesterol em produtos lácteos (AL-ROWAILY, 2008). Em estudo realizado por Osada et al. (1993), sobre a estabilidade do colesterol durante o aquecimento, verificaram que temperaturas acima de 120°C o colesterol foi totalmente degradado, tendo assim a formação dos seus óxidos. Além deste fator, o tempo de armazenamento, tempo de aquecimento, entre outros, também estão relacionados com o grau de formação do óxido (OHSHIMA, 2002; HERZALLAH, 2005). Vários estudos já foram realizados sobre a formação dos óxidos de colesterol em produtos derivados do leite, no entanto, não foi encontrada nenhuma referência para o leite em pó de búfala.

## **2.8 Planejamento experimental**

### **2.8.1 Otimização**

Para melhorar o desempenho de determinado sistema, processo, ou produto a fim de se obter o máximo de benefícios, é necessário otimizá-lo (BEZERRA et al., 2008). Neste sentido, otimizar significa encontrar os valores das variáveis que irão fornecer a melhor resposta possível, isto é, encontrar a região ótima na superfície definida pelos fatores. A metodologia de superfície de resposta (MSR) baseia-se na construção de modelos matemáticos empíricos que geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado e, conseqüentemente, dão condições de explorar (modelar e deslocar) o sistema até sua otimização (TEÓFILO & FERREIRA, 2006).

Antes de aplicar a MRS é necessário realizar um planejamento fatorial, pois é indicado quando há necessidade de se definir os fatores mais importantes e estudar os efeitos sobre a

variável resposta escolhida. Na realização de experimentos é comum verificar a necessidade de estudar o efeito de um ou mais fatores de controle ao mesmo tempo (ABRAHAM, CHIPMAN & VIJAYAN, 1999). A aplicação das técnicas de planejamentos de experimentos fatoriais fracionados  $2^{k-p}$ , mostra-se como uma das soluções para esse tipo de problema. Montgomery (1991) ressalta que, com essas técnicas, é possível analisar os efeitos sobre uma resposta de interesse, de k fatores com dois níveis cada um, em  $2^{k-p}$  combinações de testes, realizando-se apenas uma parte (metade do experimento quando p é igual a um, ou um quarto do experimento quando p é igual a dois), do experimento sem comprometer significativamente a precisão das conclusões decorrentes da análise de resultados. Simultaneamente, os custos e o tempo de duração dos ensaios são significativamente reduzidos.

### **2.8.2 Validação de métodos cromatográficos**

Segundo a Agência Nacional de Vigilância (ANVISA), a validação deve assegurar, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, a fim de garantir a confiabilidade dos resultados obtidos (BRASIL, 2003). Existem dois tipos básicos de validação - o primeiro chamado de validação no laboratório, que consiste das etapas de validação dentro de um único laboratório, seja para validar um método novo que tenha sido desenvolvido localmente ou para verificar que um método adotado de outras fontes está bem aplicado. O segundo denominado validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia e a incerteza expandida associada à metodologia como um todo. Só assim a metodologia pode ser aceita como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação (RIBANI et al., 2004).

Há duas agências credenciadoras no Brasil para verificar a competência de laboratórios de ensaios, sendo elas, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). Estes órgãos disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, respectivamente, a Resolução ANVISA RE número 899, de 29/05/2003, com poder de lei, e o documento INMETRO DOQ-CGCRE-008, de março/2003 (LANÇAS, 2009).

Os parâmetros analíticos normalmente encontrados para validação de métodos de separação são: seletividade; linearidade e faixa de aplicação; precisão; exatidão; limite de detecção; limite de quantificação e robustez (RIBANI et al., 2004).

A seletividade de um método é a capacidade de avaliar as substâncias em exame na presença de componentes, tais como, impurezas, produtos de degradação e outros componentes da matriz que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa (VESSMAN et al., 2001).

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004).

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (ICH, 1995; INMETRO, 2003).

A exatidão consiste em representar o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: materiais de referência; comparação de métodos; ensaios de recuperação; adição padrão (RIBANI et al., 2004). O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois reflete a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise geralmente estão entre 70 e 120%, com precisão de até  $\pm 20\%$ . Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com precisão de até  $\pm 15\%$  (LANÇAS, 2004).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) são respectivamente, a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, e a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada com precisão garantida sob as condições experimentais estabelecidas (ICH, 1995; INMETRO, 2003).

Por fim, a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Diz-se que um método é robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros, como por exemplos pequenas variações de fluxo de solventes, temperatura de análise ou troca de analista (INMETRO, 2003).

O desconhecimento sobre as concentrações de colesterol e seus compostos presentes nos alimentos tem ocasionado redução no consumo de produtos de origem animal, com consequentes desvantagens nutricionais. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento

e a divulgação de metodologias para determinação destes compostos em matrizes alimentícias, que apresentem simultaneamente exatidão, precisão, sensibilidade, especificidade, além de rapidez e baixos custos operacionais (SALDANHA, MAZALLI & BRAGAGNOLO, 2004).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do tempo de armazenamento do leite em pó de búfala sobre a composição físico-química, o perfil de ácidos graxos e o conteúdo de colesterol e os óxidos de colesterol.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- i)** Obtenção do leite em pó de búfala integral por spray dryer;
- ii)** Avaliar o efeito do tempo de armazenamento (0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias) sobre a composição física e química do leite em pó obtido;
- iii)** Avaliar o efeito do tempo de armazenamento (0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias) sobre o perfil de ácidos graxos presentes no leite em pó de búfala;
- iv)** Otimizar a metodologia de extração do colesterol e dos óxidos de colesterol (7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol) em leite em pó de búfala;
- v)** Validar a metodologia para determinação do colesterol e seus óxidos em leite em pó de búfala;
- vi)** Avaliar o efeito do tempo de armazenamento (0, 21, 42, 63 e 84 dias) sobre o conteúdo de colesterol e seus óxidos no produto obtido.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, B.; CHIPMAN, H.; VIJAYAN, K. Some risks in the construction and analysis of supersaturated designs. **Technometrics**, v.41, n.2, p.135-141, May, 1999.

ADDIS, P.B.; GUARDIOLA, F.; CODONY, R. Analysis and health effects of cholesterol oxides. Food Lipids and Health. **New York: Marcel Dekker Inc.**, p.473, 1996.

ALINA, A. R.; SYUHADA, H.S.U.; SYAZAMAWAT, Z.H.; JUHANA, M.J.T.; MASHITOH, A.S.; SAKINAH, A.N.F.; MAWADDAH, A.H.N.; NURULHUDA, M.S. Effect of Different Cooking Methods on Formation of Cholesterol Oxidation Products in Pork and Beef. **World Applied Sciences Journal**. v. 17, p. 17-20, 2012.

AL-ROWAILY, M. A. Effect of Processing Methods on Cholesterol Contents and Cholesterol Oxides Formation in Some Dairy Products. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 15, n. 1, p. 35-45, 2008.

AMARAL, F. R., CARVALHO, L. B., SILVA, N.; BRITO, J. R. F., SOUZA, G. N., Composição e contagem de células somáticas em leite bubalino na região do Alto São Francisco, Minas Gerais, Brasil. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 59, p. 37-41, 2004.

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite de búfalas: composição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 106-110, 2005.

AMIOT, J. **Ciência y tecnología de la leche**. Zaragoza. Editorial Acribia, S.A. p.547, 1991.

ANGULO, A. J.; ROMERA, J. M.; RAMIREZ, M.; GIL, A. Determination of cholesterol oxides in dairy products: effect of storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v.45, p.4318-4323, 1997.

BAUER, L. C.; SANTANA, D. de A.; MACEDO, M.S.; TORRES, A.G.; SOUZA, N.E.; SIMIONATO, J.I. Method Validation for Simultaneous Determination of Cholesterol and Cholesterol Oxides in Milk by RP-HPLC-DAD. **Journal Brazilian Chemical Society**. v. 25, n. 1, p. 161-168, 2014.

BAUMAN, D. E.; BAUMGARD, L. H.; CORL, B. A.; GRIINARI, J. M. Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. **Proceedings of the American Society of Animal Science**, v.48, p.1-15, 1999.

BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S.; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, Volume 76, Issue 5, Pages 965–977, 15 September 2008.

BORGHESE, A.; MAZZI, M. **Buffalo population and strategies in the world**. In: Borghese, A. Buffalo Production and Research. REU Technical Series 67,p.1-40, 2005. Ed. A Borghese. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

BOSINGER, S.; LUF, W.; BRANDL, E. 'Oxysterols': Their Occurrence and Biological Effects. **International Dairy Journal**, 31-33, 1993.

BRASIL. MAPA- Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n.º 369, de 04 de setembro de 1997. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó**. Brasília: 1997.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, 02 de junho de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília: 2003.

BYERS, F. M.; SCHELLING, G. T. Los lípidos en la nutrición de los rumiantes. In: CHURCH, D. C. El rumiante, fisiología digestiva e nutrición. **Zaragoza: Acríbia**, p. 339-356, 1993.

CALDEIRA, L. A., FERRÃO, S. P. B., FERNANDES, S. A. de A., MAGNAVITA, A. P. A., SANTOS, T. D. R., Índices de qualidade nutricional da fração lipídica do leite de búfalas da raça Murrah produzido em diferentes fases de lactação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 69 (4): 545-54, 2010.

CAMPANILE, G.; BERNADES, O.; BASTINETTO, E.; BARUSELLI, P.S.; ZICARELLI, L.; VECCHIO, D. **Manejo de búfalas leiteiras**. Associação Brasileira de Criadores de Búfalas (ABCB). Buffalotec. São Paulo, p.1-92, 2007.

CARVALHO, E. B. T., MELO, I. L. P., MANCINI-FILHO, J. Chemical na physiological aspects of isomers of conjugated fatty acids. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n.2, p. 295-307, abril/junho, 2010.

CARVALHO, N. A. T. de.; BERNARDES, O.; BARUSELLI, P. S. Desestacionalização dos Partos para a Produção de leite de Búfalas a pasto no centro Sul do Brasil. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 8, nº 2, Julho/Dezembro 2011.

CFIS. **Interagency Program – Food Directorate – Health Canada**, 10 ago. 2005. Disponível em: <<http://www.hc-sc.gc.ca/ahc-asc/branch-dirgen/hpfb-dgpsa/fd-da/bfriia-braaii/interagenc-eng.php>>. Acesso em: 25 dezembro 2015.

CONNOR, W.E.; CONNOR, S.L. Dietary cholesterol and coronary heart disease. **Current Atherosclerosis Reports**, 4, p. 425–432, 2002.

DANESHFAR, A.; KHEZELI, T.; LOFTI, H.J. Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. **Journal of Chromatography B**, 877, pp. 456–460, 2009.

DINH, T.T.N.; THOMPSON, L.D.; GALYEAN, M.L.; BROOKS, J.C.; PATTERSON, K.Y.; BOYLAN, M. Cholesterol content and methods for cholesterol determination in meat and poultry Comprehensive Reviews in **Food Science and Food Safety**, 10, p.269–289, 2011.

ELIAS, A.H.N.; SILVA, W.A.; OLIVEIRA, R.L.; VISENTAINER, J.V.; SOUZA, N.E.; MATSUSHITA, M.; MATSUSHITA, M. Ácido linoléico conjugado (CLA) em mussarela de búfalas. In: 19º Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2004, Recife. **Anais...** Recife: SBCTA, v.1. p.1-1.

EL-SALAM, M. A.; EL-SHIBINY, S. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. **Dairy science & technology**, 91 (6), pp.663-699, 2011.

FAO. Food of Agriculture Organization of the United Nations. 2013. **Banco de Dados FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QA/E>>. Acesso em: 20 de junho 2015.

FENTON, M. Chromatographic separation of cholesterol in foods. **Journal of Chromatography**, p.369–388, 624 (1992).

FERNANDES, S. A. de A. **Levantamento exploratório da produção, composição e perfil de ácidos graxos do leite de búfalas em cinco fazendas do Estado de São Paulo**. Tese (Doutorado). Piracicaba – SP, 84p. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2004.

FERNANDES, S. A. A.; MATTOS, W. R.; MATARAZZO, S. V.; ROSETO, C. V.; MACHADO, P. H. Componentes do leite de bubalinos ao longo da lactação no Estado de São Paulo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n.346/347, v.60, p. 71-78, 2005.

FIGUEIREDO, E. L.; JUNIOR, J de B. L.; TORO, M. J. U. Caracterização físico-química e microbiológica do leite de búfala “in natura” produzido no Estado do Pará. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. Ponta Grossa – Paraná, v. 04, nº 01: p. 19-28, 2010.

FORNES, N. S.; MARTINS, I. S.; VELASQUEZ-MELENDZ, G.; LATORRE, M. R. D. O. Escores de consumo alimentar e níveis lipêmicos em população de São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.1, p. 12-18, 2002.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**. November, vol. 40, pp. 1107-1121, 2007.

GUARDIOLA, F.; CODONY, R.; ADDIS, P. B.; REFECAS, M.; BOATELLA, J. Biological effects of oxysterols: Current status. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 34, p. 193-211, 1996.

GUARDIOLA, F.; DUTTA, P.C.; CODONY, R.; SAVAGE, G.P. Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects. **Champaign: AOCS Press.**, p.394, 2002.

GUERRA, R.B.; NEVES, E.C.A.; PENA, R.S. Caracterização e processamento de leite bubalino em pó em secador por nebulização. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 25(3): 443-447, julho-setembro, 2005.

GUTIERREZ, C.V.; SENO, L. O. ; CARVALHO, M. R. B.; DRAKSLER, D.; HOLGADO, A. P. R.; OLIVEIRA, J. A.; TONHATI, H. Métodos para determinação de gordura, proteína e sólidos totais em leite de búfalas. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 60, n.346/347, p.25-30, 2005.

HAMMES, M.V.; ENGLERT, A.H.; NORENA, C.P.Z.; CARDOZO, N.S.M. Study of the influence of soy lecithin addition on the wettability of buffalo milk powder obtained by spray drying. **Powder Technology**, volume 277, June, Pages 237-243, 2015.

HARRIS, K. B., CROSS, H. R., POND, W. G., Effect of dietary fat and cholesterol concentrations of growing pigs selected for high or low serum cholesterol. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 807-810, 1993.

HERZALLAH, S. M. Influence of microwaving and conventional heating of milk on cholesterol contents and cholesterol oxides formation. **Pakistan Journal of Nutrition**. v. 4, n. 2, p. 85-88, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**. Efetivo dos rebanhos de grande porte segundo as grandes regiões e as unidades da federação. Rio de Janeiro, v.38, p.31, 2010.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

IDF. International Dairy Federation. **The World Dairy Situation 2010**. Bulletin of the IDF No. 446/2010, Brussels, Belgium, 2010.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. **Leite em Pó Integral**. 1998. Disponível em: < <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/produtos/leitepo.asp>> Acesso em 18/06/2015.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

JIANG J, WOLK A, VESSBY B. Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. **American Journal of Clinical Nutrition**. 70:21-7, 1999.

JINAPONG, N.; SUPHANTHARIKA, M.; JAMNONG, P. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 2, p. 194–205, jan. 2008.

JOHN, J.; REGHUWANSI, A.; ARAVIND, U.K.; ARAVINDAKUMAR, CT. Development and validation of a high-performance thin layer chromatography method for the determination of cholesterol concentration. **Journal of Food and Drug Analysis**, Volume 23, Issue 2, Pages 219–224, June, 2015.

JUNIOR, J.B.P.; FERNANDES, K.G.; MÜLLER, R.C.S.; NÓBREGA, J.A.; PALHETA, D.C. Determinação direta de Ca, Mg, Mn e Zn em amostras de leite de búfala da ilha de Marajó por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). **Revista Química Nova**, v.32, n.9, 2333-2335, 2009.

KIM, E.H.J.; CHEN, X.D.; PEARCE, D. Surface composition of industrial spray-dried milk powders. 3. Changes in the surface composition during long-term storage. **Journal of Food Engineering**, Volume 94, Issue 2, Pages 182–191, September 2009.

KITAMURA, Y.; ITOH, H.; ECHIZEN, H.; SATAKE, T. Experimental vacuum spray dringos probiotic foods, includet with lactic acid bacteria. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, p. 714–726, 2009.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: Ed. RiMa, p.62, 2004.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida Moderna CLAE/HPLC**. Campinas: Atomo Editora, p.384, 2009.

LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M.T. Cholesterol Oxidation: Presence of 7-ketocholesterol in Different Food Products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 625-631, San Diego, 2000.

LIRA, G.M.; FILHO, J.M.; SANT'ANA, L.S.; TORRES, R.P.; OLIVEIRA, A.C.; OMENA, C.M.B.; NETA, M.L.S. Perfil de ácidos graxos, composição centesimal e valor calórico de moluscos crus e cozidos com leite de coco da cidade de Maceió-Al. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol.40, n.4, São Paulo, Outubro/Dezembro, 2004.

LLOYD M.A.; HESS, S.J.; DRAKE, M.A. Effect of nitrogen flushing and storage temperature on flavor and shelf-life of whole milk powder. **Journal of Dairy Science**, Campaign, v. 92. p. 2409-2422, 2009.

MACEDO, M.P., WECHSLER, F.S., RAMOS, A.A., AMARAL, J.B, SOUZA, J.C., RESENDE, F.D., OLIVEIRA, J.V. Composição físico-química e produção do leite de búfalas da raça Mediterrâneo no Oeste do Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Viçosa. v.30, n.3. suppl. 1., Maio, 2001.

MAZALLI, M.R.; BRAGAGNOLO, N. Validation of two methods for fatty acids analysis in eggs. **Lipids**, v.42, p.483-490, 2007.

MEDEIROS, U. K. L., MEDEIROS, M. F. D., PASSOS, M. L. Goat Milk Powder Production in Small Agro-Cooperatives. **In Innovation Food Engineering - New Techniques and Products**, Ed. M. L. Passos e C. P. Ribeiro. Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group, Chap. 18, p.539-575, 2009.

MEDEIROS, K. C.; DEODATO, J.N.V.; MARTINS, S.S.; SEVERO, D.S.; ARAÚJO, A.S. Qualidade de leite em pó integral comercializados em Pombal – PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. Pombal - PB, v.9, n.4, p. 50 - 52, outubro-dezembro, 2014.

MELÍCIO, S.P.L.; CARVALHO, M.R.B.C; TONHATI, H.; MUNARI, D.P; HOLGADO, A.P.R.; LAROSA, G.; AIURA, F.S. Composição química do leite de Búfala da raça Murrah na região de São Carlos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n.346-347, v.60, 7-12, setembro/dezembro, 2005.

MÉNARD, O.; AHMAD, S.; ROUSSEAU, F.; BRIARD-BION, V.; GAUCHERON, F.; LOPEZ, C. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. **Food Chemistry**, Volume 120, Issue 2, Pages 544–551, 15 May 2010.

