

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**DIFERENCIAÇÃO DO LEITE CONVENCIONAL E ORGÂNICO,
POR ANÁLISES DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS E DE COMPOSTOS
ANTIOXIDANTES**

NATALIA MITIKO AONO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Zootecnia como
parte das exigências para obtenção do
título de mestre

Botucatu/SP
Novembro/2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**DIFERENCIAÇÃO DO LEITE CONVENCIONAL E ORGÂNICO,
POR ANÁLISES DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS E DE COMPOSTOS
ANTIOXIDANTES**

NATALIA MITIKO AONO

Zootecnista

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ducatti
Coorientadora: Prof^a Dr^a Giuseppina Pace
Pereira Lima

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Zootecnia como parte
das exigências para obtenção do título de
mestre

Botucatu/SP
Novembro/2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

A638d Aono, Natalia Mitiko, 1987-
Diferenciação do leite convencional e orgânico, por análises de isótopos estáveis e de compostos antioxidantes / Natalia Mitiko Aono. - Botucatu : [s.n.], 2014
vii, 39 f. : grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2014
Orientador: Carlos Ducatti
Coorientador: Giuseppina Pace Pereira Lima
Inclui bibliografia

1. Carbono 13. 2. Nitrogênio - Isótopos. 3. Análise de componentes principais. 4. Fenóis. 5. Leite - Pasteurização. 6. Cinética. I. Ducatti, Carlos. II. Lima, Giuseppina Pace Pereira. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. IV. Título.

DEDICO

Ao meu grande amor Matheus, por todo companheirismo, carinho, compreensão, paciência e apoio durante mais essa etapa e além! Por estar sempre ao meu lado, seja rindo comigo, seja enxugando minhas lágrimas.

E ao meu pequeno grande amor Kauê, por iluminar minha vida, dando mais sentido a ela a cada sorriso, a cada lição aprendida e a cada “eu te amo, mãe”!

*“Nenhum sucesso na vida compensa o fracasso no lar”
(David O. McKay)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por todas as bênçãos a mim enviadas durante toda a minha vida!

À minha família! À família que me gerou: meus pais, Suemi e Pedro, sem os quais eu não seria nada do que sou hoje, ou não teria chegado nem perto de onde cheguei. Agradeço por toda a dedicação de vocês ao meu sucesso, por cada quilômetro rodado até Botucatu, por cada centavo investido e cada gota de paciência comigo. Juntamente aos meus irmãos, Jessica e Cassiano, são, com todas as nossas imperfeições, a família, mais perfeita que eu poderia ter! E, claro, à família que gerei: meu marido, Matheus, e nosso filhote, Kauê, por serem simplesmente a maior realização e a aventura da minha vida! Não daria para ser feliz sem nenhum de vocês!!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de estudos concedidas.

Ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, pela oportunidade e aos seus funcionários pela competência.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edson Ramos de Siqueira, por me receber como orientada, dando-me a oportunidade de crescer mais. Também pelas conversas, pelos incentivos, pela confiança, pela amizade e por ser um exemplo de profissional e ser humano, que tanto me influenciou.

Ao meu também orientador Prof. Dr. Carlos Ducatti, por me acolher como orientada, incentivar a mim e a minha pesquisa e pelas “viagens” nas conversas.

À minha coorientadora Profa. Dra. Giuseppina Pace Pereira Lima, ou simplesmente Fina, por todos seus ensinamentos, por sua dedicação, competência e maluquice, que muito eu admiro.

Ao Prof. Dr. Heraldo César Gonçalves e à profa. Fina, pela participação na banca do Exame de Qualificação e suas contribuições positivas ao trabalho.

À Profa. Dra. Maria Márcia Pereira Sartori, pela participação fundamental na banca de Defesa de Dissertação e pelo auxílio com minhas dúvidas estatísticas.

Ao Dr. Sérgio Marques Costa, pelas grandes contribuições como banca de Defesa de Dissertação e por toda a atenção dada a mim ao longo da minha pesquisa.

À Profa. Simone Fernandes, pela amizade e atenção dedicadas a mim, com suas palavras, conselhos e sorrisos.

À amiga Aline, por todas as conversas, horas a fio no laboratório e apoio em tudo, mesmo fora do mestrado. E aos outros pós-graduandos do prof. Edson: Maria Fernanda, Guilherme, Ariane e Edivaldo (funcionário do setor de Ovinocultura), principalmente pela amizade, convivência e por tantos momentos de trabalho e descontração, sempre muito agradáveis com vocês por perto!

Ao Departamento de Produção Animal, seus funcionários e professores, todos grandes profissionais com os quais tive o prazer de conviver.

À equipe do prof. Ducatti e todo o Centro de Isótopos Estáveis Ambientais, pelo auxílio com as análises e conversas no café: profa. Juliana, Mari, Evandro, Cibele, Bárbara, Vânia, Luciane, Guilherme, Rhani, Priscila, Ana Cristina e, em especial, Marco e Adriele, dois grandes amigos que ganhei nesse mestrado.

À equipe da profa. Fina e todo o Departamento de Química e Bioquímica: Marizete, Débora, Isa, tantos outros orientados e estagiários e, sobretudo, Sérgio, Juliana e Maíra, pelos ensinamentos, auxílio com as análises e muita risada.

Aos proprietários das fazendas que tão atenciosamente me receberam e tão gentilmente me cederam as amostras utilizadas nesta pesquisa: Marcello, Carlos e Zoinho, Bel e Alemão, Thiago e Paulo. E aos seus respectivos funcionários, que toda semana me auxiliaram na colheita das amostras: Ronaldo, Felipe, Donizete, Juninho, Lucimara, Carla e Chaliza.

Aos amigos e companheiros de trabalho da CordeiroBIZ: Evan, Lívia, Fabi e Breuba, pelo apoio especial e tanta compreensão com minha ausência.

Aos meus familiares e amigos do coração, de Botucatu, Santo André, Mogi Mirim ou qualquer outro canto do mundo, pela compreensão com minhas tensões, pelas conversas de desabafo e pelas horas de descontração.

A todos que de alguma forma contribuíram para essa minha realização pessoal, meu muitíssimo obrigada!

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
Produção orgânica	2
Leite orgânico	3
Isótopos estáveis	5
Antioxidantes	8
Compostos fenólicos	9
Capacidade antioxidante total	10
Referências bibliográficas	11
CAPÍTULO II – DIFERENCIAÇÃO DO LEITE CONVENCIONAL E ORGÂNICO, POR ANÁLISES DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS E DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	16
Resumo	17
Abstract	18
Introdução	19
Material e métodos	21
Amostragem	21
Isótopos estáveis	23
Compostos antioxidantes	24
Análise estatística	25
Resultados e discussão	25
Isótopos estáveis	25
Compostos antioxidantes	29
Análise de componentes principais	32
Conclusão	35
Referências bibliográficas	36
CAPÍTULO IV – IMPLICAÇÕES	38

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Página

Tabela 1. Razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) dos leites convencional e orgânico da primeira amostragem.....	26
Tabela 2. Razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) dos leites das fazendas convencionais (Conv 1 e Conv 2) e orgânicas (Org 1 e Org 2) da segunda amostragem.....	26
Tabela 3. Conteúdo de polifenóis totais (mg Eq. catequina/100 g) dos leites crus e pasteurizados das fazendas convencionais (Conv 1 e Conv 2) e orgânicas (Org 1 e Org 2).....	29
Tabela 4. Dados gerados pela análise de componentes principais da primeira amostragem.....	33
Tabela 5. Dados gerados pela análise de componentes principais da segunda amostragem.....	34

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Página

- Figura 1. Cinéticas das atividades antioxidantes de uma amostra (crua e pasteurizada) das fazendas Conv 1 (a), Conv 2 (b), Org 1 (c) e Org 2 (d), usando o DPPH..... 31
- Figura 2. Análise de componentes principais das variáveis $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ no leite convencional e orgânico da primeira amostragem..... 33
- Figura 3. Análise de componentes principais das variáveis $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e polifenóis nos leites das fazendas convencionais (Conv 1 e 2) e orgânicas (Org 1 e 2) da segunda amostragem..... 34

CAPÍTULO I

Considerações iniciais

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Produção orgânica

De acordo com o *Codex Alimentarius* (2007), sistemas orgânicos de produção são baseados em padrões específicos e precisos de produção que visam alcançar agroecossistemas ideais, os quais são socialmente, ecologicamente e economicamente sustentáveis. Ele define a agricultura orgânica como um sistema holístico de gestão de produção, que promove e melhora a saúde do agroecossistema, incluindo a biodiversidade, os ciclos biológicos e a atividade biológica do solo. Prioriza a adoção de práticas de manejo, em detrimento do uso de insumos externos, ou seja, a utilização, sempre que possível, de métodos culturais, biológicos e mecânicos, ao invés de materiais sintéticos, para desempenhar qualquer função específica dentro do sistema.

