

## Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fórmulas infantis comerciais

### *Stability of polyunsaturated fatty acids in commercial infant formulas*

#### Autores | Authors

✉ **Mahyara Markievicz Mancio KUS**

Universidade de São Paulo (USP)  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Rua Boa Vista, 128  
CEP: 08717-140  
Mogi das Cruzes/SP - Brasil  
e-mail: mahyarakus@yahoo.com.br

**Sabria AUED-PIMENTEL**

Instituto Adolfo Lutz (IAL)  
Laboratório de Cromatografia  
e-mail: spimente@ial.sp.gov.br

**Jorge MANCINI-FILHO**

Universidade de São Paulo (USP)  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
e-mail: jmancini@usp.br

✉ Autor Correspondente | Corresponding Author

Recebido | Received: 07/10/2009  
Aprovado | Approved: 04/02/2011

#### Resumo

A oxidação lipídica tem sido extensivamente estudada devido às alterações provocadas nos alimentos, as quais têm implicações indesejadas na saúde humana. Dentre as alterações ocorridas, destacam-se a perda dos ácidos graxos essenciais, a formação de ácidos graxos *trans* e a formação de compostos voláteis responsáveis pelas alterações sensoriais dos produtos alimentícios e de outros compostos não voláteis, que podem ser potencialmente tóxicos. No caso de fórmulas infantis, o aumento do conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, a fortificação mineral, os tratamentos tecnológicos e o período de estocagem podem acelerar o processo de oxidação lipídica. O objetivo deste estudo foi avaliar a estabilidade de ácidos graxos poli-insaturados – linoleico,  $\alpha$ -linolênico, araquidônico e docosahexaenoico – em 14 fórmulas infantis comerciais por oito meses. Adicionalmente, avaliou-se a formação dos ácidos graxos *trans* no período de estudo. A determinação dos lipídios totais das amostras seguiu o método de Rose Gottlieb e a quantificação dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, utilizando-se o éster metílico do ácido tricosaenoico (23:0) como padrão interno. A maioria das amostras não apresentou degradação dos ácidos graxos no período de um mês, mas ao final do estudo (oito meses), 11 das 14 amostras apresentaram diminuição do conteúdo dos ácidos graxos poli-insaturados. Observou-se o aumento dos ácidos graxos *trans* com o armazenamento, para algumas amostras. Os resultados indicam a necessidade de maior atenção na utilização das fórmulas infantis quando próximo o prazo de validade, pois os ácidos graxos poli-insaturados são degradados e o valor nutricional do produto poderá ser modificado.

**Palavras-chave:** Ácido graxo poli-insaturado; Oxidação lipídica; Estabilidade oxidativa; Fórmula infantil.

#### Summary

Lipid oxidation has been extensively studied because it can promote changes in food which have undesirable implications on human health. The main changes are a loss of essential fatty acids, formation of *trans* fatty acids, formation of volatile compounds responsible for sensory alterations and the formation of other non-volatile products which may be potentially toxic. In infant formulas, the increasing content of long-chain polyunsaturated fatty acids, mineral fortification, technological treatments and the storage period can all accelerate lipid oxidation. The aim of this study was to evaluate the stability of the polyunsaturated fatty acids, i.e. linoleic,  $\alpha$ -linolenic, arachidonic and docosahexaenoic in 14 commercial infant formulas for 8 months. In addition, the formation of *trans* fatty acids during the period studied was evaluated. The total lipid contents of the samples were determined using the Rose Gottlieb method, and the fatty acids were quantified by gas chromatography with a flame ionization detector, using the tricosanoic acid methyl ester (23:0) as the internal standard. Most of the samples showed no fatty acid degradation within the first month, but by the end of the study (8 months) 11 of the 14 samples showed decreased polyunsaturated fatty acid contents. Some samples showed increased *trans* fatty acid contents during storage. The results indicated the need for greater attention with respect to the use of infant formula near the expiration date, since the polyunsaturated fatty acids are degraded and the nutritional value can be modified.

**Key words:** Polyunsaturated fatty acid; Lipid oxidation; Stability; Infant formula.

## Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fórmulas infantis comerciais

KUS, M. M. M. et al.

### 1 Introdução

Os ácidos graxos essenciais (AGE) compõem uma classe de moléculas que não podem ser geradas pelo organismo, devido à carência de enzimas dessaturases e hidrogenases. A ausência de tais nutrientes na dieta está associada a síndromes que podem levar à morte. O ácido essencial linoleico (LA, 18:2  $\omega$ -6) e o  $\alpha$ -linolênico (ALA,  $\omega$ -3) são sintetizados exclusivamente pelo reino vegetal (POMPÉIA, 2002; VAZ et al., 2006). Estes ácidos graxos podem ser modificados pelos mamíferos, com alongamento da cadeia, inserção de insaturações e descarboxilação de pares da cadeia, originando os ácidos graxos de cadeia longa (AGPI-CL), sendo o ácido eicosapentaenoico (EPA - 20:5,  $\omega$ -3) e o ácido docosahexaenoico (DHA - 22:6,  $\omega$ -3) produtos do metabolismo do ALA e o ácido araquidônico (ARA - 20:4,  $\omega$ -6), do metabolismo do LA (HIRAYAMA et al., 2006). O ARA, o EPA e o DHA são precursores da síntese de eicosanoides. Os que são produzidos pelos ácidos graxos (AG)  $\omega$ -6 são mediadores bioquímicos potentes envolvidos na inflamação, na infecção, na lesão tecidual, na modulação do sistema imune e na agregação plaquetária. Por outro lado, os eicosanoides formados a partir dos ácidos graxos da série  $\omega$ -3 atuam no processo anti-inflamatório e não inibem o sistema imune (HIRAYAMA et al., 2006; LUNN et al., 2006).

O lactente não tem a capacidade de sintetizar os AGPI-CL através de seus precursores, devido à imaturidade hepática, tendo sua necessidade suprida pelo leite materno (KOLETZKO et al., 2003; SILVA et al., 2007).