- MIHAYLOVA G.; PEEVA, T. Trans fatty acids and conjugated linoleic acid in the buffalo milk. **Italian Journal of Animal Science**, Italian, v.6, n.1, p.1056-10599, 2007.
- MONTGOMERY, D.C. **Diseño y análisis de experimentos**. Trad. por Jaime Delgado Saldivar. Mexico, Iberoamérica, (1991).
- MORALES-AIZPURÚA, I. C.; TENUTA-FILHO, A. Óxidos de colesterol: ocorrência em alimentos, formação e efeitos biológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.38, n.4, p.431-442, 2002.
- MORALES-AIZPURÚA, I. C.; TENUTA-FILHO, A. Colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol em maionese. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 25, n.3, p. 495-499, 2005.
- NADAL, M.R.; SERVIN, J.L.C.; CASTELLOTE, A.I.; RIVERO, M.; SABATER, M.C.L. Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 756-763, 2007.
- NOUROOZ-ZADEH, J.; APPELQVIST, L.A. Cholesterol oxides in Swedish foods and food ingredients: Butter and cheese. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 65:1635–1641, 1998.
- NUNES, J. C.; TORRES, A. G. Fatty acid and CLA composition of Brazilian dairy products, and contribution to daily intake of CLA, **Journal of food composition and analysis**, v. 23, p. 782-789, 2010.
- O'BRIEN, N.M.; O'CALLAGHAN, Y.C.; LYONS, N.M.; WOODS, J.A. Biological effects of dietary cholesterol oxidation products. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, Dublin, v. 39, p. 265-273, 2000.
- OHSHIMA, T. Formation and content of cholesterol oxidation products in seafood and seafood products. In: GUARDIOLA, F. et al. (Eds.). **Cholesterol and phytosterol oxidation products in foods and biological samples: analysis, occurrence and biological effects**. New York: AOAC Press, p. 187-203, 2002.
- OLDFIELD, D.; SINGH, H. Functional properties of milk powder. C. Onwulata (Ed.), **Encapsulated and Powdered Foods**, CRC Press (2005).
- OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 641–650, 2009.
- OSADA, K.; KODAMA, T.; YAMADA, K.; SUGANO, M. Oxidation of Cholesterol by Heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 41, p. 1198-1202, 1993.
- PARIZA, M.W.; PARK, Y.; COOK, M.E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 4, p. 283- 298, 2001.
- PERIN, L. M.; MORAES, P. M.; MICHELLE VIEIRA ALMEIDA, M. V. A.; NERO, L. A. Interferência de temperaturas de estocagem no desenvolvimento da microbiota mesófila, psicrotrófica, lipolítica e proteolítica de leite cru. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 333-342, 2012.

PIGNATA, M.C.; FERNANDES, S.A.A.; FERRÃO, S.P.B.; FALEIRO, A.S.; CONCEIÇÃO, D.G. Estudo Comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 226 – 233, outubro – dezembro, 2014.

POLI, G.; BIASI, F.; LEONARDUZZI, G. Oxysterols in the pathogenesis of major chronic diseases. **Redox Biology**. v.1, p. 125–130, 2013.

PRADO, F. C.; PARADA, J. L.; SOCCOL, C. R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 111–123, 2008.

RAMALHO, H.M.M.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Total cholesterol and desmosterol contents in raw, UHT, infant formula powder and human milks determined by a new fast micro-HPLC method. **Food Analytical Methods**, p.424–430, 4 (2011).

RANGEL, A. H. do N.; OLIVEIRA, J. P. F. de; ARAÚJO, V. M. de; BEZERRA, K. C.; MEDEIROS, H. R. de; LIMA JÚNIOR, D. M. de; ARAÚJO, C. G. F. de. Influência do estágio de lactação sobre a composição do leite de búfalas. **Acta Veterinaria Brasilica**, UFERSA, Mossoró, v.5, n.3, p.306-310, 2011.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27, 771-780, 2004.

RIBEIRO, E. P.; ELISENA, A.G. S. **Química de Alimentos**. 2ª ed – São Paulo: Editora Blucher, 2007.

SALDANHA, T.; MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p. 109-113, 2004.

SALDANHA, T.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; BRAGAGNOLO, N. HPLC Separation and Determination of 12 Cholesterol Oxidation Products in Fish: Comparative Study of RI, UV, and APCI-MS Detectors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 54, p.4107- 4113, 2006.

SANHUEZA, J.C.; NIETO, S.K.; VALENZUELA, A.B. Ácido linoléico conjugado: un ácido graso com isomeria trans potencialmente benéfico. **Revista Chilena de Nutrición** 29(2):98-105, 2002.

SARANTINOS J.; O'DEA K.; SINCLAIR A.J. Cholesterol oxides in Australian foods: identification and quantification. **Food Australia**, 45:485–490, 1993.

SCHIEBER, A.; ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488–495, 2012.

SHARMA, A.; JANA, A.H.; CHAVAN, R.S. Functionality of milk powders and milk-based powders for end use applications – a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, p518–528, 11 (2012).

SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Colesterol da mesa ao corpo. **Maringá: Eduem**, p.117, 2011.

SUTTON, J.D. Altering milk composition by feedind. **Journal of Dairy Science**, v.72, n.10, p. 2801-2814, 1989.

TAMIME, A.Y. **Dairy powders and concentrated products**. Wiley-Blackwell, UK, 2009.

TENUTA-FILHO, A.; MORALES-AIZPURÚA, I. C.; MOURA, A. F. P. de; KITAHARA, S. E. Óxidos de colesterol em alimentos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p. 319-325, 2003.

TÉOFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Revista Química Nova**, Vol. 29, No. 2, 338-350, 2006.

THOMAS, M.E.C.; SCHER, J.; DESOBRY-BANON, S.; DESOBRY, S. Milk powders ageing: effect on physical and functional properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 44 (5), p.297-322, 2004.

TONHATI, H.; MENDONZA-SANCHEZ, G.; SENO, L. O. Qualidade do leite de búfalas e correlações entre a produção e seus principais constituintes. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v.60, n.346/347, p.61-64, setembro/dezembro, 2005.

UBHAYASEKERA, S. J. K. A.; VERLEYEN, T.; DUTTA, P. C. Evaluation of GC and GC-MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. **Food Chemistry**, v. 84, p. 149-157, 2004.

VERRUMA-BERNARDI, M. R.; SALGADO, J. M. Análise química de leite de búfala em comparação ao leite de vaca. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 51, n. 1, p. 131-137, 1994.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; STADEN, J. F. V.; DANZER, K.; LINDNER, W.; BURNS, D. T.; FAJGELJ, A.; MÜLLER, H. **Pure and Applied Chemistry**, 73, 1381, 2001.

VISSOTTO, F. Z.; MONTENEGRO, F. M.; SANTOS, J. M.; OLIVEIRA, S. J. R. Avaliação da influência dos processos de lecitinação e de aglomeração nas propriedades físicas de achocolatado em pó. **Food Science and Technology**. v.26, n.3, p. 666-671, 2006.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Fundamentos de bioquímica. Porto Alegre: **Artmed**, 931 p., 2002.

WHO/FAO (World Health Organization/Food and Agriculture Organization). **Expert Report: Diet, nutrition and prevention of chronic diseases**. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series 916, 2003.

ZAVA, M.A. **Produção de búfalos**. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1984. 245p.

ZOTOS, A.; BAMPIDIS, V.A. Milk fat quality of Greek buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Food Composition and Analysis**, volume 33, Issue 2, p. 181–186, March, 2014.

## CAPÍTULOS

Para fins de organização e práticas didáticas, esta dissertação foi estruturada em 3 (três) capítulos, conforme segue descrito:

- O Capítulo 1 apresenta o artigo sobre a composição físico-química e avaliação do perfil de ácidos graxos do leite em pó de búfala obtido por spray dryer, destacando as etapas de processamento para obtenção do produto em pó e avaliando se o tempo de armazenamento influenciou nas características de qualidade.
- O Capítulo 2 apresenta o artigo que relata o uso de ferramentas de otimização no aumento da eficiência analítica na extração do colesterol e seus óxidos em leite em pó de búfala. Por meio do planejamento fatorial, gráfico de Pareto e da metodologia de superfície de resposta foi possível encontrar a melhor condição experimental para o processo de extração do colesterol e dos óxidos 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol em leite em pó de búfala.
- O Capítulo 3 aborda informações sobre a validação da metodologia para determinação do colesterol e dos óxidos de colesterol em leite em pó de búfala e avalia ainda se o tempo de armazenamento influencia na formação desses compostos.

## **CAPÍTULO I**

### **COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE EM PÓ DE BÚFALA OBTIDO POR SPRAY DRYER<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Artigo a ser submetido.

# COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO LEITE EM PÓ DE BÚFALA OBTIDO POR SPRAY DRYER

## RESUMO

Objetivou-se com este estudo se avaliar os efeitos da secagem por spray dryer e do tempo de armazenamento sobre os parâmetros físico-químicos e da fração de ácidos graxos em leite em pó de búfala. O leite foi oriundo de búfalas Murrah em início de lactação criadas a pasto. O leite foi desidratado por atomização em mini spray dryer, em seguida foram pesadas amostras de 200 g e embaladas à vácuo e armazenadas nos tempos: zero, 30, 60, 90, 120 e 150 dias em temperatura ambiente para posteriores análises. A cada período foram realizadas análises de umidade, gordura, proteínas, cinzas, densidade, acidez, índice de solubilidade e partículas queimadas, além da análise do perfil de ácidos graxos (AG). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e os resultados obtidos foram analisados por meio da ANOVA, comparando as médias do leite cru com o leite em pó pelo teste F e análise de regressão para o efeito do tempo de armazenamento ( $\alpha=0,05$ ). Observou-se elevação do teor de umidade do leite em pó com o tempo de armazenamento. Não houve alteração no perfil de ácidos graxos durante a estocagem do produto. Do total de AG presentes, os de maior concentração foram: o C16:0, 18:1cis9, C18:0 e C14:0. O uso de spray dryer para desidratação do leite e o tempo de armazenamento do leite em pó não afetaram a fração lipídica de leite.

**Palavras-chave:** atomização, secagem, armazenamento.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of drying spray dryer and storage time on the physicochemical parameters and the fraction of fatty acids in buffalo milk powder. The milk was coming from Murrah buffaloes in early lactation created pasture. The milk was dried by spray mini spray dryer, and then samples were weighed 200 g and vacuum packed and stored at time zero, 30, 60, 90, 120 and 150 days at room temperature for further analysis. Within each period were performed analyzes of moisture, fat, protein, ash, density, acidity, solubility index and burnt particles in addition to the profile analysis of fatty acids (FA). The experimental design was completely randomized and the results were analyzed by ANOVA, comparing the averages of raw milk to the milk powder by F test and regression analysis to

the effect of storage time ( $\alpha = 0.05$ ). Observed increase in milk powder of moisture content with the storage time. No change in the fatty acid profile during storage of the product. Of total fatty acids present, the highest concentration were: C16: 0, 18: 1cis9, C18: 0 and C14: 0. The use of spray drying for dehydration milk and milk powder storage time did not affect the lipid fraction of milk.

**Keywords:** atomization, dryer, storage.

## 1. INTRODUÇÃO

Os búfalos domésticos pertencem à família *Bovidae*, a subfamília *Bovinae* e à espécie *Bubalus bubalis* (BORGHESE & MAZZI, 2005). O efetivo bubalino mundial é de 195,2 milhões de cabeças, 97% destes (cerca de 189 milhões) se encontram na Ásia, destacando-se a Índia com 60% do rebanho, cerca de 113 milhões (FAO, 2013). Nas últimas décadas no Brasil, a bubalinocultura tem apresentado crescimento significativo em todo o território nacional (RODRIGUES et al., 2008).

A composição química do leite de búfala apresenta-se de forma variável em diferentes estudos e isso está relacionado aos fatores ambientais (estação do ano e tipo de pastagem, alimento e apresentação do alimento) e efeitos do animal (raça, idade, estágio de lactação) (AMARAL et al., 2005). Destaca-se pela ausência do  $\beta$ -caroteno em sua composição, conferindo-lhe coloração branca. Possui alto valor nutricional, elevado teor cálcio, de gordura (6,87 a 8,59%) e de proteínas (3,91 a 4,44%), sabor adocicado e é mais concentrado do que o leite bovino (ARAÚJO et al., 2011).

A gordura do leite de búfala apresenta grande valor econômico, pois contribui para o sabor característico do leite e seus derivados, e melhora a textura. Oferece também níveis apreciáveis de ácidos graxos essenciais ao organismo (ARAÚJO et al., 2011; FIGUEIREDO, JUNIOR & TORO, 2010). Em comparação com o leite de vaca, os ácidos graxos (AG) presentes na gordura do leite de búfala em maior concentração são os ácidos cáprico, mirístico, palmítico, esteárico, palmitoléico e linoléico e em menor concentração os ácidos graxos butírico e oléico. Estudos ainda relatam a maior presença em ácidos graxos saturados (AGS) (64,35%) do que para os insaturados (AGI) (35,96%), destacando-se ainda, concentração de 1,77% do ácido linoléico conjugado (CLA) (MELÍCIO et al., 2005).

O leite de búfala por ser utilizado tanto para o consumo in natura como também matéria-prima na obtenção de derivados. Entre as diversas tecnologias para o seu aproveitamento, tem-se a secagem do leite para obtenção do produto em pó. Algumas

vantagens desta tecnologia é que o produto em pó possibilita um transporte mais econômico, planejamento de produção, distribuição e a fabricação de diversos derivados (MEDEIROS et al., 2010; KITAMURA et al., 2009; PRADO, PARADA & SOCCOL, 2008).

Tratamentos térmicos podem alterar o perfil de ácidos graxos no leite (ELLIOTT et al., 2005; PESTANA et al., 2015), especialmente os ácidos graxos polinsaturados. Nesse sentido os objetivos da condução deste trabalho foram: i) o de avaliar os efeitos da secagem por atomização (spray dryer) do leite de búfalas sobre o perfil de ácidos graxos e, ii) avaliar os efeitos do tempo de armazenamento do leite em pó de búfalas sobre os ácidos graxos.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção da matéria prima e local do experimento**

O leite de búfala utilizado para elaboração do leite em pó foi oriundo de búfalas da raça Murrah, ordenhadas uma vez ao dia mecanicamente, criadas a pasto em fazenda comercial. A produção do leite em pó foi realizada no Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologias (CEDETEC) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). A etapa de extração da gordura para a análise de ácidos graxos foi realizada no Centro de Estudos e Análises Cromatográficas (CEACROM) da UESB e a análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada no Laboratório de Nutrição e Crescimento Animal da ESALQ-USP. As análises de composição físico-química foram executadas no Laboratório de Processamento de Leite e Derivados da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e no Laboratório de Avaliação da Identidade e Qualidade do Leite em Pó da Indústria de Laticínios Vale Dourado-Itapetinga/Ba.

### **2.2 Produção do leite em pó de búfala**

Antes da secagem o leite foi analisado quanto à acidez, densidade, gordura, extrato seco total (EST), extrato seco desengordurado (ESD), proteína e índice crioscópico, conforme BRASIL (2006). A etapa de secagem por atomização do leite de búfala foi realizada em um mini spray dryer modelo MSD 3.0 (LABMAQ do Brasil LTDA, Ribeirão Preto-SP, Brasil) em ciclo co-corrente, com temperatura do ar na entrada e saída do secador de 140°C e 80°C, respectivamente, bico injetor de 1,0 mm de espessura com vazão de ar no bico de 40L/min, vazão do ar de secagem 3m<sup>3</sup>/min e vazão da bomba peristáltica de 1,07 L/h. Esses parâmetros foram estabelecidos por meio de testes preliminares. A produção de leite em pó foi realizada

em 3 repetições e para cada repetição foram processados 10 litros de leite de búfala. Após obtenção do produto, as amostras foram embaladas a vácuo em empacotadora BS 320 (R. Baião, Ubá-MG, Brasil) e armazenadas por 30, 60, 90, 120 e 150 dias em temperatura ambiente.

### **2.3 Caracterização do leite em pó**

Foram determinados no momento de sua obtenção (tempo 0) e durante o seu período de estocagem (tempos de 30, 60, 90, 120 e 150 dias) os teores de gordura por meio do método butirométrico, sendo feita a leitura na escala do butirômetro de Teicher; a porcentagem de cinzas pelo método gravimétrico utilizando mufla modelo LS20 (FORLABO Brasil LTDA, Diadema-SP, Brasil); umidade por meio de um medidor infravermelho modelo IV2000 (GEHAKA Brasil LTDA); densidade pelo termolactodensímetro; proteína pelo método Kjeldahl, utilizando-se o fator de conversão de 6,38 para o cálculo da proteína total; acidez titulável em °Dornic; índice de solubilidade (I.S) e as partículas queimadas (BRASIL, 2009).

### **2.4 Análise de ácidos graxos**

Em cada tempo de armazenamento estudado, as amostras foram preparadas para a extração lipídica. Cerca de 10 g das amostras de leite em pó de búfala foram pesadas em béquer de 250 mL no qual foi realizado o processo de mistura com os solventes da extração em duplicata.

#### **2.4.1 Extração dos lipídios totais**

Os lipídios das amostras do leite em pó foram extraídos com clorofórmio, metanol e água (2:1:0,75) de acordo com a metodologia de Folch, Lees & Stanley (1957).

Foram adicionados 25 mL de metanol à amostra e em seguida agitou-se com o auxílio de agitador magnético (marca Marconi, modelo MA085, Piracicaba-SP, Brasil). Após 5 minutos de agitação constante foram adicionados 50 mL de Clorofórmio que são mantidos sob agitação por 10 min. A amostra foi filtrada com o auxílio de um funil de Bunchner acoplado a kitassato e bomba a vácuo (modelo 132, marca Primatec, Itu-SP, Brasi). Posteriormente, o material filtrado foi coletado e ao resíduo (amostra sólida) adicionado novamente ao béquer sendo acrescentado 30 mL de solução MIX contendo Clorofórmio e Metanol na proporção 2:1. A mistura foi novamente agitada por 5 minutos, em seguida

adicionados 45 mL de água e após 5 minutos sob agitação a mistura foi filtrada. O filtrado foi colocado em funil de separação com capacidade para 250 mL e mantido até total separação de fases. Após separação obteve-se a fase inferior formada por clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e gordura, e fase superior álcool metílico (MeOH). A fase inferior foi coletada e transferida para balão de fundo chato de 250 mL onde foi realizada a etapa de evaporação, enquanto a fase mantida no balão foi descartada. A etapa de evaporação foi realizada em rotavapor rotativo de marca Fisatom (modelo 801, São Paulo-SP, Brasil) à temperatura entre 33-34 °C, onde todo o clorofórmio presente na mistura foi evaporado restando apenas a fração de gordura da amostra.

#### **2.4.2 Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos**

Os lipídeos extraídos das amostras de queijo foram submetidos à preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, segundo a metodologia descrita por Christie (1982).

#### **2.4.3 Análise Cromatográfica de ésteres de ácidos graxos**

As amostras esterificadas foram analisadas em cromatógrafo a gás modelo Focus CG-Finnigan, com detector de ionização de chama, coluna capilar CP-Sil 88 (Varian), com 100 m de comprimento por 0,25 µm de diâmetro interno e 0,20 µm de espessura do filme. Como gás de arraste foi utilizado o hidrogênio, numa vazão de 1,8mL/min. O programa de temperatura do forno inicial foi de 70°C, tempo de espera 4 min, 175°C (13°C/min) tempo de espera 27 min, 215°C (4°C/min) tempo de espera 9 min. e, em seguida aumentando 7°C/min. até 230°C, permanecendo por 5min., totalizando 65 min. A temperatura do vaporizador foi de 250°C e a do detector foi de 300°C.