Baseada nessas diretrizes, a lei nº 10.831, estabelecida em 23 de dezembro de 2003 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) considera sistema orgânico de produção agropecuária todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não-renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (BRASIL, 2003).

A pecuária orgânica tem por premissa básica a manutenção do bem-estar dos animais, a qual, segundo Neves et al. (2005), deve permitir, em condições de manejo produtivo, que vivam livres de dor, sofrimento e angústia, em um ambiente em que possam expressar proximidade com o comportamento em seu habitat original, compreendendo movimentação, territorialidade, descanso e ritual reprodutivo. Os mesmos autores afirmaram que o manejo deve eliminar fatores estressantes, além de criar alternativas capazes de estimular os mecanismos naturais de defesa próprios do

organismo animal. Assim, a pecuária orgânica não se trata apenas da restrição do uso de medicamentos alopáticos e proibição da aplicação de hormônios.

No Brasil, além da lei citada anteriormente, a qual trata da agricultura orgânica em geral, existe o decreto nº 7.794, de 20 de agosto de 2012, que instituiu a Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica (PNAPO), a qual objetiva integrar, articular e adequar políticas, programas e ações indutoras da prática agroecológica e da produção orgânica (BRASIL, 2012). Outro importante dispositivo legal é a Instrução Normativa nº 46, de 06 de outubro de 2011, a qual estabelece o Regulamento Técnico para os sistemas orgânicos de produção animal e vegetal, bem como as listas de substâncias permitidas para uso nos mesmos (BRASIL, 2011).

A demanda por alimentos orgânicos vem crescendo, pois, segundo Portilho (2008), consumidores de produtos orgânicos têm ciência da importância de sua escolha alimentar para a manutenção da saúde pessoal e do “mundo”. Para Siderer et al. (2005), a produção orgânica representa uma importante ferramenta para solucionar simultaneamente questões ligadas a produção de alimentos, meio ambiente, bem-estar animal e desenvolvimento rural. Em outras palavras, está evidente que a população tem dado cada vez mais atenção tanto à qualidade do alimento ingerido, como às questões socioambientais e econômicas envolvidas na produção deste alimento.

Leite orgânico

O leite é um produto largamente consumido devido à sua grande importância nutricional, sobretudo a crianças, e versatilidade na fabricação de derivados. Comerón e Andreo (2000) afirmaram que a crescente preocupação mundial com a qualidade e inocuidade dos alimentos impulsionou o aumento, em vários países, do número de propriedades rurais orgânicas, sendo que o leite e seus derivados figuram entre os principais produtos de interesse comercial.

São extremamente escassos os dados estatísticos oficiais da produção de leite orgânico no Brasil. De acordo com Soares et al. (2011), a partir de dados preliminares do levantamento realizado pelo Projeto “Sistemas Orgânicos de Produção Animal”, da Embrapa, foi estimada uma produção de 6,8 milhões de toneladas de leite orgânico no Brasil em 2010. Isso representou apenas 0,02% da produção de leite convencional, que foi de, aproximadamente, 30,7 bilhões de toneladas no mesmo ano (IBGE, 2010).

Além de o manejo orgânico afetar positivamente a saúde das vacas (SAKOWSKI et al., 2012), a escolha do sistema de produção (orgânico e convencional) e a sazonalidade alteram a composição química dos leites (FANTI et al., 2008). Em contrapartida, Toledo et al. (2002), analisando leites crus orgânicos e convencionais durante um ano, na Suécia, não encontraram diferenças significativas entre as composições médias dos produtos, concluindo, porém, que resultados diferentes poderiam ser encontrados em outros países ou regiões.

Pesquisas têm demonstrado diferenças na qualidade nutricional entre leites e seus derivados produzidos em sistemas orgânico e convencional (PALUPI et al., 2012). Já foram relatados teores significativamente maiores de CLA (ácido linoleico conjugado) presentes no leite orgânico já processado, adquirido do comércio (FANTI et al., 2008; BUTLER et al., 2011). Bergamo et al. (2003) avaliaram amostras de leite orgânico e convencional de vaca e búfala na Itália e encontraram maiores concentrações de antioxidantes lipossolúveis (α -tocoferol e β -caroteno), ácido α -linolênico, CLA e ácido trans-vacênico (TVA), que sugerem fortemente um maior valor nutricional da fração lipídica dos leites orgânicos. Ellis et al. (2006) encontraram maior proporção de ácidos graxos poliinsaturados e ômega 3, bem como uma melhor razão $\omega 6:\omega 3$ no leite orgânico.

Butler et al. (2008), estudando a variação sazonal na concentração de ácidos graxos e antioxidantes lipossolúveis dos leites produzidos em sistemas orgânicos e convencionais (confinados e extensivos) concluíram que a composição e a qualidade nutricional do leite são afetadas pelo sistema de produção por meio de mecanismos provavelmente relacionados à frequência de pastejo, à sazonalidade da forrageira e à composição da dieta.

Um único parâmetro de qualidade como, por exemplo, apenas o teor de ácidos graxos poliinsaturados, não necessariamente é consequência das práticas inerentes à produção orgânica adotadas para obtenção de alimentos de qualidade, podendo ser apenas o reflexo de uma prática agrícola mais adequada (DE WIT, 2009).

Técnicas que permitam a diferenciação do leite orgânico do convencional são de grande importância para garantir ao consumidor uma procedência segura dos alimentos que ingere. Capuano et al. (2013) sumarizaram técnicas laboratoriais potencialmente capazes de distinguir alimentos orgânicos de não-orgânicos, sendo que, para leites e

derivados, eles apresentam como ferramentas promissoras a análise isotópica multi-elementar, o teor de ácido fitânico, de ácido α -linolênico e de outros ácidos graxos (CLA, ômega 3, trans-vacênico) e o perfil de triacilglicerol.

Para esses autores, é muito improvável que essa autenticação seja possível pela avaliação de um único parâmetro e/ou por uma única técnica analítica, sendo que, como os padrões para a produção orgânica não são os mesmos no mundo todo, o sucesso das análises empregadas depende de características regionais da produção.

Isótopos estáveis

Os isótopos são átomos do mesmo elemento, que diferem em número de nêutrons, apresentando diferentes massas (KENNEDY e KROUSE, 1990). O termo isótopo vem do grego ISO (mesmo ou igual) e TOPOS (lugar), referindo-se ao fato de que ocupam o mesmo lugar na tabela periódica. A expressão estável significa que tais isótopos não emitem radiação.