ARA e DHA são os principais componentes da membrana fosfolipídica das células do sistema nervoso central. Os AGPI-CL são rapidamente absorvidos no cérebro durante o seu período de desenvolvimento, que compreende o último trimestre de gravidez até aproximadamente 2 anos de idade. Embora o maior acúmulo de AGPI-CL ocorra no período pré-natal, durante o pós-natal o acúmulo também é acentuado e se dá principalmente por meio da amamentação. Estes AG atuam sobre o crescimento, a funcionalidade e a integridade do cérebro. Portanto, uma suplementação inadequada de micronutrientes essenciais nesse período pode comprometer a função cerebral durante toda a vida (HIRAYAMA et al., 2006; CARVER, 2003; AUESTAD et al., 2003).

A oxidação lipídica tem recebido uma atenção especial, por suas implicações indesejadas na saúde humana e por sua contribuição para o decréscimo do valor nutricional dos alimentos. Este processo pode ocorrer por diferentes rotas (fotooxidação, termoxidação e autooxidação), sendo que todas geram componentes que afetam a qualidade do produto (ROMEU-NADAL et al., 2007). Como consequência, ocorrem mudanças no

paladar e no odor dos produtos alimentícios, sendo a oxidação lipídica a principal responsável pela deterioração durante o processamento e a estocagem de alimentos ricos em lipídios (VELASCO et al., 2008). A autooxidação é o principal mecanismo de oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados, ocorrendo por um processo em cadeia, que envolve a reação do oxigênio com os ácidos graxos. A iniciação compreende a formação de radicais livres em condições favorecidas por luz e calor. Na etapa de propagação, são formados peróxidos e hidroperóxidos. Estes compostos instáveis são rapidamente decompostos na presença de elementos traços (minerais, como cobre, ferro e magnésio), formando radicais, tais como alcoxila e alquila; subsequentemente, forma-se uma grande gama de produtos secundários de oxidação, incluindo aldeídos, cetonas e compostos carboxilados (etapa de terminação), os quais podem degradar os alimentos (MADUKO et al., 2008).

Produtos derivados da oxidação de ácidos graxos insaturados, como do ácido linoleico (LA), são tóxicos para as células humanas, podendo causar sérios problemas de saúde (MANGLANO et al., 2005).

Durante a preparação comercial da maioria das fórmulas infantis, uma parte da gordura do leite é substituída por uma mistura de óleos vegetais, adicionados para propiciar uma composição de ácidos graxos, principalmente ácido linoleico e  $\alpha$ -linolênico, próxima à do leite materno. As matérias-primas componentes das fórmulas infantis são misturadas, pasteurizadas, homogeneizadas, concentradas e secas ou esterilizadas pelos fabricantes para assegurar que estes produtos tenham boa qualidade e longa vida de prateleira, podendo os citados processos interferir no conteúdo de AGPI-CL, através de possíveis oxidações. (CHÁVEZ-SERVÍN et al., 2009). Adicionalmente, a formação de ácidos graxos *trans* pode ser um indicativo de oxidação lipídica, pois as insaturações dos ácidos graxos durante os processos dependentes de tempo/ temperatura podem ser rearranjadas em diferentes conformações (RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2007). Tem sido demonstrado que os óleos poli-insaturados, matérias-primas das fórmulas infantis, podem conter quantidades consideráveis de ácidos graxos *trans*, os quais, quando consumidos em excesso, são prejudiciais à saúde (AUED-PIMENTEL et al., 2009).

Muitas fórmulas infantis à base de leite são suplementadas com ácidos graxos poli-insaturados, tais como o ácido araquidônico (20:4,  $\omega$ -6) (ARA) e o ácido docosahexaenoico (22:6,  $\omega$ -3) (DHA). Teores adequados destes ácidos graxos são obtidos pela adição de alimentos fontes de lipídios insaturados, como os óleos de peixe e os óleos obtidos de algas e fungos. Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa são mais suscetíveis à oxidação do que o ácido linoleico (18:2,  $\omega$ -6)

## Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fórmulas infantis comerciais

KUS, M. M. M. et al.

(LA). Porém, este é o principal ácido graxo insaturado nas fórmulas infantis (RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2007; CHÁVEZ-SERVÍN et al., 2009). Durante o processamento, são adicionados às fórmulas infantis componentes como ácido ascórbico, tocoferóis e sais de ferro, entre outros, para agregar valor nutricional ou agir como antioxidante. As fórmulas infantis incluem, em sua composição, minerais e vitaminas com efeitos anti e pró-oxidantes. O enriquecimento simultâneo da fórmula infantil com quantidades relativamente altas de ácido ascórbico e ferro – combinação com efeitos pró-oxidantes – pode aumentar a sua susceptibilidade à oxidação lipídica, com formação de compostos não voláteis que são prejudiciais à saúde. (MANGLANO et al., 2005; ROMEU-NADAL et al., 2007).

Portanto, o aumento do conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa e a fortificação mineral paralela, bem como os tratamentos tecnológicos e o período de estocagem, podem conduzir à modificação oxidativa, com subsequente perda dos ácidos graxos essenciais, formação de ácidos graxos *trans*, liberação de compostos voláteis responsáveis pela rancificação e pela formação de compostos não voláteis que são prejudiciais à saúde. (RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2007). No caso das fórmulas infantis (FI), esta perda nutricional pode ser crítica, comprometendo o desenvolvimento infantil e, em especial, o cerebral e o visual (SMITHERS et al., 2008; TANAKA et al., 2009). Tendo em vista as implicações à saúde dos lactentes, pelo fornecimento inadequado dos AGP na sua alimentação, o objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade do ácido linoleico, do ácido  $\alpha$ -linolênico, do ácido araquidônico, do ácido docosahexaenoico e a formação de ácidos graxos *trans* em fórmulas infantis comerciais, armazenadas por um período de oito meses.