Uma alíquota de 1 µL do extrato esterificado foi injetada no cromatógrafo e a identificação dos ácidos graxos foi feita pela comparação dos tempos de retenção e as percentagens dos ácidos graxos foram obtidas através do *software* – *Chromquest 4.1* (Thermo Electron, Italy).

#### **2.4.4 Identificação e análise quantitativa dos ésteres metílicos de ácidos graxos**

Os ácidos graxos foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos ésteres metílicos das amostras com padrões de ácidos graxos de manteiga e foram

quantificados por normalização das áreas dos ésteres metílicos. Os resultados dos ácidos graxos foram expressos em percentual de área (%).

## 2.5 Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram analisados por meio de Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste F, adotando-se  $\alpha = 0,05$ . Para avaliar o efeito do tempo de armazenamento do leite em pó de búfala sobre os parâmetros estudados, utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado–DIC realizando a análise de regressão, adotando a significância de 5%. Os modelos matemáticos foram escolhidos de acordo com os efeitos significativos do modelo proposto ( $p < 0,05$ ) e coeficientes de determinação ( $R^2$ ). Todas as análises estatísticas necessárias foram realizadas no Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), versão 9.1 (RIBEIRO JÚNIOR, 2009).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Análises físico-químicas do leite de búfala

Os resultados observados para densidade, acidez, gordura e extrato seco desengordurado (ESD) (Tabela 1) estão em conformidade com o estabelecido pela legislação do Estado de São Paulo (SÃO PAULO, 1994), que indica limites de 1,028 a 1,034g/mL, 14 a 23°D, mín. 4,5%, mín. 8,57%, respectivamente para leite fluido de búfala.

**Tabela 1.** Valores médios da composição físico-química do leite fluido de búfala.

Composição	Valores
Gordura (%)	5,3±0,7
Proteína (%)	3,4±0,2
Acidez (°D)	16±0,0
Densidade (g/mL)	1,0315±0,0
EST (%)	14,36±0,3
ESD (%)	9,03±0,6
Índice Crioscópico (°H)	-0,543±0,0

°H= graus Hortvet; °D= graus Dornic; EST= extrato seco total; ESD= extrato seco desengordurado.

Como não existe legislação específica para o padrão de identidade e qualidade do leite de búfala, estes resultados foram comparados com a legislação do Estado de São Paulo, estando, portanto dentro dos padrões estabelecidos.

Estudos realizados por Pignata et al. (2014) encontraram teores médios de gordura no leite de búfalas de 4,26%, densidade de 1,029 g/mL, acidez de 15°D e 3,05% de proteína

Essas pequenas diferenças nos resultados da composição do leite de búfala encontradas em outras pesquisas são provocadas por influências de fatores ambientais, como estação de ano e nutrição, e efeitos do animal, como raça, idade e estágio de lactação, polimorfismo genético e mastites (RAJALA-SCHULTZ et al., 1999; BHONSIE et al., 2003; SODI et al., 2003; TALPUR, MEMON & BHANGER, 2007; TUFARELLI et al., 2008; MISRA et al., 2008; NAWAZ et al., 2009).

### **3.2 Composição do leite em pó**

O leite em pó de búfala produzido classifica-se como integral, pois não foi submetida a nenhuma operação de padronização e a quantidade de matéria gorda encontrada foi maior que 26,0%. Foram observadas as características da composição do leite em pó logo após a etapa de secagem e ao longo do tempo de armazenamento (Tabela 2).

Com a análise de regressão foi possível avaliar todos os parâmetros do leite em pó por meio dos modelos estatísticos (quadrático e linear). Foram analisadas as relações das variáveis dependentes (gordura, umidade, índice de solubilidade, densidade, acidez, cinzas e proteína) com a variável independente (tempo de armazenamento).

Dentre todos os parâmetros avaliados, apenas o teor de umidade foi afetado linearmente ( $p > 0,05$ ), obedecendo a equação  $y = 3,6382x + 0,0048$  ( $R^2 = 0,66$ ). A umidade exerce forte influência sobre a estabilidade físico-química do leite em pó durante a armazenagem e distribuição, principalmente quando a umidade for acima de 5%, denominada de ponto crítico, pois alterações indesejáveis, como, perda de sabor, aglomeração e deterioração microbiana podem acontecer (KREY & SOUZA, 2009; MATHLOUTHI, 2001).

O teor de umidade no intervalo de 0 a 60 dias armazenamento variou de 3,63 a 3,77%. Após esse período, o mesmo apresentou maior porcentagem, mantendo-se até os 150 dias, valor próximo a 4,0%. Os valores encontrados estão acima do limite máximo permitido pela legislação vigente para leite em pó integral de vaca (3,5%) (BRASIL, 1997). Como não existe legislação específica para leite em pó de búfala, os resultados são comparados com outros trabalhos referentes ao assunto.

**Tabela 2.** Valores médios da composição físico-química do leite em pó de búfala nos diferentes tempos de armazenamento.

Parâmetros	Tempos de armazenamento (dias)						Valor de P			
	0*	30*	60*	90*	120*	150*	L	Q	FA	R <sup>2</sup>
<b>Gordura(%)</b>	33,67	33,77	34,15	34,67	34,25	34,02	0,8230	0,7893	NS	-
<b>Proteína (%)</b>	21,35	21,40	22,02	21,33	21,48	21,52	0,8302	0,3793	NS	-
<b>Umidade(%)</b>	3,63	3,72	3,77	4,43	4,25	4,20	0,0128	0,4154	NS	0,66
<b>Densidade(g/mL)</b>	1,042	1,044	1,042	1,043	1,042	1,042	0,7606	0,8491	NS	-
<b>Acidez (°D)</b>	11,03	10,77	11,97	11,77	11,27	11,10	0,6978	0,1867	NS	-
<b>Cinzas (%)</b>	4,84	4,73	4,77	4,79	4,80	4,88	0,5019	0,2391	NS	-
<b>Solubilidade(mL)</b>	0,21	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,2300	0,7351	NS	-

\*Médias das amostras de leite em pó de búfala; F-teste:  $p < 0,05$ ; Modelos: L-Linear, Q-Quadrático; FA: falta de ajuste; NS: não significativo; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação.

Guerra, Neves & Pena (2005) ao avaliarem a caracterização e processamento do leite bubalino em pó em secador por nebulização, encontrou resultados para a porcentagem de proteína (23,2%), teor de umidade (3,4%) e cinzas (4,2%), valores semelhantes ao encontrado nesse experimento. Diniz et al. (2005) estudando o leite em pó de cabra, observaram teor de umidade de 6,3%, acima do permitido pela referida legislação.

A umidade influencia negativamente a fluidez do produto, devido ao aumento da fase líquida e interações capilares entre as partículas. Os níveis de umidade podem aumentar ao longo do armazenamento, particularmente se a lactose está presente no estado amorfo, com o aumento da absorção de água resultando em fluidez reduzida (FITZPATRICK, 2007). E níveis mais baixos de umidade pode ocasionar o rompimento da camada monomolecular protetora de água, tornando a gordura susceptível a reações de oxidação (MEDEIROS et al., 2014).

O efeito significativo dos períodos de armazenamento ( $p < 0,05$ ) na umidade dos pós pode ter sido provocado pela a embalagem utilizada, onde a qual não foi eficiente na barreira ao vapor d'água do ambiente ou devido à ocorrência de falhas na etapa de termoselagem. Mesmo que tenha empregado o vácuo nas embalagens, o oxigênio presente entre as partículas do pó não se elimina por completo, com isso, o emprego de gases inertes no interior da embalagem é bastante indicado, já que de acordo com a legislação, é permitida a utilização dos gases nitrogênio e dióxido de carbono para o envase, que são utilizados para remover o O<sup>2</sup> dentro das embalagens como forma de minimizar a rancidez oxidativa e inibir o crescimento de microrganismos aeróbicos no alimento (CHURCH, 1994).

A solubilidade não sofreu efeito do tratamento. O valor máximo de solubilidade é de 1,0 mL (BRASIL, 1997), indicando assim boa solubilidade do produto avaliado. A solubilidade do leite em pó diminui quando: i) as condições de secagem são excessivamente severas; ii) durante o armazenamento quando o produto é mantido a temperaturas muito altas e, iii) quando o teor de umidade é alto (AMIOT, 1991). Apesar da umidade observada no tratamento estar acima do permitido (3,5%), este não teve interferência na solubilidade do leite em pó.

A determinação de partículas queimadas em leite em pó serve para avaliar o processo de secagem do leite em pó, no que diz respeito às temperaturas do ar de entrada e saída, pois o efeito de altas temperaturas durante o processo pode ocasionar a desnaturação das proteínas e o aumento da insolubilidade do pó (WALSTRA et al., 2001). A metodologia apresenta escala de valores de 7,5mg (Disco A), 15,0mg (Disco B), 22,5mg (Disco C) e 32,5mg (Disco D).

O leite em pó deve apresentar número de partículas máximo correspondente ao Disco B, pois o excesso de partículas queimadas altera a aparência (presença de pontos pretos) e o sabor (sabor "queimado") do leite em pó (BRASIL, 1997). Observou-se que o leite em pó de búfala apresentou partículas queimadas contidas no Disco B, indicando que o processo de produção do mesmo esteve dentro do esperado.

### **3.3 Análise de ácidos graxos**

Foram identificados 52 ácidos graxos presentes no leite em pó de búfala, sendo listados os de maior incidência em leite e queijo de búfala de acordo com a literatura (VIANNI & BRAZ-FILHO, 1996; ROMANO et al., 2011). Os valores médios obtidos para os ácidos graxos das amostras foram agrupados conforme o grau de saturação (Tabela 3). Observou-se que não houve variação significativa ( $p > 0,05$ ) no perfil de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados do leite para os diferentes tempos de armazenamento. Resultado este positivo, indicando que as condições de estocagem não influenciaram no conteúdo total dos ácidos graxos do leite em pó de búfala.

O ácido palmítico (C16:0), oléico (C18:1 cis 9), esteárico (C18:0), mirístico (C14:0), o vacênico (18:1 trans) e butírico (C4:0) foram os ácidos graxos que mais contribuíram para a composição lipídica do leite em pó de búfala. Os ácidos graxos saturados láurico (C12:0), mirístico (C14:0) e palmítico (C16:0) presentes no leite, são os que possuem maior efeito hipercolesterolêmico ou aterogênico, possuindo o mirístico efeito mais predominante (TURAN et al., 2007; LOCK & GARNSWORTHY, 2003). Estudos revelam que o ácido palmítico eleva a concentração plasmática do colesterol e de LDL e que o ácido esteárico não

está diretamente relacionado ao aumento do colesterol, pois quando ingerido, é rapidamente convertido em ácido oléico no fígado, por meio das dessaturases (LOTTENBERG, 2009).

Atualmente, tem sido buscada a diminuição do teor desses ácidos graxos saturados em produtos de origem animal com o intuito de aprimorar a imagem desses produtos junto à opinião dos consumidores.

Na análise de composição físico-química foi observado que o teor de gordura do leite em pó (Tabela 2) não sofreu efeito com o tempo de estocagem, o que confirma com os resultados do perfil de AG, pois o tempo de armazenamento também não exerceu influência sobre a composição em ácidos graxos do leite em pó de búfala.

**Tabela 3.** Perfil de ácidos graxos do leite em pó de búfala armazenado por diferentes períodos.

Ácidos graxos	Tempos de armazenamento (dias)						Valores de P		R <sup>2</sup>
	0	30	60	90	120	150	L	Q	
<b>Saturados</b>									
C4:0	3,45	3,59	3,70	3,64	3,58	3,66	0,3551	0,3987	-
C6:0	1,19	1,20	1,35	1,23	1,23	1,25	0,8286	0,6481	-
C8:0	0,47	0,47	0,54	0,47	0,46	0,46	0,8214	0,6478	-
C10:0	0,91	0,85	1,06	0,88	0,84	0,84	0,6494	0,6073	-
C12:0	1,31	1,30	1,48	1,33	1,28	1,28	0,8092	0,5948	-
C14:0	8,23	8,14	9,22	8,29	8,04	8,14	0,8320	0,6368	-
C15:0	1,67	1,66	1,73	1,68	1,64	1,66	0,7564	0,6352	-
C16:0	30,02	29,88	32,56	29,98	30,38	30,51	0,9253	0,6281	-
C17:0	1,06	0,78	1,15	1,05	1,04	1,06	0,5707	0,9980	-
C18:0	14,11	13,87	12,04	13,97	14,32	14,41	0,7331	0,5089	-
C20:0	0,23	0,24	0,26	0,22	0,24	0,21	0,5335	0,4180	-
C22:0	0,06	0,10	0,13	0,09	0,11	0,09	0,4502	0,0818	-
<b>Monoinsaturados</b>									
C14:1 cis9	0,52	0,53	0,65	0,52	0,52	0,50	0,7733	0,5649	-
C16:1 cis9	2,08	2,10	2,40	1,97	2,06	2,01	0,7086	0,6430	-
C18:1 trans	3,70	3,76	2,53	3,77	3,61	3,72	0,9118	0,6158	-
C18:1 cis9	21,39	21,37	19,68	21,25	21,06	21,29	0,9876	0,4851	-
<b>Poli-insaturados</b>									
C18:2 cis9 trans11	1,11	1,19	0,94	0,80	1,10	1,06	0,7487	0,4610	-
C18:3 n6	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,1069	0,3137	-
C18:3 n3	0,46	0,49	0,41	0,41	0,44	0,41	0,1076	0,5132	-
C20:4 n6	0,05	0,05	0,06	0,06	0,06	0,05	0,7869	0,2200	-
C20:5 n3	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,9257	0,6199	-
C22:6 n3	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01	0,9332	0,1684	-

Teste F (P<0,05); Modelos: L-Linear, Q-Quadrático; R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação; C4:0 (ácido butírico); C6:0 (ácido capríco); C8:0 (ácido caprílico); C10:0 (ácido cáprico); C12:0 (ácido láurico); C14:0 (ácido mirístico); C14:1 cis9 (ácido miristoléico) C15:0 (ácido pentadecílico); C16:0 (ácido palmítico); C16:1 cis9 (ácido palmitoléico); C18:0 (ácido esteárico); C18:1 trans (ácido vacênico); C18:1 cis9 (ácido oleico); C18:2 cis 9 trans 11 (ácido rumênico); C18:3 n6 (ácido- $\gamma$ -; linolênico); C18:3 n3 (ácido-  $\alpha$ - linolênico); C20:0 (ácido araquídico); C20:4 n6 (ácido araquidônico); C20:5 n3 (EPA); C22:0 (ácido beênico); C22:6 n3 (DHA).

Avaliando o perfil de AG no leite cru (LC) e em pó (LP) de búfala, não foi observado efeito do tratamento sobre os ácidos graxos, indicando que o tratamento térmico utilizado na secagem do leite não alterou esta fração (Tabela 4).

**Tabela 4.** Perfil de ácidos graxos do leite cru (LC) e do leite em pó (LP) de búfala.

<b>Saturados</b>	<b>LC</b>	<b>LP</b>	<b>P</b>
C4:0	3,56 <sup>a</sup>	3,45 <sup>a</sup>	0,5863
C6:0	1,21 <sup>a</sup>	1,19 <sup>a</sup>	0,5799
C8:0	0,45 <sup>a</sup>	0,47 <sup>a</sup>	0,4226
C10:0	0,83 <sup>a</sup>	0,91 <sup>a</sup>	0,2180
C12:0	1,28 <sup>a</sup>	1,31 <sup>a</sup>	0,6667
C14:0	8,07 <sup>a</sup>	8,23 <sup>a</sup>	0,6464
C15:0	1,65 <sup>a</sup>	1,67 <sup>a</sup>	0,4380
C16:0	30,68 <sup>a</sup>	30,02 <sup>a</sup>	0,5417
C17:0	1,13 <sup>a</sup>	1,06 <sup>a</sup>	0,5112
C18:0	14,30 <sup>a</sup>	14,11 <sup>a</sup>	0,7891
C20:0	0,24 <sup>a</sup>	0,23 <sup>a</sup>	0,8740
C22:0	0,08 <sup>a</sup>	0,06 <sup>a</sup>	0,5736
<b>Monoinsaturados</b>			
C14:1 cis9	0,49 <sup>a</sup>	0,52 <sup>a</sup>	0,3555
C16:1 cis9	2,01 <sup>a</sup>	2,08 <sup>a</sup>	0,4967
C18:1 trans	3,72 <sup>a</sup>	3,70 <sup>a</sup>	0,9120
C18:1 cis9	19,72 <sup>a</sup>	21,39 <sup>a</sup>	0,1061
<b>Poli-insaturados</b>			
C18:2 cis9 trans11	1,13 <sup>a</sup>	1,11 <sup>a</sup>	0,7693
C18:3 n6	0,00 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,1835
C18:3 n3	0,41 <sup>a</sup>	0,46 <sup>a</sup>	0,4778
C20:4 n6	0,05 <sup>a</sup>	0,05 <sup>a</sup>	0,1835
C20:5 n3	0,02 <sup>a</sup>	0,03 <sup>a</sup>	0,1835
C22:6 n3	0,02 <sup>a</sup>	0,01 <sup>a</sup>	0,1835

Médias seguidas da mesma letra em cada linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste F (P>0,05); C4:0 (ácido butírico); C6:0 (ácido capróico); C8:0 (ácido caprílico); C10:0 (ácido cáprico); C12:0 (ácido láurico); C14:0 (ácido mirístico); C14:1 cis9 (ácido miristoléico) C15:0 (ácido pentadecílico); C16:0 (ácido palmítico); C16:1 cis9 (ácido palmitoléico); C18:0 (ácido esteárico); C18:1 trans (ácido vacênico); C18:1 cis9 (ácido oleico); C18:2 cis 9 trans 11 (ácido rumênico); C18:3 n6 (ácido- $\gamma$ -; linolênico); C18:3 n3 (ácido-  $\alpha$ -linolênico); C20:0 (ácido araquídico); C20:4 n6 (ácido araquidônico); C20:5 n3 (EPA); C22:0 (ácido beênico); C22:6 n3 (DHA).

Dentre os ácidos graxos saturados para o leite cru observou-se também que os ácidos palmítico (C16:0), mirístico (C14:0) e esteárico (C18:0) foram os que apresentaram maiores porcentagens na fração lipídica. A predominância na composição desses ácidos graxos saturados no leite também foi verificado em estudo por Ménard et al. (2010) ao avaliarem o perfil de ácidos graxos dos leites bubalino e bovino.

Os ácidos graxos insaturados (AGI) são essenciais para a saúde humana. A maior porcentagem de ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) tanto para o leite cru quanto para o leite em pó foi o do ácido oleico (C18:1 cis9), seguido do isômero C18:1 trans. Esses AGI possuem efeito relacionados à redução do colesterol total e lipoproteínas de baixo peso molecular (LDL), sem reduzir as lipoproteínas de alta de densidade (HDL) (MIHAYLOVA & PEEVA, 2007). Os valores encontrados para o isômero do C18:1 trans, neste trabalho, foram de 3,72% para LC e 3,70% para o LP. Este isômero é de grande importância, pois atua como substrato para produção do ácido linoleico conjugado (CLA) na glândula mamária e também para a síntese de novo do ácido linoleico conjugado, CLA (18:2 cis-9 trans 11) em seres humanos e animais (GRIINARI et al., 2000).