O elemento químico carbono, por exemplo, apresenta somente dois isótopos estáveis, o ^{12}C (massa atômica igual a 12) e o ^{13}C (massa atômica igual a 13), sendo o primeiro o mais leve e mais abundante (98,8890 átomos %) na natureza e o segundo o mais pesado, por possuir um nêutron a mais em seu núcleo, e menos abundante (1,1110 átomos %) (PRESTON, 1992). As moléculas isotópicas $^{12}\text{CO}_2$ e $^{13}\text{CO}_2$ não são diferenciadas pelas membranas biológicas de origem vegetal ou animal, fazendo do carbono-13 um excelente traçador, extrapolando para os demais elementos. Para o nitrogênio, seu isótopo leve e dominante é o ^{14}N e seu isótopo pesado, utilizado como marcador, é o ^{15}N .

A medida relativa (enriquecimento isotópico relativo), expressa na terminologia delta (δ), é calculada através da expressão adimensional:

$$\delta_{(\text{amostra}, \text{padrão})} = \frac{r_{\text{amostra}} - r_{\text{padrão}}}{r_{\text{padrão}}}$$

na qual, r é a razão do isótopo pesado sobre o isótopo leve ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$, $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$) da amostra e do padrão. Como esses valores numéricos são bem baixos, costuma-se multiplicar a expressão por 1000, obtendo-se a terminologia em delta per mil [$\delta\text{‰}_{(\text{amostra}, \text{padrão})}$].

Esses padrões isotópicos são internacionais e foram escolhidos arbitrariamente, sendo que para os isótopos estáveis do carbono, o padrão é o V-PDB (Cretaceous

carbonate fóssil *Bellemnitella americana*, da formação Peedee do Sul da Carolina/EUA) e para o nitrogênio, o padrão aceito é o ar atmosférico, o qual é considerado uma mistura isotópica homogênea na superfície terrestre. Por serem padrões, eles possuem $\delta\text{‰} = 0\text{‰}$ e o valor isotópico de uma amostra será seu enriquecimento ou empobrecimento no conteúdo do isótopo pesado, relativamente a esses padrões, por isso o termo é enriquecimento isotópico relativo.

Em animais e, conseqüentemente, em alimentos de origem animal, as razões isotópicas são determinadas, principalmente, pela dieta (DENIRO e EPSTEIN, 1978, 1981). O sinal isotópico de carbono da dieta, resultado da proporção de plantas C_3 e C_4 , é rapidamente refletido no leite (METGES et al., 1990), de forma que as plantas C_4 apresentam um maior conteúdo relativo de ^{13}C (O'LEARY, 1981).

Essa diferença de valores entre plantas C_3 e C_4 é causada por suas diferentes vias fotossintéticas (rotas bioquímicas para produção de carboidratos), especialmente pelo fracionamento enzimático e difusão que ocorrem na fase de fixação do CO_2 (BADECK et al., 2005). O valor do enriquecimento relativo ($\delta^{13}\text{C}$) de plantas C_3 varia entre -22 e -34‰, enquanto para plantas C_4 , entre -9 e -16‰, sendo essa variação em função da espécie. (BOUTTON, 1996; VOGEL, 1993)

Diferentemente do carbono, o $\delta^{15}\text{N}$ das plantas varia conforme a maneira pela qual absorvem nitrogênio. A maioria das leguminosas, por realizar simbiose com micorrizas, é capaz de fixar o nitrogênio atmosférico, fazendo com que seu $\delta^{15}\text{N}$ varie ao redor de uma unidade, próximo ao valor do padrão ($0,0 \pm 1,0\text{‰}$) (WERNER e SCHIMIDT, 2002). O $\delta^{15}\text{N}$ de plantas não leguminosas depende, em grande parte, das condições de seu cultivo, da abundância isotópica do solo, da variação causada pela adubação e da atmosfera (CHOI et al., 2003). Quando o nitrogênio é absorvido de matéria orgânica, o $\delta^{15}\text{N}$ é mais significativo, ao redor de 5‰, assim, valores negativos são observados em solos secos e arenosos, os quais possuem baixa proporção de matéria orgânica. Quando se adiciona esterco como fertilizante natural ao solo, o fracionamento é alto, resultando em um $\delta^{15}\text{N}$ em torno de 10‰ (SHIBUYA et al., 2006).

De acordo com Bateman e Kelly (2007), fertilizantes nitrogenados sintéticos possuem valores de enriquecimento relativo de nitrogênio-15 significativamente mais baixos (-6 a 6‰) que compostos orgânicos e dejetos de animais (1 a 37‰). Isso se deve ao fato da fonte de nitrogênio comumente utilizada pelas indústrias para fabricação dos

fertilizantes sintéticos ser o N_2 atmosférico ($\delta^{15}N = 0\text{‰}$), enquanto as excretas animais serem altamente nitrogenadas.

Em pesquisas na Alemanha utilizando análises isotópicas e ácidos graxos, foram encontrados dois indicadores promissores para a distinção entre amostras de leite convencional e orgânico: a razão isotópica de carbono ($\delta^{13}C$) e o teor de ácido α -linolênico (C18:3 ω 3) da fração lipídica (MOLKENTIN e GIESEMANN, 2007). Molkentin (2009), em continuidade a esses estudos, observou que o leite orgânico adquirido do varejo, durante um ano e meio, apresentou um $\delta^{13}C$ sempre abaixo de -26,5‰ e teores de C18:3 ω 3 sempre acima de 0,50%, possibilitando o uso combinado de dois parâmetros independentes, ambos baseados nas diferentes composições das dietas das vacas leiteiras, para identificação do leite orgânico. O autor ressalta que tais valores limiares foram determinados para os leites produzidos na Alemanha, logo, devem ser checados para outros lugares e/ou condições diferentes desse país. Esses valores também foram aplicáveis para derivados lácteos (MOLKENTIN, 2013).

Camin et al. (2008) afirmaram que os níveis de fracionamento isotópico do ^{13}C durante a síntese dos lipídios do leite diferem dos da caseína. Logo, determinações do $\delta^{13}C$ na proteína e na gordura podem fornecer diferentes caminhos para a discriminação entre o leite orgânico e o convencional, já que esses autores encontraram correlação significativa entre o $\delta^{13}C$ de ambas as frações do leite com a porcentagem de milho na dieta dos animais. Em concordância, Molkentin e Giesemann (2010) afirmaram que a determinação de um valor limite para o $\delta^{13}C$ da proteína e da gordura separadamente é útil para a autenticação do leite orgânico e detecção de fraudes em produtos processados.

Como adubos orgânicos geralmente têm um maior $\delta^{15}N$ que fertilizantes artificiais, proibidos em sistemas orgânicos de produção, a análise isotópica do nitrogênio tem identificado com sucesso vegetais cultivados organicamente, sob condições controladas, pelos seus maiores valores de $\delta^{15}N$ (DEL AMOR et al., 2008; FLORES et al., 2007; RAPISARDA et al., 2010). Apesar de uma “assinatura” específica de nitrogênio da forragem poder refletir-se no leite de vaca (DENIRO e EPSTEIN, 1981; KNOBBE et al., 2006), Molkentin e Giesemann (2007) observaram apenas uma tendência a valores mais altos de $\delta^{15}N$ no leite convencional e concluíram

que a identificação precisa do leite orgânico não é possível somente por sua mensuração.

Antioxidantes

O processo respiratório e diversas reações oxidativas, que ocorrem nas células aeróbicas para produção de energia, levam à formação de radicais livres, que causam danos ao organismo humano e contribuem para o aparecimento de doenças como inflamações, tumores malignos, mal de Alzheimer e doenças cardiovasculares, bem como aceleram o processo de envelhecimento (SIKORA et al., 2008). Os radicais livres são moléculas instáveis, por possuírem número ímpar de elétrons, sendo necessário adquirir elétrons para atingirem a estabilidade. Isso os leva a reagir com a maioria dos compostos vizinhos, oxidando-os (SANCHEZ-MORENO, 2002).