## 2 Material e métodos

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Amostras

Foram analisadas 14 amostras de fórmulas infantis (FIs), sendo sete de fórmulas infantis comerciais recomendadas para lactentes de 0 a 6 meses (FI 1, FI 3, FI 4, FI 6, FI 8, FI 11 e FI 13), cinco de fórmulas infantis de seguimento recomendadas para lactentes de 6 a 12 meses (FI 2, FI 5, FI 7, FI 12 e FI 14) e duas de fórmulas infantis para lactentes prematuros (FI 9 e FI 10). Todas as fórmulas infantis analisadas eram à base de leite de vaca. As amostras FI 1, FI 2, FI 9, FI 10, FI 13 continham adição de ARA e DHA e a amostra FI 14 continha apenas adição de DHA. As fórmulas infantis foram obtidas do comércio do Estado de São Paulo e fabricadas nos países Brasil, México, Holanda e Argentina. As FIs, de acordo com a rotulagem, apresentaram fontes diversas de lipídios,

sendo, principalmente: leite desnatado, leite integral, oleína de palma, óleo de girassol, óleo de soja, óleo de coco, óleo de canola, óleo de milho, óleo de peixe, entre outros. Estes componentes estavam declarados na lista de ingredientes dos rótulos dos produtos.

#### 2.1.2 Reagentes e padrões

Os solventes e reagentes utilizados para as etapas de extração de gordura e preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram de grau analítico: éter de petróleo, éter etílico, etanol a 95%, hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, sulfato de sódio e hidróxido de sódio. Foram também utilizados os seguintes solventes de grau cromatográfico: n-hexano e metanol.

Para identificar os componentes, foram utilizados: uma mistura com quantidades certificadas de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos, variando de 4:0 a 24:0, marca Supelco; uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos dos isômeros *cis-trans* do ácido linoleico (18:2) e ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3), marca Sigma, e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos individuais, marca Sigma, sendo: elaídico (18:1 9t); vacênico (18:1 11c); *trans* vacênico (18:1 11t); (18:1 7c); (18:1 12c); CLA (18:2 9c,11t e 18:2 10t,12c); palmitoelaídico (16:1 9t), palmítico (16:0); linolelaídico (18:2 9t,12t); EPA (20:5 5c,8c,11c,14c,17c); araquidônico (20:4 5c,8c,11c,14c), e docosahexaenoico (22:6 4c,7c,10c,13c,16c,19c). Foi utilizado, para quantificação dos ácidos graxos poli-insaturados e *trans*, o padrão cromatográfico de éster metílico de ácido graxo 23:0, marca Sigma.

## 2.2 Métodos

#### 2.2.1 Ensaio de estabilidade

Foi realizada a análise dos ácidos graxos por cromatografia gasosa, na abertura do produto, depois de um mês e, em seguida, de três em três meses, completando assim oito meses. As fórmulas infantis, na abertura da sua embalagem, foram separadas em porções e armazenadas em sacos plásticos, em atmosfera inerte (nitrogênio) e acondicionadas em sua embalagem original, em temperatura ambiente, sendo que para cada nova rodada uma embalagem era utilizada.

#### 2.2.2 Determinação dos lipídios e ácidos graxos

A extração e a quantificação dos lipídios das amostras de fórmula infantil foram realizadas de acordo com Rose Gottlieb (HORWITZ, 2005), método oficial para este tipo de alimento, segundo o compêndio de métodos da Association of Official Analytical Chemistry – AOAC (HORWITZ, 2005). A derivatização dos ácidos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada segundo Hartman e Lago (1973), modificado por Maia e

## Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fórmulas infantis comerciais

KUS, M. M. M. et al.

Amaya-Rodrigues (1993). Os ésteres metílicos foram separados em coluna de sílica fundida (SP 2560) de 100 m, instalada em cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama (CG/DIC) da marca Shimadzu e modelo 17A. Foram empregadas as seguintes condições: temperatura do injetor e detector: 250 °C; fluxo: 1,90 mL.min<sup>-1</sup>; rampa de temperatura: 45 °C (1 min); 13 °C.min<sup>-1</sup> até 175 °C; 4 °C.min<sup>-1</sup> até 215 °C por 35 min; gás de arraste: hidrogênio; pressão na coluna: 175 kPa (KRAMER et al., 2002). Os componentes separados foram identificados pela coinjeção de padrões e por comparações com os tempos de retenção absolutos e relativos ao padrão interno. A quantificação dos ácidos graxos foi feita com a adição de padrão interno de éster metílico de ácido graxo 23:0 e fatores de correção de resposta teóricos do detector de ionização em chama em relação ao próprio padrão interno, de acordo com metodologia proposta por Kus et al. (2009). Na quantificação dos ácidos graxos *trans*, foi considerada a soma dos isômeros: 16:1 9t; 18:1t; 18:2t e 18:3t.

### 2.2.3 Análise estatística

Todas as amostras foram analisadas em triplicata e o resultado foi apresentado como média ± desvio padrão. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e posterior teste de Tukey, ambos com nível de significância de 95%, para comparação dos teores de ácidos graxos nas fórmulas infantis comerciais, durante o período de estudo. Foram calculados os coeficientes de correlação lineares (COHEN, 1988) entre os teores de ácidos graxos poli-insaturados e ácidos graxos *trans*, e o tempo de armazenamento das amostras comerciais analisadas.

## 3 Resultados e discussão

A Tabela 1 apresenta os valores de lipídios para as fórmulas infantis analisadas.

Dentre as fórmulas infantis (FI) analisadas, nenhuma apresentou valores de lipídios de acordo com o preconizado pela legislação brasileira; porém, estavam de acordo com a informação nutricional fornecida pelo fabricante (KUS et al., no prelo). Os lipídios são a principal fonte de energia para os lactentes e o conteúdo recomendado equivale a aproximadamente 40-54% do total da energia para as FI de 0 a 6 meses e 30-59% para as FI de seguimento. Estes valores de lipídios são necessários para um adequado aporte energético e para manter o equilíbrio osmótico e metabólico do organismo infantil (EUROPEAN COMMISSION, 2003; KOLETZKO et al., 2005). Desta forma, os conteúdos de lipídios, inferiores ao recomendado para as FI analisadas, influenciaram de maneira igual os valores obtidos para os AGPI por todo o período de estudo, já que os cálculos, em todas as etapas, foram realizados considerando-se o teor inicial (Tabela 1). Os teores dos ácidos graxos poli-