Para o teor de ácidos de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), observou-se durante o tempo de armazenamento maior concentração para o ácido rumênico (CLA, 18:2 cis 9 trans 11) e em seguida para o ácido graxo  $\alpha$ -linolênico (18:3 n3). A ingestão de ácidos graxos poli-insaturados trazem vários benefícios, principalmente o que diz respeito ao sistema cardiovascular. Entre eles o ácido rumênico e o complexo ômega-3 (ácido linolênico) são os que mais se destacam. O consumo de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, reduzem o nível de colesterol no organismo, contribuem para o desenvolvimento do corpo e são benéficos para a saúde dos ossos (BRANDÃO et al., 2005). O consumo de CLA está relacionado a sua atividade anticarcinogênica, antiaterosclerose, alteração na composição corporal e metabolismo do tecido adiposo e modulação do sistema imune (BAUMAN & GRIINARI, 2003; BELURY 2002).

Quanto ao somatório dos ácidos graxos, não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre o leite cru e o leite seco em spray dryer (Tabela 5). Do total de ácidos graxos presentes na gordura do leite, 66,94 e 66,23% correspondem aos ácidos graxos saturados dos leites LC e LP, respectivamente. Resultado superior para o leite cru foram relatados por Pignata et al. (2014) e Ménard et al. (2010), com 75,30 e 70,0% de AGS, respectivamente.

A composição em ácidos graxos permitiu avaliar a razão entre n6 e n3, apresentando maior porcentagem para o leite em pó (0,21%). Caldeira et al. (2010) avaliando a razão n6/n3, encontrou valores de 0,54 na fase inicial e 0,48 na fase final da lactação do leite fluido de búfala da raça Murrah. Sugere-se que o resultado desta razão seja abaixo de 4,0, pois só assim terá quantidades desejáveis destes ácidos graxos na dieta que vão exercer ação preventiva sobre doenças cardiovasculares. Dessa forma, tanto para LC quanto para LP os resultados estiveram dentro dos padrões recomendados (BOBE & ZIMMERMAN, 2004).

**Tabela 5.** Indicadores nutricionais do leite cru (LC) e em pó (LP) de búfala.

Ácidos graxos	Leite		
	LC	LP	P
Somatórios (%)			
$\Sigma$ AGMI	30,79 <sup>a</sup>	31,43 <sup>a</sup>	0,6389
$\Sigma$ AGPI	2,27 <sup>a</sup>	2,37 <sup>a</sup>	0,6475
$\Sigma$ AGS	66,94 <sup>a</sup>	66,23 <sup>a</sup>	0,6470
$\Sigma$ n6/n3	0,16 <sup>a</sup>	0,21 <sup>a</sup>	0,6369

Médias seguidas da mesma letra em cada linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo Teste F ( $P>0,05$ );  $\Sigma$ AGS (Somatório de Ácidos Graxos Saturados);  $\Sigma$ AGMI (Somatório de Ácidos Graxos Monoinsaturados);  $\Sigma$ AGPI (Somatório de Ácidos Graxos Poli-insaturados);  $\Sigma$ n6/n3 (Somatório da relação entre os ácidos graxos da família Ômega-6 e Ômega-3).

É necessário que se tenha um equilíbrio adequado de  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 na dieta, uma vez que esses dois ácidos graxos trabalham em conjunto na produção de diversos hormônios. Devido a importância nutricional desses ácidos graxos, várias recomendações têm sido estabelecidas por diversos autores e órgãos de saúde, em diferentes países (MARTIN et al., 2006). O consumo em excesso de ácidos graxos n6 e ingestão reduzida de n3, provoca um ambiente mais pró-inflamatório, por isso que é indispensável manter o equilíbrio destes ácidos na dieta (CAMOLAS & SOUSA, 2010).

#### 4. CONCLUSÃO

O leite em pó produzido apresentou bons atributos de qualidade, com um aumento significativo apenas para o teor de umidade durante a sua estocagem.

O perfil de ácido graxos do leite em pó de búfala não sofreu efeito nem com o tempo de armazenamento nem com o processamento térmico. Apresentou maior porcentagem de ácidos graxos saturados, com destaque para os ácidos palmítico (C16:0), mirístico (C14:0) e esteárico (C18:0).

A razão entre os ácidos graxos da família n6 e n3 apresentou conformidade com os padrões estabelecidos. Isso mostra que o método de secagem empregado na produção do leite pó foi eficiente, pois o produto apresentou características de qualidade satisfatória, tornando-o viável a sua produção.

#### 5. REFERÊNCIAS

AMARAL, F. R.; CARVALHO, L. B.; SILVA, N.; BRITO, J. R. F. Qualidade do leite de búfalas: composição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 106-110, 2005.

AMIOT, J. **Ciência y tecnología de la leche**. Zaragoza. Editorial Acribia, S.A. p.547, 1991.

ARAÚJO, T. P. M., RANGEL, A. H do N., SOARES, A. D., LIMA, T. C. C. de., JÚNIOR, D. M. de L., NOVAES, L. P., Influência das Estações do Ano Sobre a Composição do Leite de Búfalas Mantido em tanque de resfriamento, **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.07, n.01, p. 1-5, 2011.

BAUMAN, D.E.; GRIINARI, M.G. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu. Rev Nutr.*, v.23, p.203-227, 2003.

BELURY, M. A., Dietary conjugated linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 505-531, 2002.

BHONSIE, D., CHOURASIA, S.K., SINGH, M., JAIN, R.K. Factors influencing major milk constituents in Murrah buffaloes. **The Indian Journal of Animal Sciences**, 73:107–109, 2003.

BOBE G, ZIMMERMAN S, HAMMOND EG, FREEMAN G, LINDBERG GL, DONALD CB. Texture of butters made from milks differing in indices of atherogenicity. Iowa State University **Animal Industry Report**, p.3, 2004.

BORGHESE, A.; MAZZI, M. **Buffalo population and strategies in the world**. In: Borghese, A. Buffalo Production and Research. REU Technical Series 67,p.1-40, 2005. Ed. A Borghese. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

BRANDÃO, P. A., COSTA, F. G. P., BARROS, L. R., NASCIMENTO, G. A. J. do.; Ácidos graxos e colesterol na alimentação humana. **Revista Agropecuária Técnica**, v. 26, n. 1, p. 5-14, 2005.

BRASIL. MAPA- Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria n.º 369, de 04 de setembro de 1997. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite em Pó**. Brasília: 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 69, de 13 de dezembro de 2006. Institui o critério de avaliação da qualidade do leite in natura, concentrado e em pó, reconstituídos, com base no método analítico oficial físico-químico denominado “Índice CMP”, de que trata a IN 68 de 12 de dezembro de 2006. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, Seção 1, n° 239. p.8, 14 de dez 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 11, de 30 de abril de 2009. Aprova os métodos oficiais alternativos para análise da qualidade do leite e seus derivados, que utilizem o sistema de detecção por diferencial de pH e reação enzimática - CL10 PLUS BCS. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, seção 1, p. 12, 4 maio 2009.

CALDEIRA, L. A., FERRÃO, S. P. B., FERNANDES, S. A. de A., MAGNAVITA, A. P. A., SANTOS, T. D. R., Índices de qualidade nutricional da fração lipídica do leite de búfalas da raça Murrah produzido em diferentes fases de lactação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, 69 (4): 545-54, 2010.

CAMOLAS, J.M.L.; SOUSA, J.C. Ingestão de Gordura e Doença Cardiovascular. **Revista Fatores de Risco**, n.16, p.72-75, jan./mar. 2010.

CELESTINO, E.L.; IYER, M.; ROGINSKI, H. The Effects of Refrigerated Storage of Raw Milk on the Quality of Whole Milk Powder Stored for Different Periods. **International Dairy Journal**, Volume 7, Issue 2-3, Pages 119-127, fev-mar, 1997.

CHRISTIE, W.W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesterol esters. **Journal of Lipid Research**, v. 23, p. 1072, 1982.

CHURCH, N. Developments in modified-atmosphere packaging and related technologies. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 5, p. 345-352, 1994.

DINIZ, A.C.P.; LUIZ, M.B.; GONZAGA, L.V.; MEIER, M.M. Comportamento da  $\beta$ -ciclodextrina adicionada ao leite de cabra submetido ao processo de desidratação por “spray dryer”. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, p. 197-201, 2005.

ELLIOTT, A.J.; DATTA, N.; AMENU, B.; DEETH, H.C. Heat-induced and other chemical changes in commercial UHT milks. **Journal of Dairy Research**, 72: 442-446, 2005.

FAO. Food of Agriculture Organization of the United Nations. 2013. **Banco de Dados FAOSTAT**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/Q/QA/E>>. Acesso em: 20 de junho 2015.

FERNANDES, S. A. A.; MATTOS, W. R.; MATARAZZO, S. V.; ROSETO, C. V.; MACHADO, P. H. Componentes do leite de bubalinos ao longo da lactação no Estado de São Paulo. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n.346/347, v.60, p. 71-78, 2005.

FIGUEIREDO, E. L.; JUNIOR, J de B. L.; TORO, M. J. U. Caracterização físico-química e microbiológica do leite de búfala “in natura” produzido no Estado do Pará. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**. Ponta Grossa – Paraná, v. 04, nº 01: p. 19-28, 2010.

FITZPATRICK, J.J. Particle properties and the design of solid food particle processing operations. **Food and Bioproducts Processing**, p.308–314, 85 (2007).

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, v.226, n.1, p.497-509, 1957.

GOUVÊA, M. M., FRANCO, C. F. J., MARQUES, F. F. C., PEREIRA NETTO, A. D., Ácidos Linoleicos Conjugados (ALC) – Os benefícios que exercem sobre a saúde humana e as principais metodologias analíticas aplicadas para sua determinação em leites. **Revista Virtual Química**, v. 4, n. 6, p. 653-669, 2012.

GRIINARI JI, CORL BA, LACY SH, CHOUINARD PY, NURMELA KVV, BAUMAN DE. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by Delta(9)-desaturase. **J Nutr**, 130, p.2285-9, 2000.

GUERRA, R.B.; NEVES, E.C.A.; PENA, R.S. Caracterização e processamento de leite bubalino em pó em secador por nebulização. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 25(3): 443-447, julho-setembro, 2005.

JINAPONG, N.; SUPHANTHARIKA, M.; JAMNONG, P. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 2, p. 194–205, jan. 2008.

KITAMURA, Y.; ITOH, H.; ECHIZEN, H.; SATAKE, T. Experimental vacuum spray dringos probiotic foods, includet with lactic acid bacteria. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, p. 714–726, 2009.

KREY, T.; SOUZA, C. F. V. Avaliação da qualidade microbiológica e físico-química do leite em pó integral produzido numa indústria da região do vale do taquari – RS. **Interbio**, v.3, n.2, p. 8, 2009.

LOCK A, GARNSWORTHY JH. Seasonal variation in milk conjugated linoleic acid and  $\Delta 9$  dessaturase activity in dairy cows. **Livestock Production Science**, 79:47-59, 2003.

LOTTENBERG, A.M.P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.53, n.5, 595-607, mai./jun. 2009.

MARTIN, C.A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R.; VISENTAINER, J.E.L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N.E.; VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.19, n.6, p.761-770, nov./dez. 2006.

MATHLOUTHI, M. Water content, water activity, water structure and the stability of foodstuffs. **Food Control**, Volume 12, Number 7, October, pp. 409-417(9), 2001.

MEDEIROS, U. K. L., MEDEIROS, M. F. D., PASSOS, M. L. Goat Milk Powder Production in Small Agro-Cooperatives. In **Innovation Food Engineering - New Techniques and Products**, Ed. M. L. Passos e C. P. Ribeiro. Boca Raton: CRC Press Taylor and Francis Group, Chap. 18, p.539-575, 2009.

MEDEIROS, U.K.L.; MARCIANO, L.A.; NASCIMENTO, R.J.A.; PASSOS, M.L.; MEDEIROS, M.F.D. Estudo da Higroscopicidade do Leite de Cabra em Pó Produzido na Secagem do Leite de Jorro, com Partículas de Polipropileno e Avaliação das Propriedades Físicas do Leite Reconstituído. **Alimentacion Ciencia e Ingeniería**, v. 16, p. 249-250, 2010.

MEDEIROS, K. C.; DEODATO, J.N.V.; MARTINS, S.S.; SEVERO, D.S.; ARAÚJO, A.S. Qualidade de leite em pó integral comercializados em Pombal – PB. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**. Pombal - PB, v.9, n.4, p. 50 - 52, outubro-dezembro, 2014.

MELÍCIO, S.P.L.; CARVALHO, M.R.B.C; TONHATI, H.; MUNARI, D.P; HOLGADO, A.P.R.; LAROSA, G.; AIURA, F.S. Composição química do leite de Búfala da raça Murrah na região de São Carlos. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, n.346-347, v.60, 7-12, setembro/dezembro, 2005.

MÉNARD, O.; AHMAD, S.; ROUSSEAU, F.; BRIARD-BION, V.; GAUCHERON, F.; LOPEZ, C. Buffalo vs. cow milk fat globules: Size distribution, zeta-potential, compositions in total fatty acids and in polar lipids from the milk fat globule membrane. **Food Chemistry**, Volume 120, Issue 2, Pages 544–551, 15 May 2010.

MIHAYLOVA G.; PEEVA, T. Trans fatty acids and conjugated linoleic acid in the buffalo milk. **Italian Journal of Animal Science**, Italian, v.6, n.1, p.1056-10599, 2007.

MISRA S. S., SHARMA A, BHATTACHARYA T. K. , KUMAR P, SAHA R. S. Association of breed and polymorphism of  $\alpha$ -s1 and  $\alpha$ -s2 casein genes with milk quality and daily milk and constituent yield traits of buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Buffalo Bull** 27:294–301, 2008.

NAWAZ, H.; YAQOOB, M.; SARWAR, M.; ABDULLA, M.; SULTAN, J. I.; KHAN B. B. Effect of feeding different sources of supplemental fat on the performance of Nili-Ravi buffaloes. **The Indian Journal of Animal Sciences**, 79:188–192, 2009.

PESTANA, J. M; GENNARI, A.; MONTEIRO, B. W.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. S. V. Effects of Pasteurization and Ultra-High Temperature Processes on Proximate Composition and Fatty Acid Profile in Bovine Milk. **American Journal of Food Technology** 10 (6): 265–272, DOI: 10.3923/ajft.2015.265.272, 2015.

PIGNATA, M.C.; FERNANDES, S.A.A.; FERRÃO, S.P.B.; FALEIRO, A.S.; CONCEIÇÃO, D.G. Estudo Comparativo da composição química, ácidos graxos e colesterol de leites de búfala e vaca. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 27, n. 4, p. 226 – 233, outubro – dezembro, 2014.

PRADO, F. C.; PARADA, J. L.; SOCCOL, C. R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 111–123, 2008.

RAJALA-SCHULTZ, P. J.; GRÖHN, Y. T.; MCCULLOCH, C. E.; GUARD, C. L. Effects of Clinical Mastitis on Milk Yield in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.82, n.6, p.1213–1220, 1999.

RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG)**; Versão 9.1; Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2007.

RODRIGUES, C. F. de C., IAPICHINI, J. E. C. B., LISERRE, A. M., SOUZA, K. B. de., FACHINI, C., REICHERT, R. H., Oportunidades e Desafios da Bubalinocultura Familiar da região Sudoeste Paulista, **Revista Tecnologia & Inovação Agropecuária**, v. 1, n.2, 2008.

ROMANO, R.; GIORDANO, A.; CHINAESE, L.; ADDEO, F.; MUSSO, S.S. Triacylglycerols, fatty acids and conjugated linoleic acids in Italian Mozzarella di Bufala Campana cheese. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.24, p.244-249, oct./dec. 2011.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Agricultura e Abastecimento. **Resolução SAA nº 24 de 01 de agosto de 1994**. Dispõe sobre as normas técnicas de produção e classificação dos produtos de origem animal e as relativas às atividades de fiscalização e inspeção dos produtos de origem animal. Cap. 7, Artigo 134, 1994.

- SCHIEBER, A.; ESQUIVEL, P.; JIMÉNEZ, V. M. Functional properties of coffee and coffee by-products. **Food Research International**, v. 46, n. 2, p. 488–495, 2012.
- SODI, S.S.; MEHRA, M.L.; JAIN, A.K.; TREHAN, P.K. Effect of non-genetic factors on the composition of milk of Murrah buffaloes. **Indian Veterinary Journal**, 85:950–952, 2008.
- TALPUR, F. N.; MEMON, N. N.; BHANGER. M. I. Comparison of Fatty Acid and Cholesterol Content of Pakistani Water Buffalo Breeds. **Pakistan Journal of Analytical & Environmental Chemistry**, v. 8, n. 1 & 2, p. 15-20, 2007.
- TUFARELLI, V.; DARIO, M.; LAUDADIO, V. Diet composition and milk characteristics of Mediterranean water buffaloes reared in South Eastern Italy during spring season. **Livestock Research for Rural Development**, 20(10):1–7, 2008.
- TURAN, H.; SÖNMEZ, G.; KAYA, Y. Fatty acid profile and proximate composition of the thornback ray (*Raja clavata*, L. 1758) from the Sinop coast in the Black Sea. **Journal Fish Science**, v.1, n.2, p.97-103, 2007.
- VAN NIEUWENHOVE, C. P., GONZÁLEZ, S. N., PÉREZ CHAIA, A., PESCE, A., Conjugate linoleic acid in buffalo (*Bubalus bubalis*) milk from Northwest Argentina. **Milchwissenschaft – Milk Science International**, v.59, p. 506-508, 2004.
- VIANNI, R., BRAZ-FILHO, R., Ácidos graxos naturais: Importância e ocorrência em alimentos. **Revista Química Nova**, v. 19, 1996.
- WALSTRA, P.; GEURTS, T.J.; NOOMEN, A.; JELLEMA; VAN BOEKEL, M.A.J.S. **Ciencia de la leche y tecnología de los productos lácteos**. Zaragoza: Acribia, 2001.

## **CAPÍTULO II**

### **USO DE FERRAMENTAS DE OTIMIZAÇÃO NO AUMENTO DA EFICIÊNCIA ANALÍTICA NA EXTRAÇÃO DO COLESTEROL E SEUS ÓXIDOS EM LEITE EM PÓ DE BÚFALA<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Artigo a ser submetido.

# USO DE FERRAMENTAS DE OTIMIZAÇÃO NO AUMENTO DA EFICIÊNCIA ANALÍTICA NA EXTRAÇÃO DO COLESTEROL E SEUS ÓXIDOS EM LEITE EM PÓ DE BÚFALA<sup>1</sup>

## RESUMO

Objetivou-se com este estudo, a otimização metodológica para extração do colesterol e dos óxidos de colesterol (7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol) em leite em pó de búfala (LPB) com o uso da metodologia da superfície de resposta (MSR) e do gráfico de Pareto. Foram utilizadas as seguintes variáveis independentes o tempo de repouso necessário para a saponificação; os volumes de hidróxido de potássio, de álcool etílico, água e hexano e como variável dependente o ponto ótimo de extração. Para o colesterol e o 7-cetocolesterol a variável hidróxido de potássio foi a mais expressiva e para o 25-hidroxicolesterol a variável volume de água foi mais importante. A condição ótima para a extração do colesterol e dos óxidos de colesterol em LPB foi a adição de 3 mL da solução de hidróxido de potássio a 50% (m/v) e 4 mL de álcool etílico e 24 h de repouso no escuro à temperatura ambiente até a completa reação de saponificação, adicionando-se 6 mL de água e 12 mL de hexano. O teste de otimização por meio da MSR e do gráfico de Pareto foram capazes de identificar a melhor condição experimental para o colesterol e seus óxidos.