Por isso, as células humanas dependem de certa capacidade antioxidante para fornecer proteção contra os efeitos prejudiciais de radicais livres e espécies reativas do oxigênio, que são consequências inevitáveis da vida aeróbica. Para alcançar uma proteção eficiente, os tecidos dispõem de um sistema antioxidante integrado, que consiste de um arranjo de diversos componentes lipossolúveis (vitamina E, carotenoides), hidrossolúveis (ácido ascórbico, glutathione) e enzimáticos (glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase) (McLEAN et al., 2005), os quais são produzidos pelo organismo ou devem ser ingeridos pela dieta.

Assim, antioxidante é, em uma ampla definição, qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (RIBEIRO et al., 2008). Mais especificamente, antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (PIETTA, 2000). Estruturalmente, são compostos aromáticos que possuem pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos, largamente utilizados pela indústria de alimentos, ou naturais, como organosulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos (RAMALHO e JORGE, 2006).

De acordo com seu modo de ação, os antioxidantes, podem ser classificados em primários ou secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia da reação por meio da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em

produtos termodinamicamente estáveis. (ADEGOKE, 1998). Já os secundários atuam retardando a etapa de iniciação da autoxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação de metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (DECKER, 2002).

Vários são os estudos acerca dos antioxidantes naturais, tanto em modelos *in vivo*, como *in vitro*, visando elucidar seu real papel na manutenção da saúde e prevenção de doenças crônicas (NIKI, 2010; RODRIGUEZ-AMAYA, 2010; SANCHO e PASTORE, 2012)

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo os grupos funcionais (LEE et al., 2005). Mais de oito mil polifenóis são conhecidos (BRAVO, 1998), podendo ser pigmentos, conferindo aparência colorida aos alimentos, ou produtos do metabolismo secundário de vegetais, normalmente reações de defesa contra agressões do ambiente (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Possuem estrutura variável e, com isso, são multifuncionais, englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, estando presentes em vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (BRAVO, 1998). Dentre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis.

Os compostos polifenólicos são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso, formam-se em condições de estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK e SHAHIDI, 2004). Nos vegetais, atuam ainda como agente antipatogênico e contribuem na pigmentação (SHAHIDI e NACZK, 1995), enquanto em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma (PELEG et al., 1998) e estabilidade oxidativa (NACZK e SHAHIDI, 2004).

De acordo com O'Connell e Fox (2001), os polifenóis são encontrados em quantidades consideráveis em leite de ruminantes, porém a sua relevância na qualidade nutricional do leite e na saúde humana ainda não foi elucidada.

Capacidade antioxidante total

A determinação do poder antioxidante dos alimentos oferece subsídios para o esclarecimento de fatores fisiológicos e nutricionais envolvidos, bem como informações sobre absorção e biodisponibilidade de compostos antioxidantes (GHISELLI et al., 2000).

Para a avaliação da capacidade antioxidante, o método de sequestro dos radicais livres de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) é comumente aplicado por ser sensível, simples e rápido. Ele determina unicamente o poder redutor dos compostos antioxidantes presentes na amostra, os quais se ligam aos DPPH, radicais orgânicos estáveis. Devido à presença de um elétron desemparelhado de nitrogênio, a solução de DPPH apresenta coloração violeta. Após a reação do antioxidante, a cor passa a ser amarelada, sendo possível acompanhar essa mudança por meio de espectrofotômetro em 517 nm de absorbância (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1985)

Os estudos a respeito da atividade antioxidante do leite são recentes e escassos, principalmente com relação a leite orgânico. Aoki et al. (2013) avaliaram leite bovino de vacas suplementadas com trealose e Li et al. (2009), leite humano e fórmula infantil.

No Capítulo II, é apresentado o artigo gerado por esta pesquisa, intitulado **“Diferenciação do leite convencional e orgânico, por análises de isótopos estáveis e de compostos antioxidantes”**, a ser submetido à revista científica *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. O objetivo do trabalho foi distinguir amostras de leite bovino obtidas de sistemas de produção convencional e orgânico, por meio da análise dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, do conteúdo de polifenóis totais e da capacidade antioxidante, com a utilização do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), e investigar o efeito da pasteurização sobre esses compostos antioxidantes.

Referências bibliográficas

ADEGOKE G. O. et al. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. *J Food Sci Technol*, v. 35, n. 4, p. 283-298, 1998.

AOKI, N. et al. Time course of changes in antioxidant activity of milk from dairy cows fed a trehalose-supplemented diet. *Animal Science Journal*, v. 84, n. 1, p. 42-47, 2013.

BADECK, F.-W. et al. Postphotosynthetic fractionation of stable carbon isotopes between plant organs – A widespread phenomenon. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 19, p. 1381-1391, 2005.

BATEMAN, A. S.; KELLY, S. D. Fertilizer nitrogen isotope signatures. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, v. 43, p. 237-247, 2007.

BERGAMO, P. et al. Fat soluble vitamin contents and fatty acid composition in organic and conventional Italian dairy products. *Food Chemistry*, v. 82, n. 4, p. 625-631, 2003.

BOUTTON, T. W. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S. I. (Ed). *Mass Spectrometry of Soils*. New York: Marcel Dekker Inc., p. 47-82, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Lei nº 10.831, de 23 de dezembro de 2003. Dispõe sobre a agricultura orgânica e dá outras providências. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 24 dez. 2003, Seção 1, p. 8.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011. Aprova o Regulamento Técnico para os Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal, bem como as listas de Substâncias Permitidas para uso nos Sistemas Orgânicos de Produção Animal e Vegetal. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 7 out. 2011, Seção 1, p. 4-11.

BRASIL. Decreto nº 7.794, de 20 de agosto de 2012. Institui a Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 21 ago. 2012, Seção 1, p. 4.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, v. 56, p. 317-333, 1998.

BUTLER, G. et al. Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high- and low-input conventional and organic systems: seasonal variation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 88, p. 1431-1441, 2008.

BUTLER, G. et al. Fat composition of organic and conventional retail milk in northeast England. *J Dairy Sci*, v. 94, p. 24-36, 2011.

CAMIN, F. et al. Influence of dietary composition on the carbon, nitrogen, oxygen and hydrogen stable isotope ratios of milk. *Rapid Commun Mass Spectrom*, v. 22, p. 1690-1696, 2008.

CAPUANO, E. et al. Analytical authentication of organic products: an overview of markers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, p. 12-28, 2013.

CHOI, W. J.; RO, H. M.; HOBBIE, E. A. Patterns of natural ^{15}N in soils and plants from chemically and organically fertilized uplands. *Soil Biol Biochem*, v. 35, p. 1493-1500, 2003.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. *Organically produced foods*. Roma: FAO: WHO, 51 pp., 2007.

COMERÓN, E. A.; ANDREO, N. A. Produção, industrialização e comercialização do leite orgânico na Argentina. In: SIMPÓSIO SOBRE SUSTENTABILIDADE DA PECUÁRIA LEITEIRA NO BRASIL, 2., 2000, Goiânia. *Anais...* Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2000.

DE WIT, J. Organic milk quality in the Netherlands: distinguishable from conventional milk? In: QLIF TRAINING AND EXCHANGE WORKSHOP: TOWARDS IMPROVED QUALITY IN ORGANIC FOOD PRODUCTION, 5th, 2009, Driebergen. *Proceedings...* Driebergen: Louis Bolk Instituut, 2009. p. 97-99.

DECKER, E.A. Antioxidant mechanisms. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. *Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p.517-542.

DEL AMOR, F. M.; NAVARRO, J.; APARICIO P. M. Isotopic discrimination as a tool for organic farming certification in sweet pepper. *J Environ Qual*, v. 37, p. 182-185, 2008.

DENIRO, M. J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of carbon isotopes in animals. *Geochim Cosmochim Acta*, v. 42, p.495-506, 1978.