**Tabela 1.** Valores de lipídios analisados para as fórmulas infantis.

Fórmula infantil	Lipídios (g)
FI 1*	27,2 ± 0,8
FI 2**	20,4 ± 0,8
FI 3*	19,7 ± 1,3
FI 4*	20,1 ± 0,4
FI 5**	16,8 ± 0,1
FI 6*	24,4 ± 0,5
FI 7**	20,1 ± 0,9
FI 8*	19,4 ± 1,0
FI 9*	24,0 ± 0,8
FI 10*	24,7 ± 0,8
FI 11*	22,4 ± 0,7
FI 12**	16,3 ± 0,3
FI 13*	26,5 ± 0,8
FI 14**	19,2 ± 1,0

Média ± desvio padrão (triplicata); valores expressos por 100 g de amostra. Faixa de aceitação de lipídios em fórmula infantil segundo a legislação brasileira, Portaria nº 977, 1998. \*Fórmula infantil para lactentes até 6 meses 29,7-54,0 g.100 g<sup>-1</sup>; \*\*Fórmula infantil para lactentes de 6 a 12 meses: 27,0-54,0 g.100 g<sup>-1</sup>.

insaturados analisados nas fórmulas infantis comerciais estão representados nas Figuras 1 a 4.

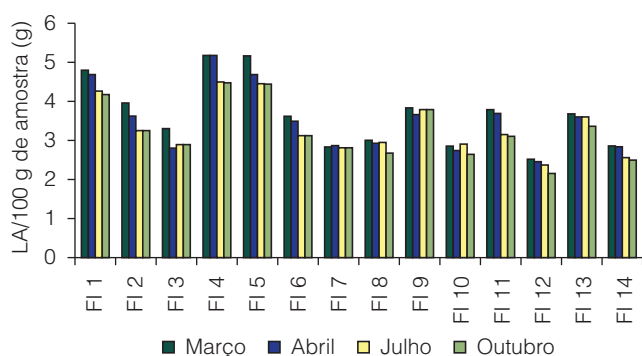
Realizou-se análise estatística dos dados, para avaliar diferenças significativas quanto aos teores de LA, ALA, ARA e DHA nas FIs comerciais no período de oito meses, utilizando-se a análise de variância (ANOVA) e posterior teste de Tukey ( $\alpha = 0,05$ ).

Para o ácido linoleico (LA), cujos teores estão mostrados na Figura 1, verificou-se que em 13 amostras não houve diferença significativa entre os meses de março e abril; em cinco amostras, houve a diminuição do teor de LA ( $p < 0,05$ ) a partir do mês de julho; no mês de outubro, houve uma ligeira queda do teor de LA nessas FIs quando comparadas com a análise do mês de julho; em uma amostra, a diferença no teor de LA ocorreu no mês de outubro; cinco amostras não revelam diferença do teor de LA analisado nos quatro meses. A diminuição na concentração de LA foi de 1,09 a 18,50% dos teores de LA analisados em março para aqueles de outubro.

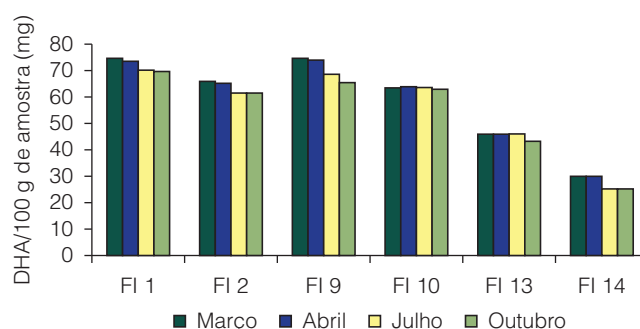
Estudo realizado por Chávez-Servín et al. (2009), em duas amostras de fórmula infantil suplementada com ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa (AGPI-CL), armazenadas por 12 e 18 meses, revelou diferença estatisticamente significativa para o ácido linoleico somente após 18 meses, o qual teve redução de 16,29 para 15,43%. Rodríguez-Alcalá et al. (2007) evidenciaram, em duas fórmulas infantis estudadas, a diminuição estatisticamente significativa no teor de LA, após quatro anos de armazenamento. Em estudo similar ao do presente trabalho, Chávez-Servín et al. (2008) analisaram 20 amostras de fórmulas infantis comerciais. As análises foram realizadas na abertura do produto e

## Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fórmulas infantis comerciais

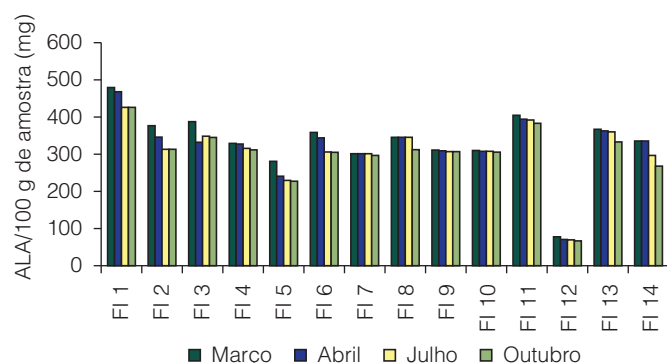
KUS, M. M. M. et al.



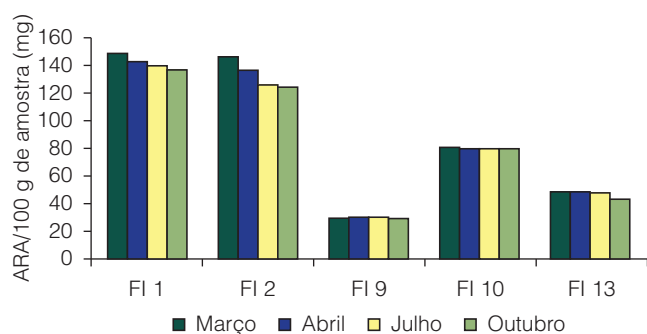
**Figura 1.** Estabilidade do ácido linoleico (LA) nas amostras de fórmulas infantis comerciais armazenadas durante oito meses. Valores da média de três repetições. FI 1, FI 3, FI 4, FI 6, FI 8, FI 11 e FI 13: fórmulas infantis recomendadas de 0 a 6 meses; FI 2, FI 5, FI 7, FI 12 e FI 14: fórmulas infantis de seguimento recomendadas de 6 a 12 meses; FI 9 e FI 10: fórmulas infantis recomendadas para prematuro.