**Palavras-chave:** cromatografia líquida, planejamento fatorial, spray dryer.

## ABSTRACT

The objective of this study , the methodological optimization for extraction of cholesterol and cholesterol oxides (7- cetocolesterol and 25 - hydroxycholesterol) in buffalo milk powder (LPB) using the response surface methodology (RSM ) and the Pareto chart. The following independent variables, the rest time required for the saponification were use; the volume of potassium hydroxide, ethanol, water and hexane as the dependent variable and the optimum extraction. For cholesterol and 7- ketocholesterol variable potassium hydroxide was the most significant and 25- hydroxycholesterol the variable volume of water was most important. The optimal condition for the extraction of cholesterol and cholesterol oxides in LPB was added 3 mL of potassium hydroxide solution 50% (w/v) and 4 mL of ethyl alcohol and 24 h resting in the dark at room temperature atmosphere until complete saponification reaction by adding 6

mL of water and 12 mL of hexane. The optimization test by MSR and Pareto chart were able to identify the best experimental condition to cholesterol and their oxides.

**Keywords:** factorial design, liquid chromatography, spray dryer.

## 1. INTRODUÇÃO

A estacionalidade reprodutiva dos búfalos (*Bubalus bubalis*, L.) provoca, na entressafra, redução de aproximadamente 60% na produção de leite, o que determina diminuição na oferta de derivados lácteos (SINGH, NANDA & ADAMS, 2000). Uma das possíveis alternativas para a estabilização da oferta do produto é a sua secagem. Entre os métodos, a secagem por atomização (spray dryer) é o mais utilizado, por gerar produto de boa qualidade com gasto de energia relativamente baixo quando comparado com outros métodos de secagem. No processo de secagem por spray dryer utiliza-se temperaturas acima de 100°C, o que pode alterar o teor de colesterol assim como, produzir óxidos de colesterol (AL-ROWAILY, 2008). Estudos sobre os efeitos da secagem por spray dryer sobre o colesterol em leite em pó de búfalas não são encontrados na literatura, indicando a necessidade de produção de conhecimento sobre o mesmo.

O colesterol ((3 $\beta$ )-cholest-5-en-3-ol), presente no leite, é um álcool com núcleo esteroideal presente na membrana celular, conhecido por ser carreador de lipoproteínas no organismo, é uma molécula fundamental para o corpo humano por apresentar diversas funcionalidades no mesmo, tais como componente de membrana celular e esqueleto-base para a síntese de hormônios. Quando o leite é processado pode-se observar a presença de óxidos de colesterol oriundos da auto-oxidação (HERZALLAH, 2005; AL-ROWAILY, 2008). O conhecimento do processo de oxidação em alimentos é importante, em razão de que os óxidos formados apresentarem propriedades biológicas deletérias, com características aterogênicas, citotóxicas, cancerígenas e mutagênicas, entre outras (ALINA et al., 2012). Por isso, a formação e a ingestão desses compostos precisam ser examinadas.

Para a detecção, identificação e quantificação de compostos como o colesterol são empregadas técnicas de separação nas quais as amostras são submetidas a reações que fazem com que o analito em questão fique de uma forma mais pura para posterior determinação. Mas, primeiramente, a matriz estudada é submetida a uma reação de extração. O método empregado para extrair o colesterol e compostos é o da reação de saponificação. Também conhecida como hidrólise alcalina, este método baseia-se na produção de sabão de ácidos

graxos, ou seja, formação de sais de ácidos graxos presentes na matriz, separando o analito que é insaponificável por não possuir ácido graxo na sua estrutura.

Ao realizar experimentos industriais, é comum se verificar a necessidade de se estudar o efeito de um ou mais fatores de controle ao mesmo tempo (ABRAHAM, CHIPMAN & VIJAYAN, 1999). A aplicação das técnicas de planejamento fatorial fracionado ( $2^{k-p}$ ) e metodologia de superfície de respostas (MSR) mostram-se como uma resolução destes problemas. Por isso torna-se necessário otimizar o processo para melhorar o desempenho do sistema, a fim de se obter o máximo de benefícios (BEZERRA et al., 2008).

Com o planejamento fatorial fracionado é possível analisar os efeitos sobre uma resposta de interesse, de k fatores com dois níveis cada um, em  $2^{k-p}$  combinações de testes, realizando-se apenas uma parte, sem comprometer significativamente a precisão das conclusões decorrentes da análise de resultados (MONTGOMERY, 1991). E a metodologia de superfície de resposta (MSR) é um conjunto de técnicas estatísticas e modelos matemáticos eficazes para o desenvolvimento, melhoria e otimização de processos que envolvem uma resposta de interesse que é influenciado por diversas variáveis independentes (MYERS, MONTGOMERY & ANDERSON-COOK, 2009).

Neste contexto, objetivou-se com a condução deste trabalho, otimizar a metodologia de extração de colesterol e seus óxidos em leite em pó de búfala por saponificação direta e analisada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção da matéria prima**

O leite de búfala utilizado para elaboração do leite em pó foi oriundo de búfalas da raça Murrah, criadas no município de Maiquinique/Bahia- Brasil, ordenhadas uma vez ao dia mecanicamente. A produção do leite em pó foi realizada no Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologias (CEDETEC) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). A etapa de secagem por atomização do leite de búfala foi realizada em um mini spray dryer modelo MSD 3.0 (LABMAQ do Brasil LTDA, Ribeirão Preto-SP, Brasil), com temperatura do ar de entrada de 140°C e de saída de 80°C, bico injetor de 1,0 mm de espessura com vazão de ar no bico de 40L/min, vazão do ar de secagem 3m<sup>3</sup>/min e vazão da bomba peristáltica de 1,07 L/h. Esses parâmetros foram estabelecidos por meio de testes preliminares. Após obtenção do produto, as amostras foram embaladas a vácuo em

empacotadora BS 320 (R. Baião, Ubá-MG, Brasil) e armazenadas em temperatura ambiente até o momento das análises.

## **2.2 Otimização**

A etapa de otimização foi realizada no Centro de Estudos e Análises Cromatográficas na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia–Itapetinga/BA. A extração do colesterol e óxidos foi realizada através da saponificação direta das amostras e posterior extração com hexano (SALDANHA, MAZALLI & BRAGAGNOLO, 2004) com modificações no tipo e tempo da saponificação (SALDANHA et al., 2006).

## **2.3 Extração**

Para extração da matéria insaponificável das amostras de leite em pó, foram pesados aproximadamente 0,5g de amostra e adicionados 4 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 50% (p/v) (marca Vetec, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) e 6 mL de álcool etílico (PA) (marca Synth, Diadema-SP, Brasil). Após agitação (agitador modelo QL- 901, marca Biomixer, USA) a 2800 rpm por 1 minuto a mistura permaneceu em repouso por 22 horas, no escuro e à temperatura ambiente, para que se completasse a reação de saponificação. Após este intervalo, adicionou-se 5 mL de água destilada e 10 mL de hexano (PA) (marca Synth, Diadema-SP, Brasil) e a mistura foi novamente agitada por 1 min. Após completa separação de fases, o sobrenadante (fase hexânica) foi coletado, evaporado a temperatura ambiente em evaporador rotativo (Fisatom, modelo 801, São Paulo-SP, Brasil) e o resíduo obtido diluído em 2 mL de acetonitrila e isopropanol (marca Panreac, Barcelona- Espanha) na proporção de 95:5 (fase móvel). O resíduo diluído na fase móvel foi filtrado através de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (marca MN, Alemanha) com diâmetro do poro de 0,45 µm e analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD).

## **2.4 Identificação e quantificação**

A identificação do colesterol e dos óxidos foi realizada tentativamente através da comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com o tempo de retenção dos picos dos padrões, colesterol (*Cholesterol*, cód. C8667), 7-cetocolesterol (*5-Cholesten-3β-ol-7-one*, cód. C2394) e 25-hidroxicolesterol (*25-Hydroxycholesterol*, cód. H1015, Sigma-Aldrich®),

São Paulo-SP, Brasil) e também pelo comprimento de onda característico de cada substância. Os cromatogramas foram processados a 202 nm para o colesterol e 25-hidroxicolesterol e a 227 nm para o 7-cetocolesterol.

## 2.5 Delineamento Experimental

Para a otimização da metodologia, foi utilizado o planejamento fatorial fracionado de ordem  $2^{5-1}$ , tendo como variáveis o volume da solução de KOH (V. KOH), o volume de álcool etílico (V. Álcool), o volume de água adicionada à amostra (V. Água), o volume de Hexano (V. Hexano) e o tempo de repouso (T. Repouso), proporcionando 16 experimentos com pontos inferiores (-1) e superiores (+1) e 3 repetições do ponto central totalizando dessa forma 19 ensaios (Tabela 1). E com isso, os dados foram analisados por meio do uso do software Statistica 6.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) gerando gráficos de Pareto e de Superfícies de Respostas para conhecermos a melhor condição experimental de extração dos compostos.

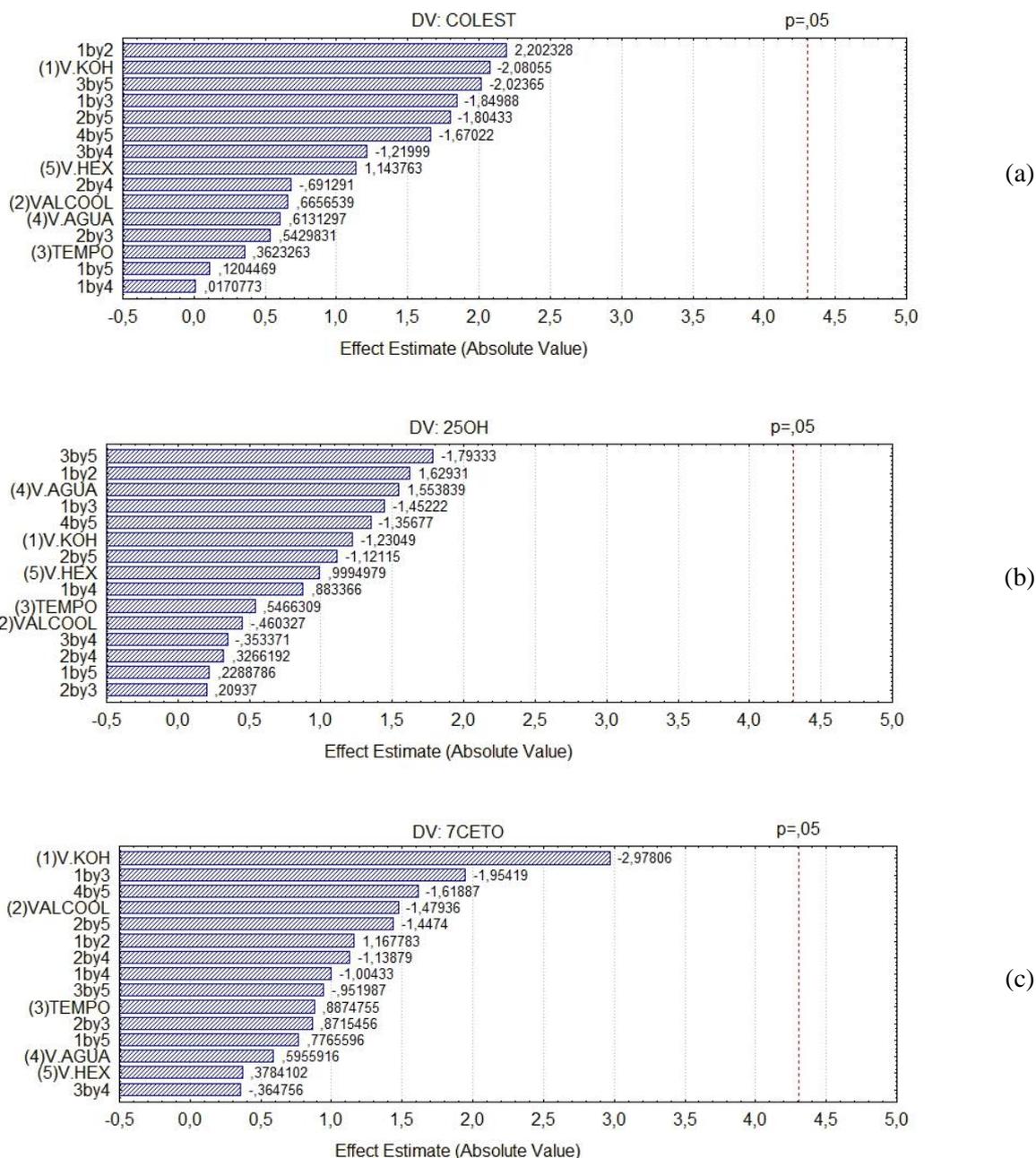
**Tabela 1.** Variáveis e níveis empregados no planejamento fatorial fracionado.

Variáveis (volume/tempo)	Níveis		
	-1 (inferior)	0 (ponto central)	+1 (superior)
KOH (mL)	3	4	5
Álcool (mL)	4	6	8
Água (mL)	4	5	6
Hexano (mL)	8	10	12
Repouso (hora)	20	22	24

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao planejamento fatorial fracionado são melhores observados no diagrama de Pareto (Figura 1). A linha vertical ( $p=0,05$ ) sugere a menor magnitude dos efeitos estatisticamente significativos na análise em questão. Observa-se que nenhuma das variáveis (V. KOH, Álcool, Água, Hexano e Repouso) influenciaram o processo de extração do colesterol e dos seus óxidos.

**Figura 1.** Variáveis de maior importância no processo de extração para o colesterol (a), 25-hidroxicolesterol (b) e o 7-cetocolesterol (c) de acordo com Diagrama de Pareto (95% de confiança).



Legenda: (1) V.KOH: volume de KOH; (2) VALCOOL: volume de álcool; (3) TEMPO: tempo de repouso; (4) V.ÁGUA: volume de água; (5) V.HEX: volume de hexano

No diagrama de Pareto, as variáveis e suas interações são colocadas verticalmente da mais significativa para a menos significativa. Assim, para o colesterol (Figura 1-a), os resultados indicam (seguindo as barras horizontais de cima para baixo) que o volume de KOH (V. KOH) foi a variável mais significativa, sendo o fator mais importante do experimento. Em

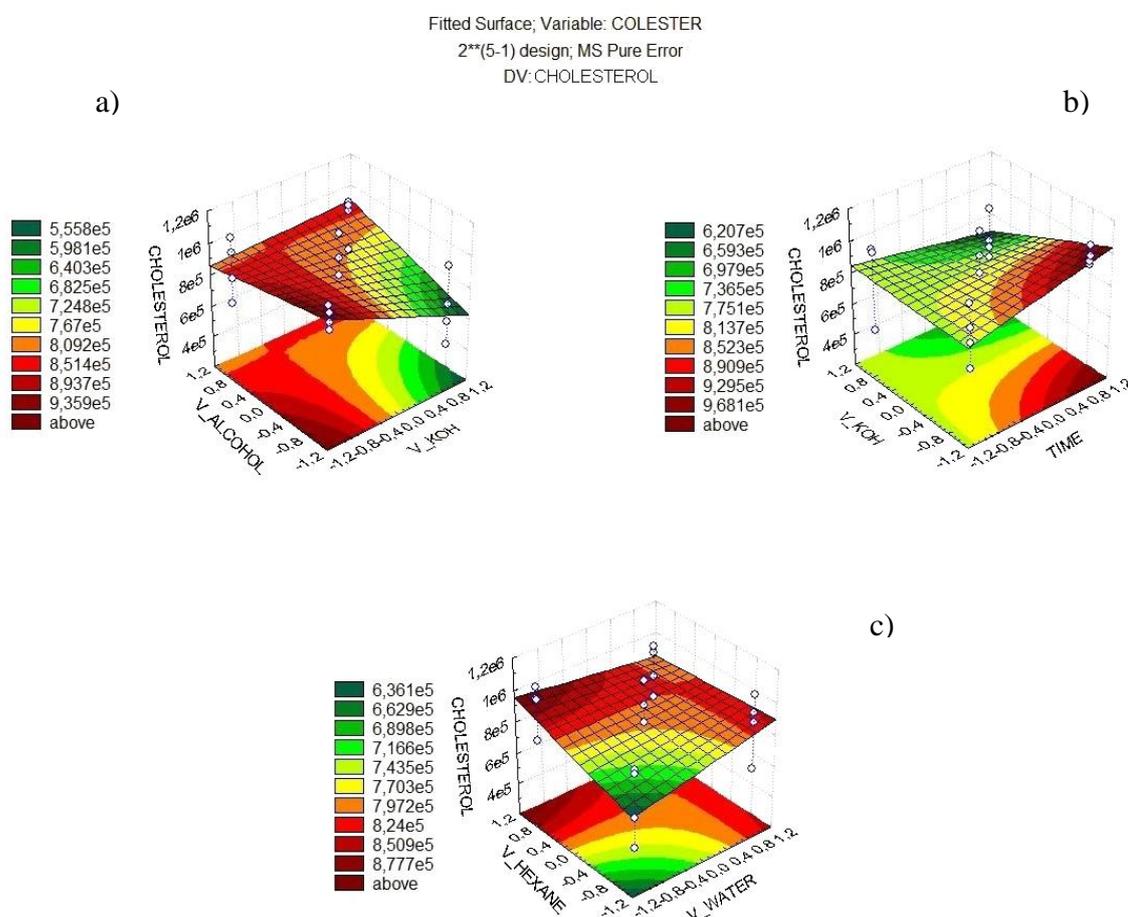
seguida, a variável volume de Hexano (V. Hexano) se destaca, seguindo-se sucessivamente as demais variáveis. Para o óxido 25-hidroxicolesterol (Figura 1-b), o volume de água (V. Água) seguido do volume da solução de KOH (V. KOH) foram as variáveis mais importantes no processo de extração. E por fim, na extração do composto 7-cetocolesterol (Figura 1-c) a variável (V. KOH) foi a mais expressiva, seguida da variável volume de álcool (V. Álcool). No diagrama de Pareto, os efeitos positivos indicam que os fatores devem ser usados no nível +1 para que se obtenha melhor resposta do sistema, por outro lado os efeitos negativos indicam que os fatores devem ser usados no nível -1.

Com isso, foi construído os gráficos de Superfícies de Resposta para o planejamento fatorial fracionado  $2^{5-1}$ , para se estudar mais detalhadamente cada variável e os respectivos níveis, podendo-se obter mais informações do sistema (Figura 2).

A metodologia de superfície de resposta (MRS) é utilizada para se estabelecer a concentração ótima de cada variável significativa e assim estabelecer uma condição otimizada de produção (GE, QIAN & ZHANG, 2008; XU et al., 2008).