DENIRO, M. J.; EPSTEIN, S. Influence of diet on the distribution of nitrogen isotopes in animals. *GeochimCosmochim Acta*, v. 45, p. 341-351, 1981.

ELLIS, K. A. et al. Comparing the fatty acid composition of organic and conventional milk. *J Dairy Sci*, v. 89, p. 1938-1950, 2006.

FANTI, M. G. N. et al. Contribuição ao estudo das características físico-químicas e da fração lipídica do leite orgânico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 28 (supl.), p. 259-265, dez. 2008.

FLORES, P.; FENOLL, J.; HELLIÄN, P. The feasibility of using $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values for discriminating between conventionally and organically fertilized pepper (*Capsicum annuum* L.). *J Agric Food Chem*, v. 55, p. 5740-5745, 2007.

GHISELLI, A. et al. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 29, n. 11, p. 1106-1114, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. *Free radicals in biology and medicine*. 1985.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. *Produção da Pecuária Municipal 2010*. Rio de Janeiro, v. 39, 2010. 63 p.

KENNEDY, B. V.; KROUSE, H. R. Isotope fractionation by plants and animals: Implications for nutrition research. *Canadian Journal Physioogy and Pharmacology*, v. 68, p. 960-972, 1990.

KNOBBE, N. et al. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet. *Anal Bioanal Chem*, v. 386, p. 104-108, 2006.

LEE, S. J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chem*, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.

LI, W. et al. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. *Nutrition*, v. 25, p. 105-114, 2009.

McLEAN, J. A. et al. Lipid-soluble and water-soluble antioxidant activities of the avian intestinal mucosa at different sites along the intestinal tract. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 141, n. B, p. 366- 372, 2005.

METGES, C.; KEMPE, K.; SCHMIDT, H. L. Dependence of the carbon isotope contents of breath carbon dioxide, milk, serum and rumen fermentation products on the $\delta^{13}\text{C}$ value of food in dairy cows. *Br J Nutr*, v. 63, p. 187-196, 1990.

MOLKENTIN, J. Authentication of organic milk using $\delta^{13}\text{C}$ and the α -linolenic acid content of milk fat. *J Agric Food Chem*, v. 57, p. 785-790, 2009.

MOLKENTIN, J. Applicability of organic milk indicators to the authentication of processed products. *Food Chemistry*, v. 137, p. 25-30, 2013.

MOLKENTIN, J.; GIESEMANN, A. Differentiation of organically and conventionally produced milk by stable isotope and fatty acid analysis. *Anal Bioanal Chem*, v. 388, p. 297-305, 2007.

MOLKENTIN, J.; GIESEMANN, A. Follow-up of stable isotope analysis of organic versus conventional milk. *Anal Bioanal Chem*, v. 398, p. 1493-1500, 2010.

NACZK, M., SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *J Chromatogr A*. 1054 (1/2): 95-111, 2004.

NEVES, M. C. P. et al. Agricultura orgânica: Expandindo o conhecimento. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, dez. 2005. Disponível em: <http://www.cnpab.embrapa.br/imprensa/artigos/expandindo_conhecimento>. Acesso em: 04 de out. 2012.

NIKI, E. Assessment of Antioxidant Capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 49, n. 4, p. 503-515, 2010.

O'CONNELL, J. E.; FOX, P. F. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal*, v. 11, p. 103-120, 2001.

O'LEARY, M. H. Carbon isotope fractionation in plants. *Phytochemistry*, v. 20, p. 553-567, 1981.

PALUPI, E. et al. Comparison of nutritional quality between conventional and organic dairy products: a meta-analysis. *J Sci Food Agric*, v. 92, p. 2774-2781, 2012.

PELEG, H., BODINE, K. K., NOBLE, A. C. The influence of acid on astringency of alum and phenolic compounds. *Chem Senses*, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PORTILHO, F. Consumidores de alimentos orgânicos: discursos, práticas e auto-atribuição de responsabilidade socioambiental. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE ANTROPOLOGIA, 26., 2008, Porto Seguro. *Anais...* Porto Seguro, 2008.

PRESTON, T. The measurement of stable isotope natural abundance variations. *Plant Cell & Environment*, v. 15, n. 9, p. 1091-1097, 1992.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 755-60, 2006.

RAPISARDA, P. et al. Influence of different organic fertilizers on quality parameters and the $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{34}\text{S}$, and $\delta^{18}\text{O}$ values of orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 6, p. 3502-3506, 2010.

RIBEIRO, S.M.R. et al. Efeitos pró e antioxidantes dose-dependente de compostos bioativos. In: COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O. (Org.) *Alimentos funcionais: benéficos para a saúde*. Viçosa: Editora UFV, p. 235-260, 2008.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, *in vitro* assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids – A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 23, n. 7, p. 726-740, 2010.

SAKOWSKI, T. et al. Relationships between physiological indicators in blood, and their yield, as well as chemical composition of milk obtained from organic dairy cows. *J Sci Food Agric*, v. 92, p. 2905-2912, 2012.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, v.8, n.3, p.121-137, 2002.

SANCHO, R. A. S.; PASTORE, G. M. Evaluation of the effects of anthocyanins in type 2 diabetes. *Food Research International*, v. 46, n. 1, p. 378-386, 2012.

SHAHIDI, F., NACZK, M. *Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications*. Lancaster: Technomic, 1995.

SHIBUYA, E. K. et al. Souring Brazilian marijuana by applying IRMS analysis to seized samples. *Forensic Science International*, v. 160, p.35-43, 2006.

SIDERER, Y.; MAQUET, A.; ANKLAM, E. Need for research to support consumer confidence in the growing organic food market. *Trends Food Sci Technol*, v. 16, p. 332-343, 2005.

SIKORA, E. et al. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. *Food Chemistry*, London, v. 107, p. 50-55, 2008.

SOARES, J. P. G. et al. Produção orgânica de leite: desafios e perspectivas. In: *Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira*, 3., 2011, Viçosa. *Simpósio Internacional de Bovinocultura Leiteira*, 1., 2011, Viçosa. *Anais...* Viçosa: 2011.

TOLEDO, P.; ANDRÉN, A.; BJÖRCK, L. Composition of raw milk from sustainable production systems. *International Dairy Journal*, v. 12, n. 1, p. 75-80, 2002.

VOGEL, J. C. Variability of carbon isotope fractionation during photosynthesis. In: EHLERINGER, J. R.; HALL, A. E.; FARQUHAR, G. D. (Ed). *Stable isotopes and plant carbon-water relations*. San Diego, CA: Academic Press Inc., 1993. cap. 4.

WERNER, R. A.; SCHIMIDT, H. L. The in vivo nitrogen isotope discrimination among organic plant compounds. *Phytochemistry*, v.61, p.465-784, 2002.

CAPÍTULO II

Diferenciação do leite convencional e orgânico, por análises de isótopos estáveis e de compostos antioxidantes

DIFERENCIAÇÃO DO LEITE CONVENCIONAL E ORGÂNICO, POR ANÁLISES DE ISÓTOPOS ESTÁVEIS E DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Resumo

A demanda por alimentos orgânicos tem crescido nitidamente nos últimos anos, sobretudo pelos produtos lácteos. Logo, técnicas que permitam a autenticação dos mesmos são de grande importância para o consumidor assegurar-se de que está ingerindo um alimento genuinamente orgânico. Desta forma, o objetivo deste estudo foi diferenciar amostras de leites bovinos produzidos em sistemas convencional e orgânico, por meio das razões isotópicas de carbono e nitrogênio, do teor de polifenóis totais e da capacidade antioxidante, além de investigar o efeito da pasteurização sobre esses compostos antioxidantes. Oito amostras de leite cru foram colhidas de quatro fazendas (duas convencionais – Conv 1 e 2 – e duas orgânicas – Org 1 e 2) e uma porção de cada uma foi submetida à pasteurização lenta. Amostras cruas e pasteurizadas foram congeladas, liofilizadas e moídas para a condução das análises. Houve diferença ($p < 0,05$) entre todas as fazendas para ambos os isótopos, exceto entre Org 1 e Conv 2 para $\delta^{13}\text{C}$, e entre Org 1 e Conv 1 para $\delta^{15}\text{N}$. Para polifenóis, houve diferença ($p < 0,05$) entre as fazendas convencionais, mas não entre as orgânicas, sendo que, entre sistemas distintos, houve diferença entre Conv 1 e Org 2 e entre Conv 2 e Org 1. A pasteurização não afetou ($p > 0,05$) o teor de polifenóis dos leites. A análise de componentes principais permitiu uma distinção mais clara entre todas as fazendas, sendo a razão isotópica de nitrogênio a variável que mais contribuiu para a distinção.