**Figura 4.** Estabilidade do ácido docosahexaenoico (DHA) nas amostras de fórmulas infantis comerciais armazenadas durante oito meses. Valores da média de três repetições. FI 1, FI 2, FI 9, FI 10, FI 13, FI 14: fórmulas infantis suplementadas com ácidos graxos de cadeia longa (ácido araquidônico e/ou ácido docosahexaenoico).



**Figura 2.** Estabilidade do ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA) nas amostras de fórmulas infantis comerciais armazenadas durante oito meses. Valores da média de três repetições. FI 1, FI 3, FI 4, FI 6, FI 8, FI 11 e FI 13: fórmulas infantis recomendadas de 0 a 6 meses; FI 2, FI 5, FI 7, FI 12 e FI 14: fórmulas infantis de seguimento recomendadas de 6 a 12 meses; FI 9 e FI 10: fórmulas infantis recomendadas para prematuro.



**Figura 3.** Estabilidade do ácido araquidônico (ARA) nas amostras de fórmulas infantis comerciais armazenadas durante oito meses. Valores da média de três repetições. FI 1, FI 2, FI 9, FI 10, FI 13: fórmulas infantis suplementadas com ácidos graxos de cadeia longa (ácido araquidônico e/ou ácido docosahexaenoico).

após 15, 30, 50 e 70 dias; em nove amostras, houve perda estatisticamente significativa de LA após 70 dias, sendo que, em média, esse decréscimo entre o momento da abertura e após 70 dias de armazenamento foi 0,18%.

Quanto ao ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA), mostrado na Figura 2, apenas a FI 1 apresentou valor de acordo com o *Codex Alimentarius* (FAO; WHO, 2007) de, no mínimo, 450 mg.100 g<sup>-1</sup>, sendo este um ácido graxo indispensável, pois é precursor da síntese de DHA e seu valor mínimo é importante para o desenvolvimento infantil (KOLETZKO et al., 2005). De acordo com a quantificação de ALA, em 11 amostras, os teores nos meses de março e abril foram iguais; em sete amostras, houve a diminuição de ALA no mês de julho; em sete amostras, não houve diferença significativa no teor de LA nos meses analisados. Comparando-se os meses de março e outubro, observou-se uma diminuição de 0,63 a 21,02% da concentração de ALA, nas fórmulas infantis analisadas. Rodríguez-Alcalá et al. (2007) verificaram uma diferença estatisticamente significativa para o ALA após dois anos de armazenamento. Já Chávez-Servín et al. (2008) observaram perda na concentração de ALA após 70 dias de estocagem, em três das 20 amostras analisadas, com valores de decréscimo médios de 0,12%. A Figura 2 mostra claramente a diferença do conteúdo de ALA na FI 12, provavelmente devido à matéria-prima utilizada na formulação do produto. No rótulo do produto, constava como ingrediente e fonte de gordura a oleína de palma, que provavelmente estava em maior proporção que os demais ingredientes (óleos vegetais poli-insaturados) e contém quantidades inferiores de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente de ALA.

Para o ácido araquidônico (ARA), apenas em cinco fórmulas infantis foi feita a quantificação, pois havia a indicação no rótulo da presença deste ácido

## Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fórmulas infantis comerciais

KUS, M. M. M. et al.

graxo. Na Figura 3, podem-se verificar estes valores, sendo que apenas uma amostra demonstrou diferença significativa no seu teor para todos os meses; quatro amostras revelaram teores de ARA iguais para os meses de abril e março; em duas amostras, houve a diminuição do teor de ARA no mês de julho, e duas amostras não apresentaram diferença significativa no teor de ARA nos meses analisados. Em diversos estudos realizados com fórmulas infantis suplementadas com AGPI-CL, em períodos de armazenamento de 15 dias a quatro anos, não foi verificada a degradação estatisticamente significativa para o ácido araquidônico (ROMEU-NADAL et al., 2007; RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2007; CHÁVEZ-SERVÍN et al., 2008, 2009). Neste estudo, a maioria das amostras analisadas que continha AGPI-CL, isto é, quatro amostras de um total de cinco, apresentou degradação de 7,67 a 14,71% do ARA no quarto mês (julho).

Quanto ao ácido docosahexaenoico (DHA), representado na Figura 4, em seis fórmulas infantis foi feita a quantificação, pois havia a indicação no rótulo da presença deste ácido graxo. Todas as amostras revelaram teores de DHA iguais para os meses de abril e março; em três amostras, houve a diminuição do teor de DHA no mês de julho; três amostras não apresentaram diferença significativa no teor de DHA nos meses analisados. Romeu-Nadal et al. (2007) demonstraram, em 15 meses de acompanhamento da estabilidade de uma FI suplementada com AGPI-CL, que o teor de DHA permaneceu sem alterações estatisticamente significativas. O mesmo comportamento foi verificado em outros trabalhos (CHÁVEZ-SERVÍN et al., 2008, 2009; RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2007). No presente estudo, três das seis amostras estudadas não apresentaram degradação do DHA no tempo de acompanhamento.