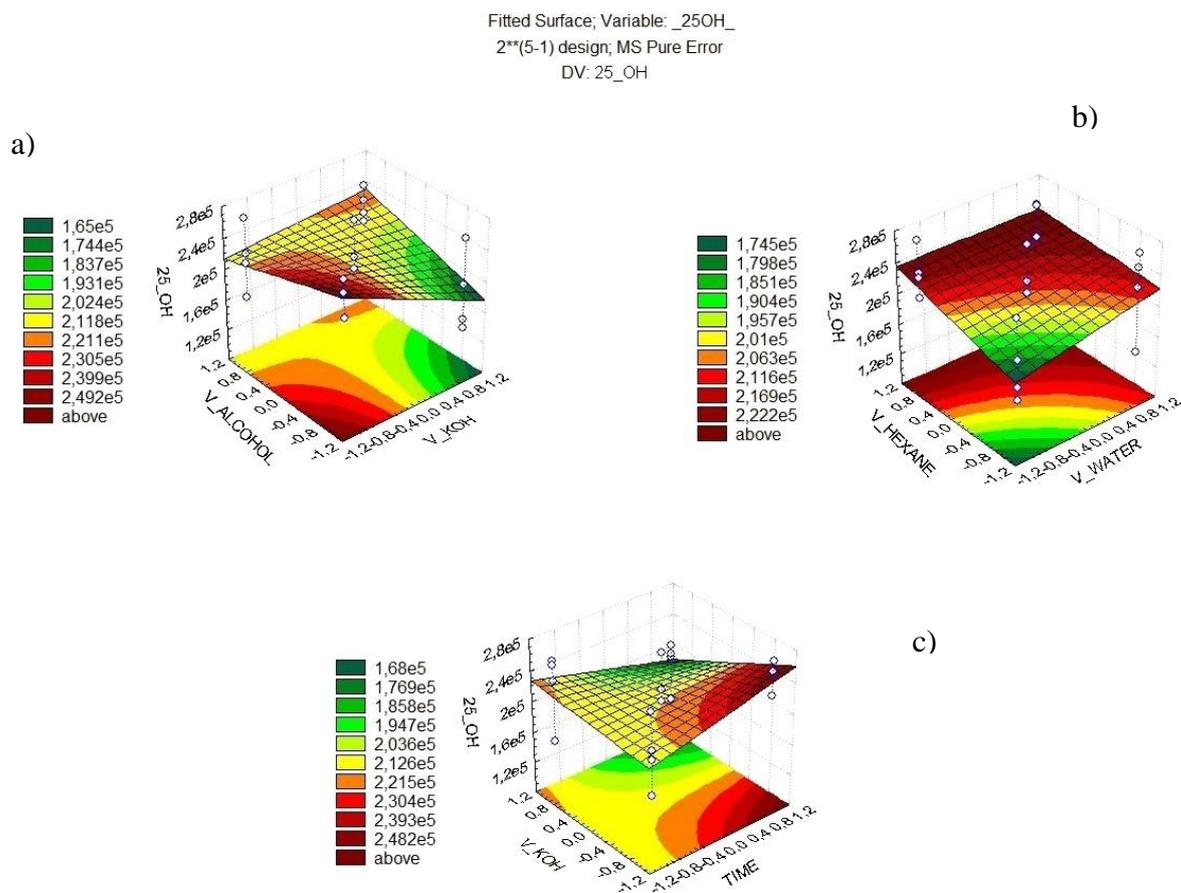
Para o colesterol, as superfícies de respostas (Figura 2) indicam (coloração vermelha) que no primeiro gráfico (Figura 2-a) os níveis inferiores (-) do volume de álcool e de KOH (3 e 4 mL respectivamente) foi o primeiro ponto ótimo da extração. Na segunda superfície (Figura 2-b), o nível inferior do volume de KOH e superior do tempo de repouso apresentou maior eficiência na extração do colesterol. No terceiro gráfico (Figura 2-c), verifica-se que o nível superior (+) para o volume de hexano como também para o volume de água adicionado foi o que mais favoreceu o processo.

**Figura 2.** Superfícies de resposta para extração ótima do colesterol.



A partir das superfícies geradas, foi possível determinar que as condições ótimas para extração do composto colesterol na amostra do leite em pó de búfala é, a adição do volume de 3 mL da solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) a 50% (m/v) e 4 mL de álcool etílico, com o tempo de repouso de 24 h no escuro e à temperatura ambiente até a completa reação de saponificação, adicionado-se 6 mL de água e, posteriormente, 12 mL de hexano. O primeiro gráfico de superfície de resposta para o óxido 25- hidroxicolesterol (Figura 3-a) mostra que os menores volumes de álcool e da solução de KOH utilizados proporcionaram maior extração do composto 25-hidroxicolesterol. Na segunda superfície de resposta (Figura 3-b) é notável o efeito positivo que o maior volume de hexano e de água exercem na extração. Pode-se perceber na terceira superfície que o nível superior do tempo de repouso (24 h) e o nível inferior do volume de KOH (3 mL) apresentaram melhor resposta (Figura 3-c).

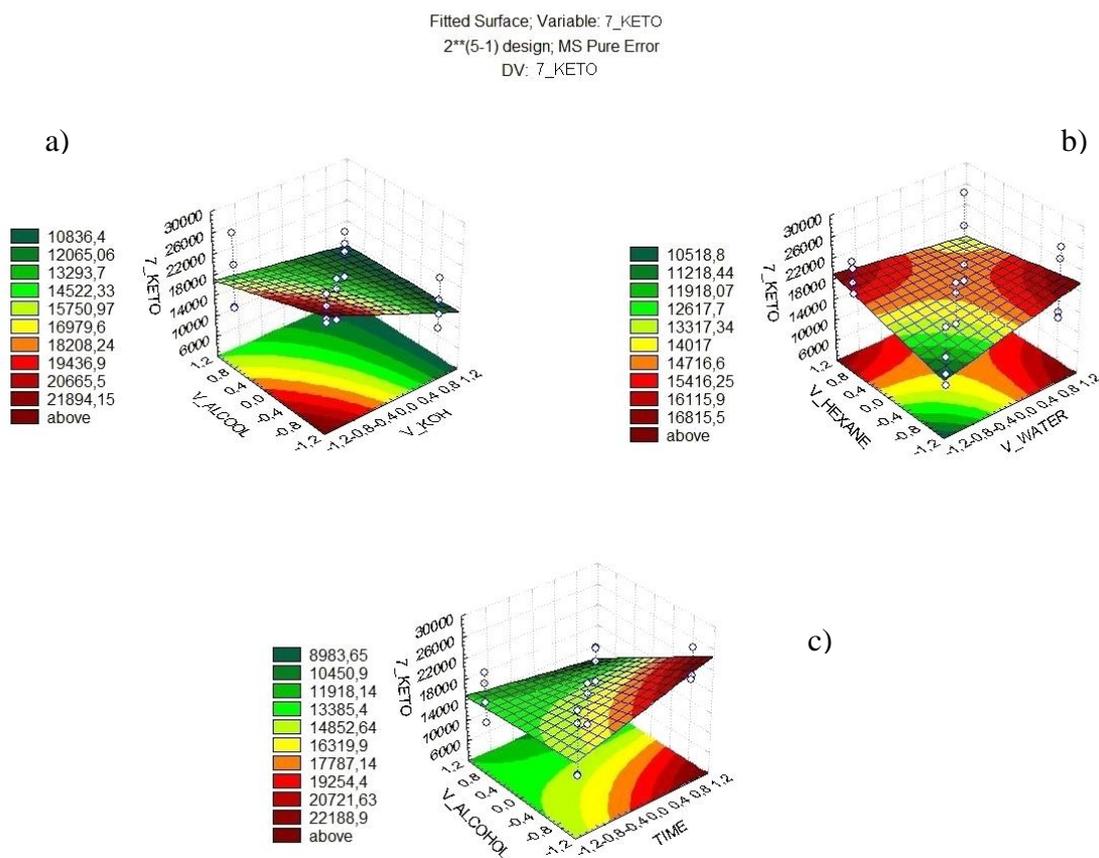
**Figura 3.** Superfícies de resposta para extração ótima do 25-hidroxicolesterol (25-OH).



Para o composto 7-cetocolesterol as superfícies de respostas para as variáveis V. KOH e V. Álcool os efeitos negativos (-1) indicaram a melhor resposta (Figura 4). Por sua vez, as variáveis V. Hexano, V. água e Tempo tenderam ao nível positivo (+1). Com isso, a condição experimental com melhores resultados tanto para o 7-cetocolesterol como para o 25-hidroxicolesterol foi idêntica ao do colesterol, o que proporciona economia de reagentes e tempo para a realização da análise, já que em uma única etapa se consegue obter os resultados de todos os compostos.

O uso do planejamento fatorial na otimização da metodologia é fundamental para o aperfeiçoamento experimental, pois estabelece quais os fatores que têm efeitos relevantes na resposta e, também, como o efeito de um fator varia com os níveis dos outros fatores. Permite ainda estabelecer e quantificar as correlações entre os diferentes fatores, possibilitando melhor compreensão do processo.

**Figura 4.** Superfícies de resposta para extração ótima do 7-cetocolesterol (7-ceto).



#### 4. CONCLUSÃO

O teste de otimização por meio da metodologia de superfície de resposta, assim como o gráfico de Pareto foram capazes de identificar a melhor condição experimental, permitindo a detecção, identificação e quantificação do colesterol e seus óxidos 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol na amostra do leite bubalino em pó por meio da cromatografia líquida de alta eficiência.

#### 5. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, B.; CHIPMAN, H.; VIJAYAN, K. Some risks in the construction and analysis of supersaturated designs. *Technometrics*, v.41, n.2, p.135-141, May, 1999.

ALINA, A. R.; SYUHADA, H.S.U.; SYAZAMAWAT, Z.H.; JUHANA, M.J.T.; MASHITOH, A.S.; SAKINAH, A.N.F.; MAWADDAH, A.H.N.; NURULHUDA, M.S. Effect of Different Cooking Methods on Formation of Cholesterol Oxidation Products in Pork and Beef. **World Applied Sciences Journal**. v. 17, p. 17-20, 2012.

AL-ROWAILY, M. A. Effect of Processing Methods on Cholesterol Contents and Cholesterol Oxides Formation in Some Dairy Products. **Saudi Journal of Biological Sciences**. v. 15, n. 1, p. 35-45, 2008.

BEZERRA, M.A.; SANTELLI, R.E.; OLIVEIRA, E.P.; VILLAR, L.S.; ESCALEIRA, L.A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, Volume 76, Issue 5, Pages 965–977, 15 September 2008.

GE, X.Y.; QIAN, H.; ZHANG, W.G. Enhancement of fructanohydrolase synthesis from *Aspergillus niger* by simultaneous in vitro induction and in vivo acid stress using sucrose ester. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.24, p.133-138, 2008.

HERZALLAH, S. M. Influence of microwaving and conventional heating of milk on cholesterol contents and cholesterol oxides formation. **Pakistan Journal of Nutrition**. v. 4, n. 2, p. 85-88, 2005.

MONTGOMERY, D.C. **Diseño y análisis de experimentos**. Trad. por Jaime Delgado Saldivar. Mexico, Iberoamérica, (1991).

MYERS RH, MONTGOMERY DC, ANDERSON-COOK CM, **Response Surface Methodology, Process and Product Optimization Using Designed Experiments**, 3rd ed., John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2009.

SINGH, J.; NANDA, A.S.; ADAMS, G.P. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.593-604, 2000.

SALDANHA, T.; MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p. 109-113, 2004.

SALDANHA, T.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; BRAGAGNOLO, N. HPLC Separation and Determination of 12 Cholesterol Oxidation Products in Fish: Comparative Study of RI, UV, and APCI-MS Detectors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 54, p.4107- 4113, 2006.

XU, Y.; LI, Y.; XU, S.; LIU, Y.; WANG, X.; TANG, J. Improvement of xylanase production by *Aspergillus niger* XY-1 using response surface methodology for optimizing the medium composition. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 9, n. 7, p. 558-566, 2008.

## CAPÍTULO III

### VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL E DOS ÓXIDOS DE COLESTEROL EM LEITE EM PÓ DE BÚFALA<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Artigo a ser submetido.

# VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DO COLESTEROL E DOS ÓXIDOS DE COLESTEROL EM LEITE EM PÓ DE BÚFALA

## RESUMO

Objetivou-se com este trabalho, validar a metodologia de extração do colesterol e dos óxidos de colesterol (OsC), 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol em leite em pó de búfala por meio da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e quantificá-los durante o tempo de armazenamento. Após diferentes testes para verificação da melhor condição para extração dos analitos, a extração do colesterol e óxidos foi realizada pela saponificação direta das amostras e posterior extração com hexano. A validação da metodologia foi realizada estudando os seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, repetitividade, precisão intermediária, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação. A metodologia foi eficaz na determinação do colesterol e seus óxidos em leite em pó de búfala, podendo ser detectados e quantificados. O tempo de armazenamento não teve efeito significativo sobre a quantidade de colesterol e dos óxidos 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol, o que justifica que o aparecimento desses óxidos pode estar relacionado com o tratamento térmico empregado na obtenção do produto.

**Palavras-chave:** cromatografia, detecção, tempo de armazenamento, quantificação.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the cholesterol extraction methodology and cholesterol oxides (OSC), 7-cetocolesterol and 25-hydroxycholesterol in buffalo milk powder by high-performance liquid chromatography (HPLC) and quantifiable them during the storage time. After various tests to check the best condition for extracting analytes, cholesterol oxides and extraction was performed by direct saponification of the samples and subsequent extraction with hexane. The validation of the methodology was carried out by studying the following analytical parameters: selectivity, linearity and range of application, repeatability, intermediate precision, recovery, detection limit and quantitation limit. The method was effective in determining cholesterol and their oxides buffalo milk powder, can be detected and quantified. The storage time had no significant effect on the amount of cholesterol oxides and

7-ketocholesterol and 25-hydroxycholesterol, which explains the appearance of these oxides can be related with the heat treatment employed in obtaining the product.

**Keywords:** chromatography, detection, quantification, storage time.

## 1. INTRODUÇÃO

O colesterol é um esteroide de origem animal, cuja estrutura química contém múltiplos anéis de hidrocarbonetos. Desempenha papel essencial na estrutura das membranas, é precursor metabólico das várias formas da vitamina D, dos hormônios esteroidais, dos ácidos biliares e, atua na digestão e absorção dos lipídios e vitaminas lipossolúveis (CONNOR & CONNOR, 2002). Situa-se na membrana que envolve o glóbulo de gordura, é introduzido no leite durante a pinocitose das gotículas lipídicas, através da membrana plasmática dentro do lúmen do alvéolo.

Outro aspecto importante relativo à presença de colesterol em alimentos está no fato comprovado de que o colesterol pode sofrer oxidação, formando óxidos de colesterol (OsC). Estes compõem um grupo de esteróis semelhantes ao colesterol, que contém um grupo funcional adicional, tal como, hidroxila, cetona, ou grupo epóxi, no núcleo do esterol ou na cadeia lateral da molécula (UBHAYASEKERA, VERLEYEN & DUTTA, 2004). As principais fontes de OsC estão presentes em nossa dieta e são encontrados em alimentos processados de origem animal como carnes, ovos, manteiga, leite em pó, queijos (O'BRIEN et al., 2000) e pescado (GUARDIOLA et al., 2002; SALDANHA et al., 2006), assim como em alimentos que em sua fabricação se utiliza manteiga, ovos ou leite em pó (ADDIS, GUARDIOLA & CODONY, 1996; GUARDIOLA et al., 2002).

A estocagem dos alimentos com exposição ao oxigênio ou à luz pode influenciar na formação de OsC, como o 7-cetocolesterol e o 25-hidroxicolesterol (MAZALLI & BRAGGAGNOLO, 2007). O leite em pó integral possui entre 26 e 40% de gordura, tornando-o um produto altamente susceptível à oxidação (LLOYD, HESS & DRAKE, 2009). A importância da oxidação do colesterol em alimentos se dá pelo fato de sua suscetibilidade química e, principalmente, em razão dos óxidos formados apresentarem propriedades biológicas deletérias, com características aterogênicas, citotóxicas, cancerígenas e mutagênicas, entre outras. Por isso, a formação desses compostos precisam ser examinadas.

O colesterol pode ser determinado por vários métodos de análise, tais como, gravimetria, colorimetria, fluorimetria e cromatografia. A cromatografia gasosa (CG) já foi a

técnica analítica mais utilizada para a quantificação do colesterol e outros esteróis. No entanto, colunas de CG são muito eficientes para a separação de colesterol, mas, por vezes, pode ocorrer a sobreposição de colesterol com outros esteróis (FENTON, 1992; DINH et al., 2011). Esta desvantagem pode ser facilmente resolvida utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), especialmente CLAE de fase reversa. Além disso, esta técnica tem a principal vantagem o uso de baixas temperaturas, evitando-se assim, a oxidação do colesterol durante sua determinação (RAMALHO, CASAL & OLIVEIRA, 2011). Com isso, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar a metodologia para determinação do colesterol e dos óxidos 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol em leite em pó de búfala por meio da análise em CLAE e avaliar se o tempo de armazenamento influenciou na formação desses compostos no leite em pó de búfala.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

A produção do leite em pó de búfala foi realizada no Centro de Desenvolvimento e Difusão de Tecnologias (CEDETEC) da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB). Após a otimização do processo de extração, foi possível verificar a melhor condição experimental para extração do colesterol e dos óxidos (7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol). A extração foi realizada em triplicata por meio da saponificação direta das amostras e posterior extração com hexano, segundo Saldanha, Mazalli e Bragagnolo (2004), com modificações no tipo e tempo da saponificação baseadas em Saldanha et al. (2006).

Para extração da matéria insaponificável das amostras de leite em pó, foram pesados aproximadamente 0,5 g de amostra e adicionados 3 mL de solução aquosa de hidróxido de potássio (KOH) (marca Vetec, Rio de Janeiro-RJ, Brasil) a 50% (p/v) e 4 mL de álcool etílico (P.A) (marca Synth, Diadema-SP, Brasil). Após agitação (agitador modelo QL- 901, marca Biomixer, USA) a 2800 rpm por 1 minuto, a mistura permaneceu em repouso durante 24 h, no escuro e à temperatura ambiente, para que se completasse a reação de saponificação. Decorrido este período, foram adicionados 6 mL de água destilada e 12 mL de hexano (P.A) (marca Synth, Diadema-SP, Brasil) e a mistura foi novamente agitada por 1 min. Após completa separação de fases, a fase hexânica foi coletada, evaporada a temperatura ambiente em evaporador rotativo (Fisatom, modelo 801, São Paulo-SP, Brasil) e o resíduo obtido diluído em 2 mL de acetonitrila e isopropano (marca Panreac, Barcelona- Espanha) na proporção de 95:5 (fase móvel).

O resíduo diluído na fase móvel foi filtrado com o uso de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (marca MN, Alemanha) com diâmetro do poro de 0,45 µm e analisado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD).

Para a análise das amostras, foi utilizado cromatógrafo líquido Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com um sistema quaternário de bombas, degaseificador, válvula de injeção com alça de amostragem de 20 L, forno de coluna e detector de arranjo de diodos. O colesterol e os óxidos, 25-hidroxicolesterol (25-OH) e 7-cetocolesterol (7-ceto), foram separados em coluna analítica de fase reversa C18 (15 cm x 6 mm d.i. x 5m) da marca Restek (Estados Unidos-EUA). Como fase móvel foram utilizados os solventes, de grau cromatográfico, acetonitrila e isopropanol na proporção de 95:5 (v/v), sendo que antes da realização das corridas cromatográficas estes eram filtrados e degaseificados.

Os parâmetros de funcionamento do cromatógrafo foram estabelecidos após verificação da condição de melhor resolução, sendo a vazão ajustada para 2 mL.min<sup>-1</sup>, a temperatura do forno de 35°C e tempo de corrida de 15 minutos. As injeções foram realizadas em duplicata e as áreas dos picos do colesterol e óxidos foram determinadas através do *software* LCSolution®.