Palavras-Chave: carbono-13, nitrogênio-15, análise de componentes principais, catequina, pasteurização, cinética.

DIFFERENTIATION OF CONVENTIONAL AND ORGANIC MILK, BY ANALYSIS OF STABLE ISOTOPES AND ANTIOXIDANTS COMPOUNDS

Abstract

The demand for organic food has increased sharply in recent years, especially for dairy products. Therefore, procedures for their authentication have a great importance for consumers to assure that food they are purchasing is genuinely organic. Thus, the aim of this study was to differentiate bovine milk samples produced in organic and conventional systems, by stable isotopes ratios of carbon and nitrogen, total polyphenols content and antioxidant capacity, in addition to investigate the effect of pasteurization on these antioxidant compounds. Eight samples of raw milk were collected from four farms (two conventional – Conv 1 and 2 – and two organic – Org 1 and 2) and a portion of each one was subjected to slow pasteurization. Raw and pasteurized samples were frozen, freeze-dried and ground for the conduct of analyzes. There were differences ($p < 0.05$) between all farms for both isotopes, except between Org 1 and Conv 2 for $\delta^{13}\text{C}$, and between Org 1 and Conv 1 for $\delta^{15}\text{N}$. For polyphenols, there were differences ($p < 0.05$) between conventional farms, but not between organic farms, and about distinct systems, there were differences between Conv 1 and Org 2 and between Conv 2 and Org 1. The pasteurization did not affect ($p > 0.05$) the polyphenol content in milk. Principal component analysis allowed a clearer distinction between all farms, and stable nitrogen isotope ratio was the variable that most contributed to the distinction.

Key words: carbon-13, nitrogen-15, principal components analysis, catechin, pasteurization, kinetics.

Introdução

A preocupação com alimentos seguros, isentos de contaminantes agrícolas e veterinários, associada à crescente consciência do consumidor com a sustentabilidade e o bem-estar animal têm impulsionado a produção de alimentos orgânicos em todo o mundo. Soares et al. (2011) afirmaram que questões relativas à preservação do meio ambiente e da biodiversidade e ao papel social da atividade agropecuária, gerando empregos no campo e diminuindo o êxodo rural, também são consideradas pelos consumidores na escolha por alimentos orgânicos.

O leite é largamente produzido e consumido, por se um alimento bastante completo e permitir a fabricação de diversos tipos de derivados. Aos poucos, ele tem ganhado espaço no mercado de alimentos orgânicos, sendo que, no Brasil, sua representatividade aumentou de 0,01%, em 2005, para 0,02%, em 2010, da produção total de leite (SOARES et al., 2011).

Soares (2009) afirmou que a produção orgânica de leite pode ser uma das alternativas para a obtenção um produto livre de resíduos, com maior valor agregado e que, embora atenda um pequeno mercado, este é composto por consumidores dispostos a pagar a mais pelo produto. Diante disso, torna-se necessário o estudo de técnicas que possam comprovar a autenticidade de um produto lácteo orgânico, de forma a assegurar ao consumidor a qualidade do alimento ingerido, além de se obter uma ferramenta importante em seu processo de certificação.

A técnica dos isótopos estáveis tem se mostrado bastante promissora na determinação da procedência e qualidade de produtos de origem animal e vegetal. A espectrometria de massas de razões isotópicas tem sido utilizada com sucesso em certas regiões produtoras de alimentos para verificar a autenticidade dos mesmos no que diz respeito a sua origem geográfica e a adulterações (KNOBBE et al., 2006).

Alguns autores já conseguiram aplicar a técnica para diferenciar alimentos orgânicos de convencionais, tanto de origem vegetal (BATEMAN et al., 2007; CAMIN et al., 2011; RAPISARDA et al., 2010; ROGERS, 2008), como animal (BAHAR et al., 2008; ROGERS, 2009; SCHMIDT et al., 2005), especificamente, para autenticação do leite orgânico e seus derivados (MOLKENTIN e GIESEMANN, 2010; MOLKENTIN, 2013; CHUNG et al., 2014).

Os isótopos estáveis são eficientes indicadores de autenticidade para alimentos orgânicos, sobretudo se associados a outros parâmetros analíticos (CAPUANO et al., 2013). Butler et al. (2008) afirmaram que a composição química do leite, por exemplo, pode variar conforme o tipo de sistema de produção adotado. A partir de estudo da variação sazonal na concentração de ácidos graxos e antioxidantes lipossolúveis de leites produzidos em sistemas orgânicos e convencionais (confinados e extensivos), os autores concluíram que a composição e a qualidade nutricional do leite são afetadas pelo sistema de produção por mecanismos provavelmente relacionados à frequência de pastejo, à sazonalidade da forrageira e à composição da dieta.

Kuhnen et al. (2014) avaliaram o teor de polifenóis totais em leites de sistemas agroecológicos, os quais apresentaram valores semelhantes ou menores que leites de sistemas convencionais (semi-intensivo e extensivo), provavelmente devido a diferenças entre a taxonomia dos vegetais utilizados nas dietas e os sistemas de gestão (manejo) empregados.

Os polifenóis estão entre os antioxidantes mais ativos e amplamente distribuídos no reino vegetal, sendo os flavonoides o subgrupo mais relevante. De acordo com Manach et al. (2004), dentre os numerosos efeitos biológicos dessas substâncias, destacam-se o sequestro de espécies radiculares de oxigênio, modulação da atividade de algumas enzimas específicas, inibição da proliferação celular e potencial como agente antibiótico, antialérgico e anti-inflamatório.

O consumo do leite in natura bem como seu uso para fabricação de derivados lácteos só podem ocorrer após emprego de algum tratamento térmico que reduza da contaminação microbiológica a níveis aceitáveis, garantindo a inocuidade do alimento. Por isso, é proibida a venda de leite cru para consumo direto da população, em todo o território nacional (BRASIL, 1969). A pasteurização consiste em um processamento térmico em que as temperaturas alcançadas e seu tempo de exposição permitem eliminar os microrganismos patogênicos associados ao alimento (POTTER e HOTCHKISS, 1995). Logo, é relevante investigar se ela influencia a composição do leite.

Para uma melhor avaliação de parâmetros analíticos objetivando a autenticação do leite orgânico, é necessária a comparação conjunta das variáveis, conseguida por intermédio da análise de componentes principais (PCA), já que um dos objetivos da técnica é avaliar a importância de cada variável e promover a eliminação daqueles que

contribuem pouco, em termos de variação, no grupo de indivíduos avaliados (CRUZ, 1990). De acordo com Varella (2008), a PCA é uma técnica da estatística multivariada que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais (PC). Os componentes principais são uma combinação linear de todas as variáveis originais, são independentes entre si e estimados com o propósito de reter, em ordem de estimação, o máximo de informação, em termos da variação total contida nos dados. Segundo o mesmo autor, a PCA é associada à ideia de redução de massa de dados, com menor perda possível da informação e agrupa os indivíduos de uma população segundo a variação das características que os definem.