Portanto, em geral, os ácidos graxos analisados nas fórmulas infantis comerciais tiveram comportamentos semelhantes quanto à sua estabilidade. Entretanto, em apenas duas amostras não suplementadas com ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, não foi verificada a degradação de LA e ALA durante os meses da análise e, em uma amostra suplementada, não ocorreu a diminuição dos teores de LA, ALA, ARA e DHA. Nas outras amostras, pelo menos um ácido graxo sofreu degradação durante o período de estudo. A degradação do ácido linoleico e do ácido  $\alpha$ -linolênico pode ter sido causada pela oxidação lipídica durante o armazenamento das fórmulas infantis. Em particular, era esperada maior degradação dos ácidos araquidônico e docosahexaenoico, uma vez que são os ácidos mais insaturados e, portanto, mais susceptíveis à oxidação (RODRÍGUEZ-ALCALÁ et al., 2007; CHÁVEZ-SERVÍN et al., 2008). Entretanto, este fato não foi observado, uma vez que a concentração destes ácidos graxos nas fórmulas infantis é pequena, isto é, cerca de 100 mg.100 g<sup>-1</sup> de amostra. Já os teores de LA e

ALA são bem superiores, de 4 g.100 g<sup>-1</sup> e 400 mg.100 g<sup>-1</sup>, respectivamente, ou seja, estes dois últimos estão mais disponíveis para o ataque de radicais livres ou para o início da oxidação (CHOE e MIN, 2006).

As fórmulas infantis que não apresentaram diminuição dos teores de ácidos graxos poli-insaturados são aquelas com valores menores que os declarados na rotulagem e estavam mais próximas do prazo de validade. Estas observações indicam que, mesmo estando em embalagens fechadas e dentro do prazo de validade, os ácidos graxos sofrem degradação, levando à diminuição de seu valor nutricional. Quando estocadas, as fórmulas infantis são, usualmente, protegidas da luz e mantidas em temperatura ambiente. Entretanto, por causa do longo tempo de vida de prateleira, normalmente dois anos, os ácidos graxos poli-insaturados podem ser oxidados, ocasionando a perda do valor nutricional e gerando compostos voláteis. Luz ultravioleta induz a oxidação lipídica e, portanto, produtos lácteos como as fórmulas infantis, depois de abertas, são altamente susceptíveis à oxidação lipídica em temperatura ambiente. De acordo com as informações dos fabricantes, depois de abertas, as fórmulas infantis devem ser consumidas em até um mês. Geralmente, elas são consumidas antes deste período. No entanto, quando utilizadas como alimentação complementar do lactente, o produto é armazenado por um período maior (SARNI, 2007; SCHUTZMAN et al., 2008; CHÁVEZ-SERVÍN et al., 2008).

Observou-se, para todos os analitos estudados, correlação linear negativa com valores de 0,5 a 1,0 entre os meses e a concentração dos ácidos graxos poli-insaturados (COHEN, 1988), sugerindo a degradação dos AGP com o armazenamento. Os maiores coeficientes foram observados para as amostra FI 1, FI 2, FI 4, FI 5, FI 8, FI 11, FI 12 e FI 14. Entretanto, as correlações não foram estatisticamente significativas.

Antioxidantes naturais ou adicionados aos alimentos, como tocoferóis, carotenoides e compostos fenólicos, aumentam a estabilidade oxidativa. Estes compostos estendem o período de indução da oxidação, isto é, a etapa da oxidação em que o ácido graxo insaturado inicia a formação de radical livre, ou diminuem a taxa de oxidação. Antioxidantes sequestram radicais livres, como alquila e peroxila, controlam a transição dos metais, quelam o oxigênio singlet (molécula de oxigênio altamente reativa, com elétrons desemparelhados), evitando, assim, a formação de produtos secundários e a continuação da oxidação lipídica (CHOE e MIN, 2006). No caso das fórmulas infantis, a norma *Codex Alimentarius* Stan 72 (FAO; WHO, 2007) permite a incorporação de uma mistura concentrada de tocoferol e/ou palmitato de ascorbila como antioxidantes, com o limite de 1 mg.100 mL<sup>-1</sup> do produto pronto para o consumo, do composto isolado ou da combinação deles.

## Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fórmulas infantis comerciais

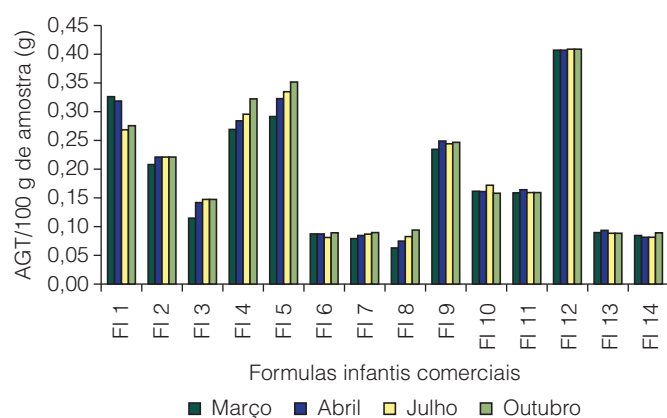
KUS, M. M. M. et al.

Apenas as amostras FI 1 e FI 2 declararam na lista de ingredientes o uso de antioxidantes, isto é, o palmitato de ascorbila e a mistura de tocoferóis. Entretanto, houve a degradação dos ácidos graxos durante o período de estudo. As fórmulas infantis possuem uma percentagem elevada de lipídios (de 30 a 55%) e a suplementação com minerais (pró-oxidantes) pode ser um fator para acelerar a oxidação dos AGP. Por outro lado, há a suplementação com nutrientes antioxidantes, os quais são protetores destes ácidos graxos. Esse balanço de nutrientes suplementados é fundamental para a prevenção da oxidação lipídica, bem como a utilização de antioxidantes permitidos, para assim, assegurar o valor nutricional das fórmulas infantis. (CHÁVEZ-SERVÍN et al., 2008).

### 3.1 Avaliação da formação de ácidos graxos *trans* nas amostras de FI comerciais

A formação de ácidos graxos *trans* pode ser um indicativo de oxidação lipídica. Portanto, no presente trabalho, foi analisada a soma destes ácidos graxos durante o período de estudo. Na Figura 5, podem-se avaliar os teores destes ácidos graxos nas 14 fórmulas infantis analisadas em março, abril, julho e outubro.