A identificação do colesterol e dos óxidos foi realizada tentativamente por meio da comparação do tempo de retenção dos picos das amostras com o tempo de retenção dos picos dos padrões, colesterol (*Cholesterol*, cód. C8667), 7-cetocolesterol (*5-Cholesten-3β-ol-7-one*, cód. C2394) e 25-hidroxicolesterol (*25-Hydroxycholesterol*, cód. H1015), todos da Sigma-Aldrich® e também pelo comprimento de onda característico de cada substância. Os cromatogramas foram processados a 202 nm para o colesterol e 25-hidroxicolesterol e a 227 nm para o 7-cetocolesterol.

A validação do método foi realizado de acordo com a descrição fornecida por Ribani et al. (2004), estudando os seguintes parâmetros analíticos: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, repetitividade, precisão intermediária, recuperação, limite de detecção e limite de quantificação. Os resultados foram avaliados conforme recomendado pela Resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RE número 899, de 29/05/2003, que se baseia na norma internacional da IUPAC.

A seletividade foi avaliada, em triplicata, com o auxílio do detector de arranjo de diodos, comparando-se os picos dos produtos com os picos dos padrões dos analitos, verificando-se a resolução e a separação dos compostos puros. As amostras foram enriquecidas com colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol, homogeneizados, extraídos e, por fim, injetados no cromatógrafo para obtenção dos cromatogramas e espectros

de pureza dos picos. Posteriormente foi feita a comparação com os cromatogramas e espectros de pureza de cada composto, providos pela injeção de soluções dos padrões dos analitos.

Os dados obtidos das curvas analíticas foram utilizados para avaliar a linearidade e a faixa de aplicação do método. As curvas foram construídas por meio da injeção de soluções dos padrões do colesterol e dos óxidos de colesterol dissolvidos na fase móvel, nas seguintes concentrações: 25, 50, 75, 300 e 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o colesterol e 2, 5, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o 25-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol, em triplicata. A linearidade foi avaliada de acordo com a correlação de Pearson ( $R^2$ ) para regressão linear. Este parâmetro permite se estimar a qualidade da curva, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A faixa de aplicação da curva foi obtida pelo método da resposta relativa. Um gráfico foi elaborado com as respostas relativas no eixo das ordenadas e as concentrações correspondentes em escala logarítmica no eixo das abscissas. A faixa de aplicação é definida como sendo o intervalo entre os pontos onde a resposta relativa intercepta as linhas de intervalo de confiança a 95 e 105%, da faixa linear.

A precisão foi avaliada pela repetitividade (intradia) e pela intermediária (interdias), bem como também, pelos dados obtidos das curvas analíticas de cada composto, sendo para isso, calculados, ponto a ponto, a estimativa das médias e os Coeficientes de Variação (CV).

A recuperação foi avaliada, em triplicata, por meio da fortificação dos produtos com quantidades suficientes de soluções dos padrões de colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol, para obtenção das seguintes concentrações após análise: 75, 150 e 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o colesterol e 25, 50, e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para os óxidos de colesterol no leite em pó. Além da injeção de amostras controle, sem a fortificação com o padrão. Após a determinação, o valor encontrado foi decrescido do sinal expresso pela matriz sem adição do analito (amostra controle), eliminando-se, assim, interferentes da mesma. O percentual de recuperação (Rec %) foi calculado de acordo com a Equação 1:

$$Rec \% = \frac{Conc. Obtida - Conc. Controle}{Conc. Esperada} \times 100 \quad (1)$$

O Limite de Detecção (LD) e o Limite de Quantificação (LQ) foram calculados pelo método relação sinal-ruído. Neste método, é feito a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse na matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras. Dessa forma, foi

estabelecida a concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente detectada (equações 2 e 3), em que  $s$  é a estimativa do desvio padrão da coeficiente linear da equação, e  $\underline{S}$  é o coeficiente angular da curva analítica.

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{\underline{S}} \quad (2)$$

$$LQ = 10 \times \frac{s}{\underline{S}} \quad (3)$$

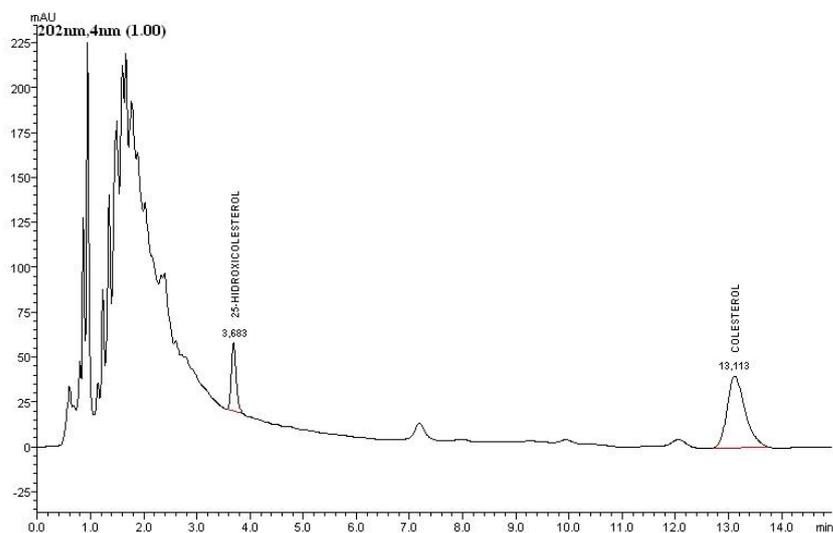
Após a validação da metodologia, as quantidades de colesterol e óxidos das amostras foram calculadas utilizando-se as equações das retas e os dados obtidos foram avaliados por meio da Análise de Regressão utilizando o Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), versão 9.1 (RIBEIRO JÚNIOR, 2007). Os modelos matemáticos foram escolhidos de acordo com a significância dos coeficientes de regressão, utilizando-se teste F a nível de 5%.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

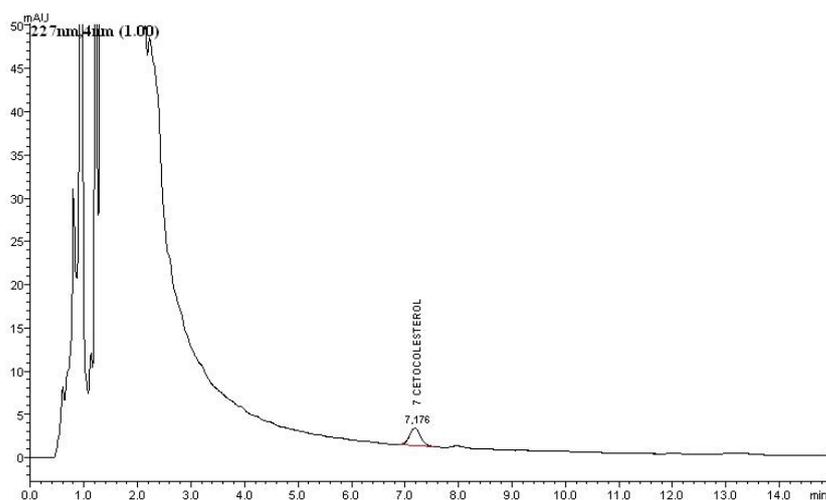
#### **3.1 Identificação dos compostos**

Com a melhor condição experimental proposta, os compostos foram identificados por meio da comparação do tempo de retenção das amostras com o padrão por cromatografia. O tempo de retenção para colesterol foi de 13,11 min e para o 25-hidroxicolesterol 3,88 min, com faixa de onda de 202 nm (Figura 1-a). Já para o óxido 7-cetocolesterol no comprimento de onda de 227 nm, o tempo de retenção para este composto foi de aproximadamente 7,17 min (Figura 1-b).

**Figura 1.** Cromatograma de amostra do leite em pó de búfala obtido por CLAE-DAD. Picos: 25-hidroxicolesterol e colesterol (a); 7-cetocolesterol (b).



a)



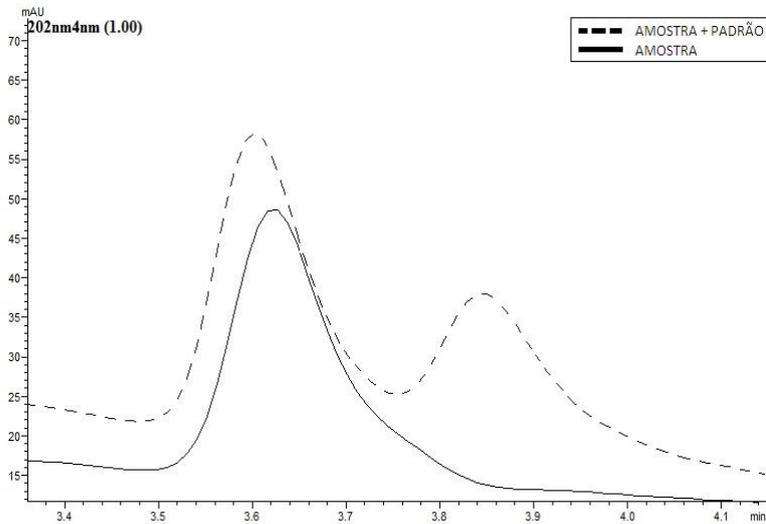
b)

## 3.2 Validação

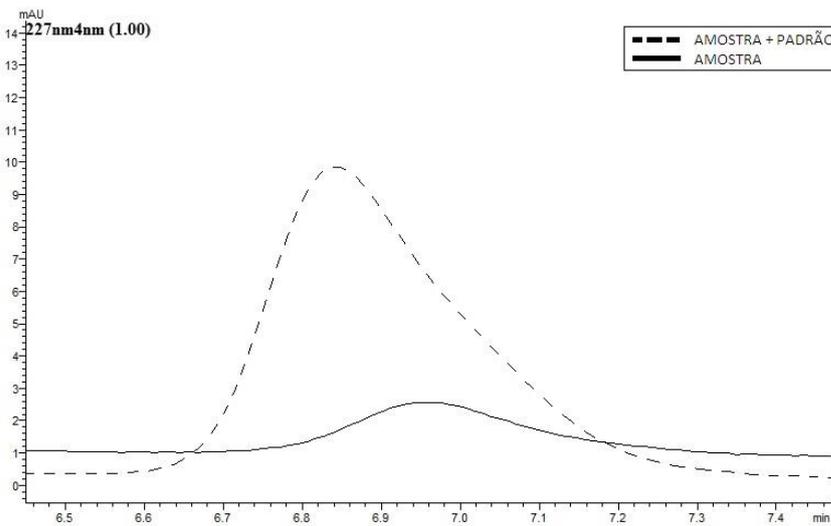
### 3.2.1 Seletividade

Os picos apresentaram boa resolução indicando a separação dos compostos puros (Figura 2) comprovando a seletividade do método. As condições cromatográficas utilizadas foram adequadas para a separação do colesterol e dos óxidos de colesterol nas amostras de leite em pó de búfala. Não foi observada nenhuma eluição de substâncias interferentes nos tempos de retenção do colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol, confirmando-se assim a seletividade do método.

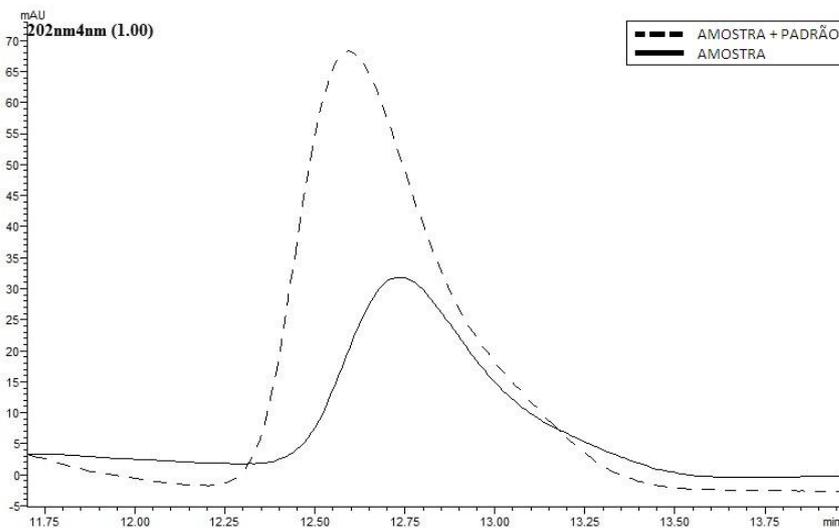
**Figura 2.** Cromatograma característico da amostra do leite em pó e espectros de pureza dos picos referentes aos óxidos e ao colesterol: (a) 25-hidroxicolesterol; (b) 7-cetocolesterol e (c) colesterol.



(a)



(b)



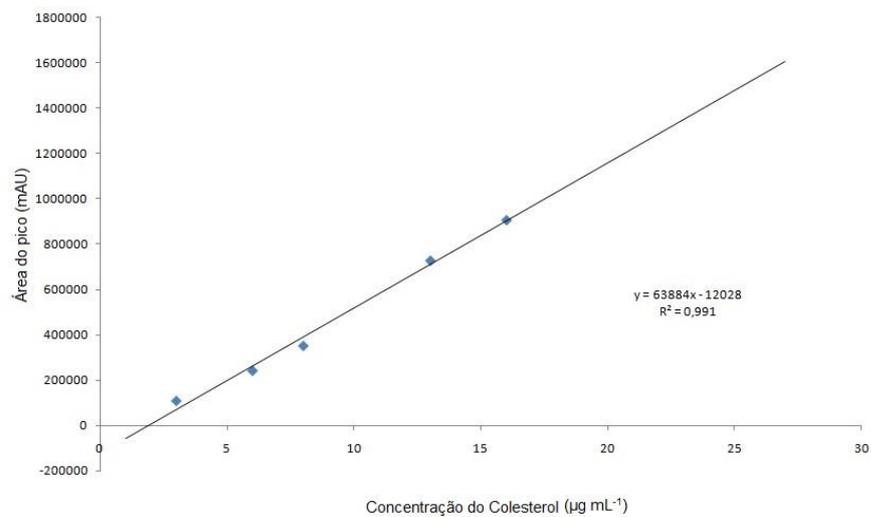
(c)

### **3.2.2 Linearidade e Faixa de aplicação**

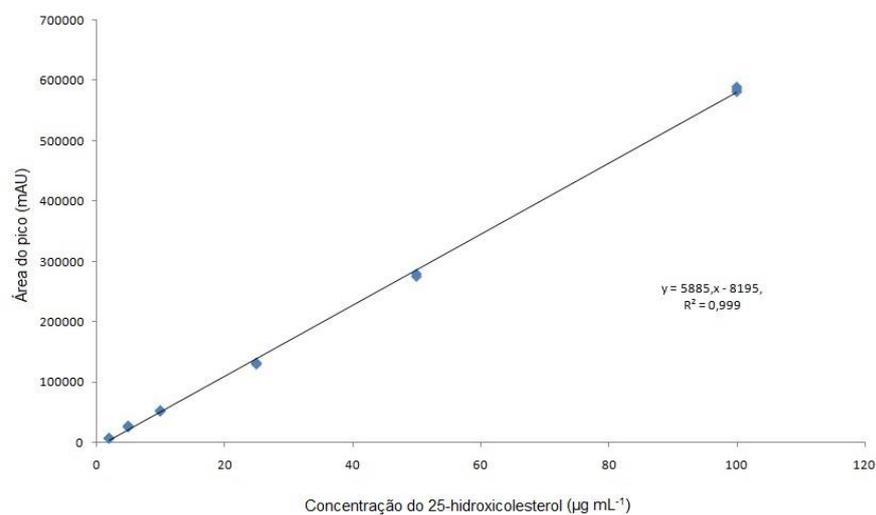
Os dados referentes à linearidade demonstram forte correlação entre as concentrações de colesterol e dos óxidos na faixa analisada e suas respectivas áreas (Figura 3).

O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) foi superior a 0,99 em todas as curvas, corroborando exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), que recomendam coeficiente de correlação igual a 0,99 ou valor acima de 0,90, respectivamente (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003). Além disso, esses resultados ratificam que o método gera resultados proporcionais à concentração das substâncias em análise, dentro da faixa específica, sendo possível relacionar a medida da área como dependente da concentração (BAUER et al., 2014).

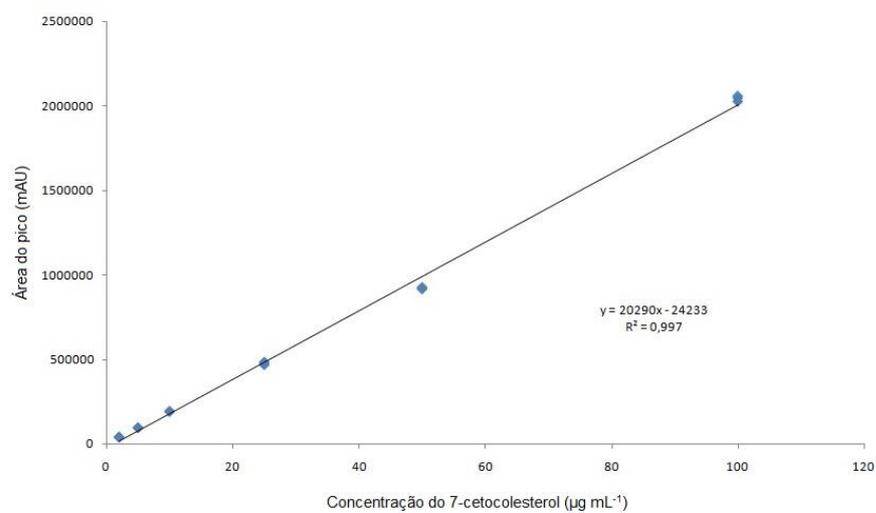
**Figura 3.** Curvas analíticas dos padrões de colesterol (a), 25-hidroxicolesterol (b) e 7-cetocolesterol (c).



a)



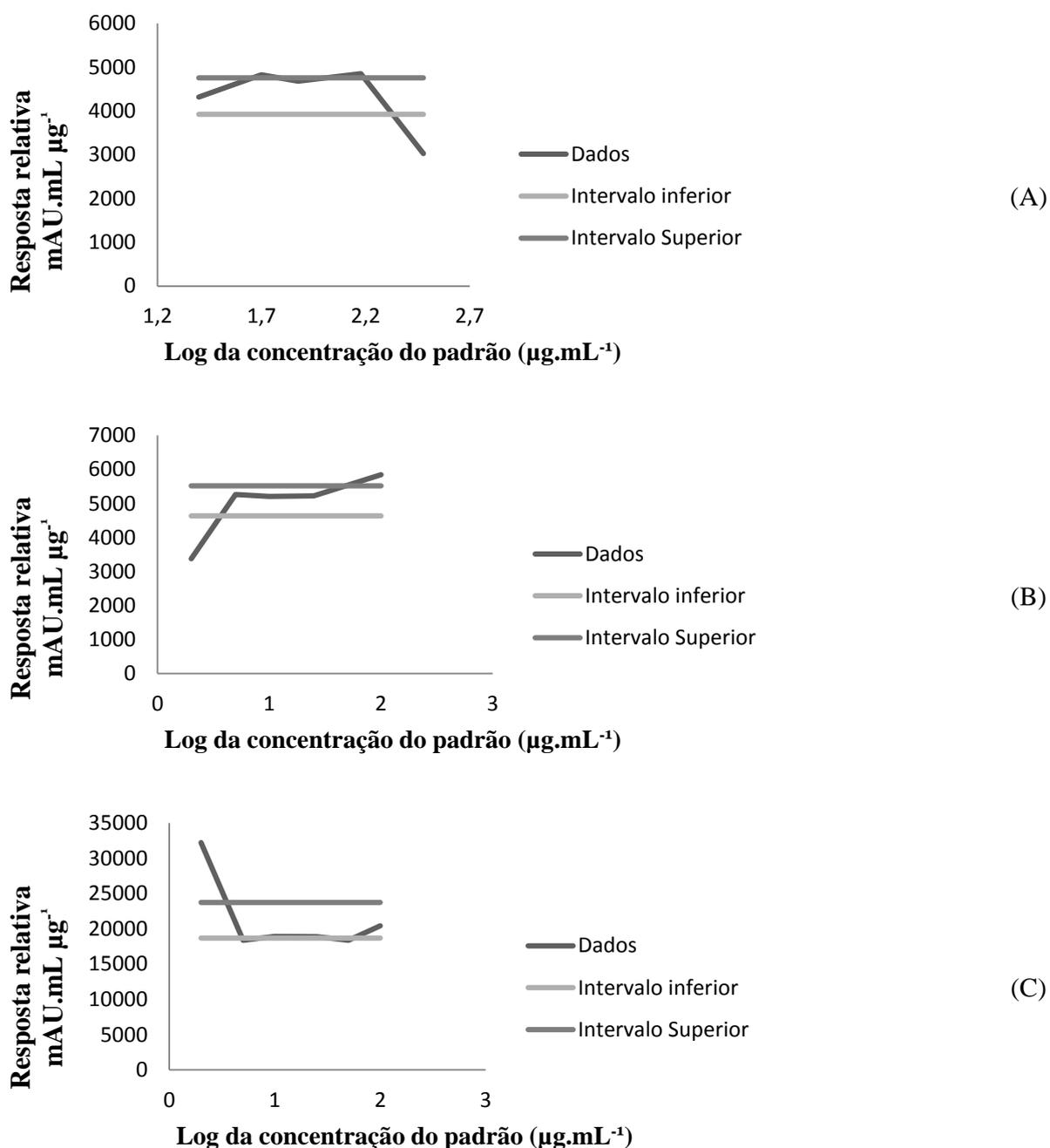
b)



c)

O estudo da faixa de aplicação para cada composto em análise foi realizado como complemento ao teste de linearidade. Foram aceitos como faixa aceitável de aplicação, intervalos de confiança inferiores e superiores a 5% entre os valores médios das injeções. Considerou-se como faixa de aplicação aceitável, os pontos em que a resposta relativa esteve entre os intervalos de confiança, inseridos entre os limites inferiores e superiores do gráfico (Figura 4).