O objetivo da presente pesquisa foi distinguir amostras de leite bovino obtidas de sistemas de produção convencional e orgânico, por meio da análise dos isótopos estáveis de carbono e nitrogênio, do conteúdo de polifenóis totais e da capacidade antioxidante, com a utilização do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). O efeito da pasteurização sobre os compostos antioxidantes também foi investigado.

Material e métodos

Amostragem

O estudo foi conduzido na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Botucatu/SP, sendo que as amostras analisadas foram obtidas de propriedades particulares produtoras de leite bovino, da região de Botucatu/SP, sendo duas de produção convencional (Conv 1 e Conv 2) e duas de produção orgânica (Org 1 e Org 2), ambas certificadas pelo IBD Certificações. De acordo com informações fornecidas pelos seus respectivos proprietários, durante o período de colheita de amostras, os sistemas estão brevemente descritos a seguir:

Conv 1 possuía 23 vacas em lactação, de um total de, aproximadamente, 40 animais, predominantemente da raça Girolanda. Eram mantidas em pastagem de braquiária, à qual era eventualmente jogado chorume (dejetos líquidos provenientes da lavagem da sala de ordenha, sendo composto por água, fezes e urina). Quase não se fornecia ração e/ou outro suplemento, às vezes durante a ordenha. Era realizada apenas

uma ordenha por dia, pela manhã, o que gerava uma produção média diária de 180 a 200 L de leite.

Conv 2 apresentava pouco mais de 100 vacas lactentes, de um total de 130 animais, das raças $\frac{3}{4}$ Holandesa e Simbrasil. A alimentação dos animais era composta por pastagem de mombaça, adubada com fertilizante sintético NPK (fórmula 20.05.20), e por silagem de milho, polpa cítrica, caroço de algodão e ração comercial, fornecidos em cochos. Os animais eram ordenhados duas vezes ao dia, gerando uma produção média diária de 2.200 L de leite.

Org 1 possuía em torno de 25 vacas na ordenha, de um total de 45 animais, das raças Girolanda e Holandesa. Elas eram mantidas em pastos de braquiária e tifton, adubados com biofertilizantes (adubo orgânico líquido fermentado) e esterco produzidos na própria fazenda. Recebiam no cocho, logo após a ordenha, silagem de milho e aveia em grãos. Era realizada uma única ordenha diária, no período da manhã, resultando em uma produção média de 250 L de leite por dia.

Org 2 apresentava 45 vacas em lactação, de um total de 60 animais, predominantemente da raça Girolanda, as quais permaneciam em pastagem de braquiária adubada com biofertilizantes e esterco, complementada com concentrado de farelo de cevada, farelo de girassol e farelo de arroz. As duas ordenhas realizadas por dia resultavam em uma produção média diária de leite em torno de 520 L.

A aplicação dos isótopos estáveis foi avaliada sob duas amostragens distintas, enquanto a análise dos compostos antioxidantes, apenas pela segunda amostragem.

Na primeira, amostras de leite cru foram colhidas de dez vacas escolhidas aleatoriamente da fazenda Conv 1 e de dez vacas da fazenda Org 2. A amostra foi obtida da ordenha manual de um dos tetos dos animais, após realizado o *pré-dipping* (desinfecção dos tetos), sendo que os primeiros jatos de leite foram descartados. Foram colhidos, aproximadamente, 200 mL de leite de cada vaca em copos plásticos descartáveis, os quais foram coados em filtro de TNT (tecido não tecido) antes do acondicionamento em potes coletores universais de amostras.

Na segunda amostragem, foram adquiridas oito amostras de leite bovino cru – uma por semana – das quatro fazendas citadas, durante os meses de dezembro de 2013 e janeiro de 2014. O período de colheita ficou restrito a apenas dois meses para minimizar o efeito de sazonalidade, de forma que ele não interfira nem nos sinais isotópicos, como

demonstrado por Molkentin e Giesemann (2010), nem na composição química do leite, demonstrado por Fanti et al. (2008). As amostras de, aproximadamente, 1,5 litros cada foram colhidas com o auxílio de uma caneca e uma concha, ambas revestidas por saco plástico descartável, diretamente do tanque de resfriamento (Conv 2 e Org 2) ou de latões de leite (Conv 1 e Org 1), conforme a disponibilidade de cada fazenda. Antes das colheitas, o leite era homogeneizado pelas lâminas de agitação nos tanques ou manualmente nos latões por alguns minutos. As amostras foram acondicionadas inicialmente em garrafas plásticas para facilitar o transporte.

Isótopos estáveis

Para a determinação das razões isotópicas, os leites crus de ambas as amostragens foram coados em filtro de pano e distribuídos em potes coletores universais de amostras. Em seguida, foram congelados a -18°C para posterior liofilização (Liotop® Model L108; Liobras, São Carlos, SP, Brasil), a -55°C e pressão de 50 μHg , durante 120 horas. O leite liofilizado foi colocado em moinho criogênico de esferas (Model Geno/Grinder 2010; Spex SamplePrep LLC, Metuchen, NJ, EUA), em frequência de 700 rpm, durante 2 minutos, para completa homogeneização e redução da granulometria (μm).

As análises foram procedidas no Centro de Isótopos Estáveis Ambientais do Instituto de Biociências/UNESP Botucatu. Em balança analítica de alta sensibilidade (Modelo MX5; Mettler Toledo, Suíça), as amostras foram pesadas em cápsulas de estanho, utilizando as massas de 80 a 120 μg para o carbono e 4000 a 4500 μg para o nitrogênio. As cápsulas foram inseridas pelo amostrador automático do analisador elementar (Flash 2000 Organic Elemental Analyzer EA for IRMS; Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Alemanha), no qual sofrem combustão para formação de gases. Estes foram analisados no espectrômetro de massas de razão isotópica (Delta V Advantage IRMS Model Finnigan DELTA-V; Thermo Fisher Scientific Inc., Bremen, Alemanha) para determinação da composição isotópica das amostras.

Os valores foram expressos em notação delta per mil (δ ‰) relativos aos padrões internacionais PeeDee Belemnite (PDB) para o ^{13}C e nitrogênio do ar atmosférico para o ^{15}N , de acordo com a seguinte equação:

$$\delta_{(\text{amostra,padrão})} = \frac{R_{\text{amostra}} - R_{\text{padrão}}}{R_{\text{padrão}}} \times 1000$$

R é a razão entre o isótopo menos abundante pelo mais abundante, ou seja, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ e $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ e, portanto, é adimensional.

Compostos antioxidantes

Para as análises bioquímicas, os leites crus da segunda amostragem foram coados em filtro de pano e 0,5 litro de cada amostra foi submetido à pasteurização lenta, na qual o leite era aquecido até atingir 65°C e mantido sob essa temperatura por 30 min, com agitação constante, para, então, ser resfriado bruscamente até 4°C. Em seguida, as amostras de leite cru e pasteurizado foram distribuídas em potes coletores universais de amostras, os quais foram congelados a -18°C para posterior liofilização, como especificado no subitem anterior. O leite liofilizado foi macerado com o auxílio de um pistilo para melhor homogeneização.

As análises foram procedidas no laboratório do Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências/UNESP Botucatu. A extração dos compostos antioxidantes foi realizada de acordo com o método descrito por Li et al. (2009), com algumas modificações. A extração se deu a partir de uma solução de HCl (1N) : etanol 99% v/v (15:85). Em tubos de centrífuga, foram pesados, aproximadamente, 200 mg de amostra de leite liofilizado e adicionados 4 mL dessa solução. Em seguida, foram homogeneizados em agitador para tubos tipo vortex e mantidos em banho ultrassônico por uma hora, sendo que, a cada dez minutos, eram agitados novamente. Por fim, os tubos foram centrifugados a 6.000 rpm, a 5°C, durante 15 minutos. O sobrenadante líquido foi recolhido e acondicionado a -18°C, protegido da luz.