Observa-se, na Figura 5, que há uma tendência de aumento de concentração dos ácidos graxos *trans* (AGT) à medida que aumenta o tempo de estocagem. Apenas duas fórmulas infantis (FI 4, FI 8) demonstraram diferença estatisticamente significativa; a FI 4 apresentou as concentrações de março e abril, e de abril e julho iguais, ou seja, a partir do mês de julho, houve um aumento considerável de AGT nesta amostra, sendo o valor de outubro diferente estatisticamente da análise anterior; na FI 8, foi verificado que os teores de AGT para os meses de março e abril foram iguais estatisticamente,



**Figura 5.** Avaliação dos ácidos graxos *trans* (AGT) nas amostras de fórmulas infantis comerciais armazenadas durante oito meses. Valores da média de três repetições. FI 1, FI 2, FI 9, FI 10, FI 13, FI 14: fórmulas infantis suplementadas com ácidos graxos de cadeia longa (ácido araquidônico e/ou ácido docosahexaenoico).

fato também observado para os meses de julho e outubro; ou seja, nesta amostra, o aumento dos ácidos graxos *trans* ocorreu no mês de julho e permaneceu inalterado na análise posterior.

Nas FIs (FI 1, FI 3, FI 4, FI 5 e FI 8) em que houve aumento de AGT, observou-se a formação, em maior proporção, de isômeros 18:2 e 18:3, uma vez que estas fórmulas foram elaboradas com óleos vegetais poli-insaturados. De acordo com Aued-Pimentel et al. (2009), esses são os principais isômeros *trans* formados no processo de desodorização dos óleos vegetais poli-insaturados. Em contrapartida, houve a degradação de ácido linoleico e ácido  $\alpha$ -linolênico, reforçando as evidências da formação dos correspondentes isômeros *trans*, durante o armazenamento do produto. As FI 1, FI 4, FI 5, FI 6, FI 9 e FI 12, inicialmente já apresentaram níveis de AGT superiores a 0,20 g na porção e, portanto, segundo exigência legal (BRASIL, 2003), deveriam conter a declaração na informação nutricional. Os óleos poli-insaturados, matérias-primas utilizadas na elaboração destas fórmulas infantis, provavelmente, apresentavam quantidades consideráveis de ácidos graxos *trans*.

Foi calculado o coeficiente de correlação linear para avaliar o comportamento de formação dos AGT com o tempo de armazenamento das FIs. Foi verificado que, para a maioria das amostras, houve uma correlação positiva e alta ( $0,5 < R < 1,0$ ) entre os meses e a concentração de ácidos graxos *trans* (COHEN, 1988). Entretanto, a correlação para o número de pontos avaliados não foi estatisticamente significativa.

Em geral, os AGT nas fórmulas infantis comerciais apresentaram um aumento em seus teores quando comparados com o início do estudo, sendo que estes variaram entre 0,14 e 52,6%. Entretanto, o teor dos ácidos graxos *trans* obtido para as amostras foi relativamente pequeno (cerca de 0,20 g.100 g<sup>-1</sup> de amostra), o que tornou mais difícil a identificação e imprecisa a quantificação individual dos isômeros (limite de quantificação de 0,10 g.100 g<sup>-1</sup> de amostra).

## 4 Conclusões

A maioria das fórmulas infantis não apresentou degradação dos ácidos graxos poli-insaturados durante o período recomendado de consumo (um mês). Entretanto, estes teores tiveram variação estatisticamente significativa para o período do estudo (8 meses). Os ácidos graxos *trans* estavam presentes em quantidades significativas em algumas amostras e, em outras, houve aumento de sua concentração durante a estocagem. Entretanto, para a maioria das amostras, não houve diferença estatisticamente significativa no período estudado. Portanto, deve-se ter uma atenção maior ao utilizar este alimento próximo ao prazo de validade e após a abertura da embalagem e, também, no armazenamento

## Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fórmulas infantis comerciais

KUS, M. M. M. et al.

por tempo prolongado, pois os ácidos graxos podem ser degradados e seu valor nutricional poderá ser modificado, além de os teores de lipídios estarem em desacordo com a legislação vigente.

### Referências

AUED-PIMENTEL, S.; KUS, M. M. M.; CARUSO, M. S. F.; KUMAGAI, E.; ZENEON, O. Ácidos graxos trans em óleos vegetais refinados poli-insaturados comercializados no estado de São Paulo, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 646-651, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000300030>

AUESTAD, N.; SCOTT, D. T.; JANOWSKY, J. S.; JACOBSEN, C.; CARROLL, R. B.; MONTALTO, M. B.; HALTER, R.; QIU, W.; JACOBS, J. R.; CONNOR, W. E.; CONNOR, S. L.; TAYLOR, J. A.; NEURINGER, M.; FITZGERALD, K. M.; HALL, R. T. Visual, cognitive and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. **Pediatrics**, Elk Grove Village, v. 112, n. 3, p. 177-183, 2003.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 360, de 23 dezembro de 2003 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 26 dezembro 2003.

CARVER, J. D. Advances in nutritional modifications of infant formulas. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 77, n. 6, p. 1550S-1554S, 2003.

CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; CASTELLOTE, A. I.; LÓPEZ-SABATER, C. Volatile compounds and fatty acid profiles in commercial milk-based infant formulae by static headspace gas chromatography: Evolution after opening the packet. **Food Chemistry**, London, v. 107, n. 1, p. 558-569, 2008.

CHÁVEZ-SERVÍN, J. L.; CASTRILLOTE, A. I.; MARTÍN, M.; CHIFRÉ, R.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Stability during storage of LC-PUFA-supplemented infant formula containing single cell oil or egg yolk. **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 2, p. 484-492, 2009.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 5, n. 4, p. 169-186, 2006. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x>

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Codex Alimentarius Commission. Food standards programme. **Codex Standard for Infant Formula – Codex Stan 72 1981**. Rome, 2007.

COHEN, J. **Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences**. 2. ed. New Jersey: Lawrence Erlbaum Associates, 1988. 230 p.

EUROPEAN COMMISSION. Health and Consumer Protection Directorate-General. **Report of the Scientific Committee on Food on the Revision of Essential Requirements of Infant Formula and Follow-on Formula**. Bruxelles, Belgium: European Commission, 2003. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out199\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out199_en.pdf)>. Acesso em: 28 ago. 2006.

HARTMAN, L.; LAGO, R. A. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v. 22, n. 8, p. 475-97, 1973.