**Figura 4.** Intervalos da Faixa de aplicação das curvas analíticas de colesterol (A), 25-hidroxicolesterol (B) e 7-cetocolesterol (C).



De acordo com a legislação brasileira, os pontos da curva analítica dentro da faixa de aplicação devem compreender uma faixa de concentração entre 80-120% do valor esperado. Isto foi confirmado para todas as curvas obtidas, já que estas foram construídas com um intervalo amplo de concentrações, variando de muito inferiores até muito superiores aos valores esperados para as amostras. Mas, para o óxido 7-cetocolesterol a faixa de aplicação foi um pouco crítica, pois esteve bem próximo do limite inferior.

### 3.2.3 Repetitividade e Precisão intermediária

Para todas as concentrações de colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol, os coeficientes de variação obtidos no estudo da repetitividade e precisão intermediária foram adequados, de acordo com o critério de aceitação da legislação brasileira, que preconiza valores de CV de até 15%, com uma variação máxima de 5% para macroconstituintes e 20% para microconstituintes, como por exemplo, os óxidos de colesterol (BRASIL, 2003). Os resultados encontrados para precisão do método analítico para os analitos encontram-se nas tabelas 1 e 2.

**Tabela 1.** Precisão do método analítico para determinação de óxidos de colesterol em leite em pó de búfala, expressa pelo coeficiente de variação.

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	7-cetocolesterol		25-hidroxicolesterol	
	Repetitividade*	Precisão Intermediária**	Repetitividade *	Precisão Intermediária **
	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)
0	6,564	3,320	2,758	2,478
25	9,376	5,708	8,851	5,530
50	4,973	6,167	6,442	4,719
75	5,627	3,722	6,599	3,722

\*n = 6; \*\*n = 12.

Em estudo realizado também com leite de outra espécie foram encontrados valores de CV menores que o permitido pela legislação. Bauer et al. (2014) também utilizando um sistema CLAE-DAD para quantificar o colesterol, 7-cetocolesterol e 25-hidroxicolesterol em leite de vaca, obtiveram CV de 1,81 a 16,99% para repetitividade. Daneshfar, Khezeli e Lotfi (2009) em validação de metodologia para quantificação do colesterol em amostras de leite por CLAE-UV obtiveram CV inferiores a 5%.

Essas informações contribuem para a confirmação da precisão da metodologia proposta para a análise de colesterol e óxidos nas amostras de leite em pó de búfala.

**Tabela 2.** Precisão do método analítico para determinação de colesterol em leite em pó de búfala, expressa pelo coeficiente de variação.

Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Colesterol	
	Repetitividade *	Precisão Intermediária**
	CV (%)	CV (%)
0	6,308	5,624
100	2,743	5,033
200	6,901	4,041
300	7,828	4,124

\*n = 6; \*\*n = 12.

### 3.2.4 Limite de Detecção e Quantificação

Os limites de detecção e quantificação obtidos, foram respectivamente, 15,96 e 48,37  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o colesterol; 1,79 e 5,96  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o 7-cetocolesterol; e 1,04 e 3,48  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para o 25-hidroxicolesterol. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) são respectivamente, a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, e a menor concentração da substância em exame que pode ser quantificada com precisão garantida sob as condições experimentais estabelecidas (ICH, 1995; INMETRO, 2003). Resultados semelhantes foram encontrados por Bauer et al. (2014) ao utilizarem um sistema de HPLC similar ao desse estudo para determinação de óxidos de colesterol em leite e queijo, encontraram LD de 1,35 e LQ de 4,10  $\text{g.mL}^{-1}$  para o 7-cetocolesterol. Porém, estudos realizados por outros autores encontraram diferentes resultados. Ao analisarem a quantidade de colesterol em produtos cárneos Stroher et al (2012) encontraram limite de detecção equivalente a 0,005  $\text{mg.g}^{-1}$  e limite de quantificação de 0,016  $\text{mg.g}^{-1}$ .

Os diferentes métodos empregados na preparação das amostras podem provocar estas diferenças nos resultados. A obtenção de índices menores, para uma mesma metodologia, indica uma maior sensibilidade do aparelho utilizado. Os diferentes sistemas de HPLC utilizados para a análise das amostras, bem como também as variadas formas para o cálculo dos limites não influenciaram na determinação do colesterol das amostras no respectivo estudo, pois o leite em pó apresenta maiores concentrações deste composto. Já para os óxidos, esses índices podem ser reduzidos melhorando-se as condições operacionais, no que diz

respeito à estabilidade elétrica do sistema cromatográfico, já que a mesma influencia diretamente na relação sinal-ruído do equipamento, como também interfere nos desvios das respostas analíticas (BAUER et al., 2014).

### 3.2.5 Ensaio de Recuperação

Os resultados do ensaio de recuperação comprovam a eficiência do método proposto para a análise do colesterol e dos óxidos de colesterol no leite em pó de búfala (Tabela 3). Para o óxido 7-cetocolesterol os valores encontrados para todas as concentrações ficaram abaixo dos níveis relatados (70-120%) (LANÇAS, 2004). Porém, dependendo da complexidade analítica e da amostra, valores menores também são aceitáveis, sendo aceito um coeficiente de variação de até 5% e que a recuperação seja consistente, precisa e reprodutiva (BRASIL, 2003).

**Tabela 3.** Resultados dos ensaios de recuperação (%) do colesterol e dos seus óxidos na amostra do leite em pó de búfala.

Colesterol adicionado ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Recuperação (%) $\pm$ DP*	CV (%)*
75	65,86 $\pm$ 0,43	0,66
150	74,25 $\pm$ 1,61	2,17
300	75,42 $\pm$ 3,25	4,30
25-hidroxicolesterol adicionado $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )		
25	85,19 $\pm$ 2,93	3,44
50	78,39 $\pm$ 2,47	3,15
100	79,76 $\pm$ 3,42	4,28
7-cetocolesterol adicionado ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )		
25	31,73 $\pm$ 0,43	1,37
50	29,06 $\pm$ 0,37	1,28
100	25,57 $\pm$ 1,15	4,51

\*n= 9; DP= desvio padrão; CV= coeficiente de variação.

O baixo percentual de recuperação do 7-cetocolesterol foi uma dificuldade encontrada durante o experimento, indicando a impossibilidade da quantificação deste composto com confiabilidade. Dessa forma os resultados observados neste estudo podem estar relacionados à matriz estudada (leite em pó de búfala) ou as condições experimentais, visto que Bauer et al. (2014) estudando óxidos de colesterol em leite fluido de vaca relataram teor de recuperação variando entre 70 e 72%.

No entanto, os resultados observados na precisão tanto para repetitividade (intradia) quanto para precisão intermediária (interdias), indicam que as condições analíticas foram apropriadas (Tabelas 1 e 2) e que mesmo com baixo percentual de recuperação a quantificação pode ser realizada, desde que a precisão seja adequada (BRASIL, 2003), o que foi observado neste estudo.

### 3.3 Quantificação do colesterol e óxidos de colesterol no leite em pó de búfala

Os valores médios obtidos para o colesterol e seus óxidos 25-hidroxicolesterol (25-OH) e 7-cetocolesterol podem ser observados na Tabela 4. Verifica-se que a quantidade do 25-OH foi quatro vezes maior que a do colesterol, o que demonstra a ocorrência da oxidação do colesterol. Já com relação a quantidade do 7-cetocolesterol, pode-se observar que a formação desse composto na amostra foi pequena.

**Tabela 4.** Quantidade de colesterol e 25-hidroxicolesterol em mg por 100g de leite em pó de búfala.

Compostos	Tempos de armazenamento (dias)					Modelo	
	0*	21*	42*	63*	84*	L	Q
Colesterol	4,29	6,42	6,29	5,88	7,98	0,08	0,94
25-hidroxicolesterol	16,67	15,07	15,29	15,18	18,94	0,53	0,24
7-cetocolesterol	0,79	0,93	1,02	0,98	1,11	0,28	0,62

\*Médias das amostras de leite em pó de búfala; F-teste:  $p < 0,05$ ; Modelos: L-Linear, Q-Quadrático.

A temperatura de processamento, tempo de armazenamento, a luz, e a presença de oxigênio, entre outros, podem levar a formação de OsC em leite durante processamento ou armazenamento (MORALES-AIZPURÚA & TENUTAFILHO, 2002; OBARA, OBIEDZINSKI & KOLCZAK, 2006; HUR, PARK & JOO, 2007).

A temperatura utilizada na secagem do leite por spray dryer foi de 140°C (entrada) e 80°C (saída). Tratamentos térmicos de leite acima de 120°C produz oxidação do colesterol (OSADA et al., 1993), assim os resultados observados neste estudo podem estar relacionados com o processamento térmico, ou seja, a temperatura utilizada no processo de secagem do leite.

Outro fator a ser considerado é o tempo de armazenamento que pode elevar a oxidação do colesterol (CHAN et al., 1993), porém, o mesmo não apresentou influencia nas amostras

do leite em pó de búfala, indicando dessa forma que as condições de estocagem foram apropriadas.

O prazo de validade do leite em pó integral é de 12 meses, mas no presente trabalho só foi avaliado o período de 84 dias de armazenamento, que equivale a quase 3 meses de validade. Estudos realizados por Chan et al. (1993), verificaram que após 6 meses de armazenamento, as amostras de leite em pó de vaca apresentaram aumento nas concentrações dos óxidos de colesterol (7-cetocolesterol, 7 $\alpha$ -hidroxicolesterol, 7 $\beta$ -hidroxicolesterol e os 5,6-colesterol-epóxidos). Com isso, um período maior de análise poderá contribuir para uma investigação mais detalhada na formação desses óxidos.

A exposição do colesterol a altas temperaturas por um período relativamente longo na presença de oxigênio pode iniciar a formação de radicais livres, promovendo a sua oxidação. Com isso, deverá ser realizado um estudo mais aprofundado sobre a temperatura empregada na tecnologia de secagem do leite em spray dryer, avaliando as diferentes temperaturas de entrada e saída do processo, para minimizar o aparecimento desses OsC.

#### 4. CONCLUSÃO

A metodologia proposta foi eficiente na determinação do colesterol e dos óxidos 25-hidroxicolesterol e 7-cetocolesterol na amostra do leite em pó de búfala.

As quantidades do colesterol e dos óxidos presentes nas amostras, não foram influenciadas pelo tempo de armazenamento, o que sugere que as concentrações dos OsC podem estar relacionadas com o grau de tratamento térmico empregado na obtenção do produto em pó.

#### 5. REFERÊNCIAS

ADDIS, P.B.; GUARDIOLA, F.; CODONY, R. Analysis and health effects of cholesterol oxides. Food Lipids and Health. **New York: Marcel Dekker Inc.**, p.473, 1996.

BAUER, L. C.; SANTANA, D. de A.; MACEDO, M.S.; TORRES, A.G.; SOUZA, N.E.; SIMIONATO, J.I. Method Validation for Simultaneous Determination of Cholesterol and Cholesterol Oxides in Milk by RP-HPLC-DAD. **Journal Brazilian Chemical Society**. v. 25, n. 1, p. 161-168, 2014.

BRASIL. ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, 02 de junho de 2003. **Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos**. Brasília: 2003.

CHAN, S.H.; CINZA, J.I.; GOMAA, E.A.; HARTE, B.R.; KELLY, P.M.; BUCKLEY, D.J. Cholesterol oxidation in whole milk powders as influenced by processing and packaging. **Food Chemistry**, Volume 47, Issue 4, Pages 321–328, 1993.

CONNOR, W.E.; CONNOR, S.L. Dietary cholesterol and coronary heart disease. **Current Atherosclerosis Reports**, 4, p. 425–432, 2002.

DANESHFAR, A.; KHEZELI, T.; LOFTI, H. J. Determination of cholesterol in food samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-UV. **Journal of Chromatography B**, n. 877, p. 456-460, 2009.

DINH, T.T.N.; THOMPSON, L.D.; GALYEAN, M.L.; BROOKS, J.C.; PATTERSON, K.Y.; BOYLAN, M. Cholesterol content and methods for cholesterol determination in meat and poultry **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 10, p.269–289, 2011.

FENTON, M. Chromatographic separation of cholesterol in foods. **Journal of Chromatography**, p.369–388, 624 (1992).

GUARDIOLA, F.; DUTTA, P.C.; CODONY, R.; SAVAGE, G.P. Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects. **Champaign: AOCS Press.**, p.394, 2002.

HUR, S.J.; PARK, G.B.; JOO, S.T. Formation of cholesterol oxidation products (COPs) in animal products. **Food Control**, v. 18, p. 939-947, 2007.

ICH. International Conference on Harmonisation. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**, Q2B (CPMP/ICH/281/95), 1995.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**, DOQ-CGCRE-008, 2003.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**. São Carlos: Ed. RiMa, p.62, 2004.

LLOYD M.A.; HESS, S.J.; DRAKE, M.A. Effect of nitrogen flushing and storage temperature on flavor and shelf-life of whole milk powder. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 92. p. 2409-2422, 2009.

MAZALLI, M.R.; BRAGAGNOLO, N. Validation of two methods for fatty acids analysis in eggs. **Lipids**, v.42, p.483-490, 2007.

MORALES-AIZPURÚA, I. C.; TENUTA-FILHO, A. Óxidos de colesterol: ocorrência em alimentos, formação e efeitos biológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.38, n.4, p.431-442, 2002.

OBARA, A.; OBIEDZINSKI, M.; KOLCZAK, T. The effect of water activity on cholesterol oxidation in spray- and freeze-dried egg powders. **Food Chem.**, v. 95, p. 173-179, 2006.

O'BRIEN, N.M.; O'CALLAGHAN, Y.C.; LYONS, N.M.; WOODS, J.A. Biological effects of dietary cholesterol oxidation products. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, Dublin, v. 39, p. 265-273, 2000.

- OSADA, K.; KODAMA, T.; YAMADA, K.; SUGANO, M. Oxidation of Cholesterol by Heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 41, p. 1198-1202, 1993.
- RAMALHO, H.M.M.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Total cholesterol and desmosterol contents in raw, UHT, infant formula powder and human milks determined by a new fast micro-HPLC method. **Food Analytical Methods**, p.424–430, 4 (2011).
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, 27, 771-780, 2004.
- RIBEIRO JÚNIOR, J. I. **Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG)**; Versão 9.1; Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2007.
- SALDANHA, T.; MAZALLI, M. R.; BRAGAGNOLO, N. Avaliação comparativa entre dois métodos para determinação do colesterol em carnes e leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.1, p. 109-113, 2004.
- SALDANHA, T.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; BRAGAGNOLO, N. HPLC Separation and Determination of 12 Cholesterol Oxidation Products in Fish: Comparative Study of RI, UV, and APCI-MS Detectors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 54, p.4107- 4113, 2006.
- STROHER, G. L.; RODRIGUES, A. C.; DIAS, L. F.; PEDRÃO, M. R.; PAULA, L. N. de; VISENTAINER, J. V.; SOUZA, N. E. de. Comparative Analysis and Validation Methodologies of GC and HPLC for Analysis of Cholesterol in Meat Products. **American Journal of Analytical Chemistry**, n. 3, p. 306-311, 2012
- UBHAYASEKERA, S. J. K. A.; VERLEYEN, T.; DUTTA, P. C. Evaluation of GC and GC-MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. **Food Chemistry**, v. 84, p. 149-157, 2004.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A condição do experimento buscou alternativas para a resolução de dificuldades tecnológicas na produção de leite de búfalas no sentido de sanar perdas econômicas observadas no setor. Dessa forma algumas considerações merecem destaque:

1. O uso da tecnologia de secagem por atomização em spray dryer pode contribuir com o fortalecimento da indústria láctea bubalina podendo auxiliar na resolução da sazonalidade da produção de leite da referida espécie.
2. O processamento de alimentos pode resultar em perdas nutricionais, o que demonstra a importância de estudos que avaliem as diversas tecnologias disponíveis utilizadas na indústria alimentícia, dentre estas, a secagem por atomização em spray dryer. Um fator importante no processamento de alimentos é que o mesmo não determine alterações substanciais na composição do alimento. Nesse sentido, este estudo deixou claro que o emprego da secagem pode ser utilizado na produção do leite em pó de búfalas sem que a fração lipídica sofra alterações.
3. Outro fator observado com este estudo foi a necessidade da otimização das condições de tratamento térmico que busquem identificar as temperaturas ideais na produção do leite em pó de búfalas.
4. A realização de novos estudos é necessária no sentido de se aperfeiçoar os dados obtidos neste trabalho que possam contribuir com o desenvolvimento de legislação federal específica que garanta a qualidade do leite de búfala tanto na forma in natura quanto processado.