HIRAYAMA, K. B.; SPERIDIÃO, P. G. L.; FAGUNDES-NETO, U. Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa. **The Electronic Journal of Pediatric, Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases**, São Paulo, v. 10, p. 1-10, 2006.

HORWITZ, W. (Ed.). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18. ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2005. 1298 p.

KOLETZKO, B.; BAKER, S.; CLEGHORN, G.; FAGUNDES-NETO, U.; GOPALAN, S.; HERNELL, O.; SENG-HOCK, Q.; JIRAPINYO, P.; LONNERDAL, B.; PENCHARZ, P.; PZYREMBEL, H.; RAMIREZ-MAYANS, J.; SHAMIR, R.; TURCK, D.; YAMASHIRO, Y.; ZONG-YI, D. Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESGHAN coordinated international expert group. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, London, v. 41, p. 584-599, 2005. PMID:16254515. <http://dx.doi.org/10.1097/01.mpg.0000187817.38836.42>

KOLETZKO, B.; SAUERWALD, U.; KEICHER, U.; SAULE, H.; WAWATSCHEK, S.; BÖHLES, H.; SAUERWALD, U.; KEICHER, U.; SAULE, H.; WAWATSCHEK, S.; BÖHLES, H.; BERVOETS, K.; FLEITH, M.; CROZIER-WILLI, G. Fatty acid profiles, antioxidant status, and growth of preterm infants fed diets without or with long-chain polyunsaturated fatty acids. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v. 42, n. 5, p. 243-253, 2003.

KRAMER, J. K. G.; BLACKADAR, C. B.; ZHOU, J. Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100-m CP sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA, 18:1, 18:2 and 18:3 isomers, and short- and long-chain FA. **Lipids**, New York, v. 37, n. 8, p. 823-835, 2002.

KUS, M. M. M.; AUED-PIMENTEL, S.; MANCINI-FILHO, J. Comparação de metodologias analíticas na determinação de lipídios e ácidos graxos poli-insaturados em fórmula infantil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, p. 12-20, 2009.

KUS, M. M. M.; SILVA, S. A.; AUED-PIMENTEL, S.; MANCINI-FILHO. Informação nutricional de fórmulas infantis comercializadas no Estado de São Paulo: avaliação dos teores de lipídios e ácidos graxos. **Revista de Nutrição**, Campinas. No prelo.

LUNN, J.; THEOBALD, H.E. The health effects of dietary unsaturated fatty acids. **Nutrition Bulletin**, Indianapolis, v. 31, n. 3, p. 178-224, 2006. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1467-3010.2006.00571.x>



**Estabilidade dos ácidos graxos poli-insaturados presentes em fórmulas infantis comerciais**KUS, M. M. M. *et al.*

- MADUKO, C. O.; PARK, Y. W.; AKOH, C. C. Characterization and oxidative stability of structured lipids: infant milk fat analog. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 85, n. 3, p. 197-204, 2008.
- MAIA, E. L.; RODRIGUES-AMAYA, D. B. R. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 53, n. 1-2, p. 27-35, 1993.
- MANGLANO, P.; LAGARDA, M. J.; SILVESTRE, M. D.; VIDAL, C.; CLEMENTE, G.; FARRÉ, R. Stability of the fraction of Milk-based infant formulas during storage. **European Journal of Lipid Science and Technology**, London, v. 107, n. 11, p. 815-823, 2005. <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200501172>
- POMPÉIA, C. Essencialidade dos ácidos graxos. In: CURI, R.; POMPEIA, C.; MIYASAKA, C. K.; PROCÓPIO, J. (Eds.). **Entendendo a Gordura: os Ácidos Graxos**. São Paulo: Manoli, 2002. v. 1.
- RODRÍGUEZ-ALCALÁ, L. M.; GARCÍA-MARTÍNEZ, M. C.; CACHÓN, F.; MARMESAT, S.; ALONSO, L.; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; FONTECHA, J. Changes in the lipid composition powdered infant formulas during long-term storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 16, p. 6533-6538, 2007.
- ROMEU-NADAL, M.; CHÁVES-SÉRVIN, J. L.; CASTELLOTE, A. I.; RIVERO, M.; LÓPEZ-SABATERA, M. C. Oxidation stability of the lipid fraction in Milk powder formulas. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 2, p. 756-763, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.10.037>
- SARNI, R. O. S. Alimentação no primeiro ano de vida. **Pediatria Moderna**, Belo Horizonte, v. 43, n. 3, p. 121-129, 2007.
- SCHUTZMAN, D. L.; PORAT, R.; SALVADOR, A.; JANECZKO, M. Neonatal nutrition: a brief review. **World Journal of Pediatrics**, Hangzhou, v. 4, n. 4, p. 248-253, 2008. PMID:19104887. <http://dx.doi.org/10.1007/s12519-008-0046-2>
- SILVA, D. R. B.; MIRANDA-JÚNIOR, P. F.; SOARES, E. A. A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. **Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil**, Recife, v. 7, n. 2, p. 123-133, 2007.
- SMITHERS, L. G.; GIBSON, R. A.; MCPHEE, A.; MAKRIDES, M. Effect of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of preterm infants on disease risk and neurodevelopment: a systematic review of randomized controlled trials. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 87, n. 4, p. 912-920, 2008.
- TANAKA, K.; KON, N.; OHKAWA, N.; YOSHIKAWA, N.; SHIMIZU, T. Does breastfeeding in the neonatal period influence the cognitive function of very-low-birth-weight infants at 5 years of age? **Brain & Development**, London, v. 31, n. 4, p. 288-293, 2009.
- VAZ, J. S.; DEBONI, F.; AZEVEDO, M. J.; GROSS, J. L.; ZELMANOVITZ, T. Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 4, p. 498-500, 2006.
- VELASCO, J.; MARMESAT, S.; HOLGADO, F.; MARQUEZ-RUIZ, G.; DOBARGANES, C. Influence of two lipid extraction procedures on the peroxide value in powdered infant formulas. **European Food Research and Technology**, London, v. 226, n. 5, p. 1159-1166, 2008. <http://dx.doi.org/10.1007/s00217-007-0645-5>