Para determinação do conteúdo de polifenóis totais, foi utilizado o método espectrofotométrico com o uso do reativo de Folin-Ciocalteau (SINGLETON e ROSSI, 1965), com as mudanças descritas por Li et al. (2009). Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi transferida para tubo de ensaio, juntamente com 1,9 mL do reagente Folin-Ciocalteau diluído 10 vezes e 1,9 mL de solução de carbonato de sódio a 6% (p/v). Após 1 hora de reação (completa precipitação do carbonato), foi realizada a leitura de absorbância a 725 nm. A análise foi feita em triplicata e os resultados foram expressos em mg Eq. catequina x 100 g⁻¹ leite liofilizado.

Para demonstrar a capacidade antioxidante dos leites, análises realizada em apenas uma amostra escolhida aleatoriamente, tanto crua, como pasteurizada, de cada fazenda, foi utilizado o método do DPPH, de acordo com Brand-Williams et al. (1995), adaptado por Li et al. (2009). Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante foi reagida com 3,8 mL de uma solução de DPPH a 60 µmol/L em etanol 99%. A leitura de absorbância em espectrofotômetro foi realizada a 515 nm, a cada 10 minutos, durante 90 minutos para registrar a cinética da atividade antioxidante. Esta foi feita em triplicata e calculada pela seguinte equação:

$$\text{DPPH reduzido (\%)} = \frac{\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_t}{\text{Abs}_{t=0}} \times 100$$

Análise estatística

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado e os dados avaliados por análise de variância ($p < 0,05$), em ambas as amostragens, sendo que na primeira, havia dois tratamentos (convencional e orgânico), com dez repetições (vacas) cada um, e na segunda amostragem, quatro tratamentos (fazendas), com oito repetições (colheitas) cada um. Para comparação entre as médias dos tratamentos, foi aplicado teste de Tukey, para razões isotópicas de carbono e nitrogênio, e teste de Fisher, para teor de polifenóis, ambos com nível de significância de 5%. Foi procedida também análise de componentes principais (PCA), com os valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ da primeira amostragem e com $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e teor de polifenóis no leite cru da segunda amostragem. Foi utilizado o software estatístico Minitab® 16 (2010).

Resultados e discussão

Isótopos estáveis

Os valores médios obtidos para $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ dos leites da primeira e da segunda amostragens estão expressos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente. Na primeira, foi possível distinguir os leites apenas pelo $\delta^{15}\text{N}$, que se apresentou maior ($p < 0,05$) para o orgânico. Isso pode ser explicado pela utilização da adubação orgânica nas pastagens da fazenda orgânica. Segundo o proprietário da convencional, é lançado chorume sobre as pastagens, mas esta não é uma prática regular, fazendo com que o sinal isotópico de

nitrogênio da dieta seja menor, o que é refletido no leite. É possível, ainda que a colheita dessas amostras tenha sido bem depois da última vez que o chorume havia sido lançado, um tempo suficiente para que o sinal fosse decaindo.

Tabela 1. Razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) dos leites convencional e orgânico da primeira amostragem

Sistema de produção	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
Convencional	$-15,21 \pm 0,85$ a	$3,47 \pm 0,25$ b
Orgânico	$-15,17 \pm 0,59$ a	$4,31 \pm 0,19$ a

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

A não observação de diferença para o carbono-13 denota que as dietas dos animais provavelmente apresentavam semelhanças quanto às proporções de plantas C_3 e C_4 , o que é obviamente possível mesmo em diferentes sistemas de produção. Ambas as fazendas apresentavam criação extensiva, ou seja, os animais eram mantidos em pastagem durante a maior parte do tempo. Isso condiz com os valores encontrados, já que as espécies vegetais empregadas como pasto são, nos dois casos, plantas C_4 , as quais apresentam um $\delta^{13}\text{C}$ entre -9 e -16‰ (BOUTTON, 1996; VOGEL, 1993).

Tabela 2. Razões isotópicas de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$) dos leites das fazendas convencionais (Conv 1 e Conv 2) e orgânicas (Org 1 e Org 2) da segunda amostragem

Fazenda	$\delta^{13}\text{C}$ (‰)	$\delta^{15}\text{N}$ (‰)
Conv 1	$-16,77 \pm 0,71$ a	$8,46 \pm 0,66$ a
Conv 2	$-20,58 \pm 0,34$ c	$5,63 \pm 0,29$ c
Org 1	$-19,99 \pm 1,03$ c	$8,63 \pm 0,46$ a
Org 2	$-18,12 \pm 0,79$ b	$7,28 \pm 0,41$ b

Valores expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Na segunda amostragem, pode-se notar que houve diferença entre as duas fazendas de mesmo sistema de produção, para ambas as variáveis. Além disso, não houve diferença entre Conv 2 e Org 1 para $\delta^{13}\text{C}$ e Conv 1 e Org 1 para $\delta^{15}\text{N}$. Isso mostra que as impressões isotópicas no leite refletem o tipo de manejo adotado no sistema, ou

seja, existem diferenças entre fazendas de mesmo sistema de produção e semelhanças entre fazendas de diferentes sistemas, já que o carbono-13 e o nitrogênio-15 no leite são reflexo da dieta animal e das condições de solo e adubação da pastagem.

As diferenças entre as fazendas convencionais foram mais acentuadas que as diferenças entre as orgânicas. Isso pode ser explicado pelo fato da Conv 1 ter sido uma propriedade rural de pequeno porte, pouco tecnificada, baixo número de animais e sem um planejamento nutricional, realidade completamente oposta à Conv 2, na qual os animais ficavam semi-confinados, a ordenha era inteiramente mecanizada e existia um controle e planejamento do manejo nutricional, sanitário e de cruzamentos genéticos. Já as fazendas orgânicas eram estruturalmente mais semelhantes uma a outra, sendo as peculiaridades de manejo a causa para os diferentes valores de $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$.

Pelo fato da Conv 2 ser um sistema produtivo com um maior controle sobre todo o manejo dos animais, os desvios padrões das médias foram os menores, denotando uma uniformidade maior entre as vacas, percebida também no leite produzido por elas.

Os valores de $\delta^{13}\text{C}$ da Org 1 obtidos da primeira à última colheita foram, nesta ordem: -20,94‰, -20,99‰, -20,89‰, -20,66‰, -18,90‰, -18,34‰, -19,84‰, -19,37‰. É possível perceber nitidamente que entre a quarta e quinta colheitas houve aumento no valor, o que deve ter sido reflexo de alguma mudança na alimentação dos animais, justificando o maior desvio padrão deste parâmetro para a Org 1.

Sua média não se diferenciou da Conv 2, sendo que elas apresentaram os menores valores obtidos. Isso condiz com a utilização em ambas as fazendas de fontes de plantas C_3 (aveia na Org 1 e polpa cítrica e caroço de algodão na Conv 2) na dieta total dos animais, como relatado pelos proprietários. Os animais da Org 2 também eram alimentados com fontes C_3 (farelos de cevada, de girassol e de arroz), porém, provavelmente em menores proporções que as outras duas.

A maior média observada foi a da Conv 1, o que condiz com as informações fornecidas pelo proprietário de que os animais permaneciam exclusivamente em pastagem (C_4), a qual possui um valor de enriquecimento isotópico relativo maior, praticamente nenhuma fonte de planta C_3 .

Molkentin e Giesemann (2010) e Chung et al. (2014) encontraram valores mais baixos para $\delta^{13}\text{C}$ ao avaliarem leites convencionais e orgânicos comprados no varejo. Os primeiros autores encontraram valores de -26,09 a -23,25‰ para o convencional e de -

30,33 a -26,71‰ para o orgânico, na gordura do leite. Chung et al. (2014) encontraram as médias -23.60‰ para o leite convencional e -22.39‰ para o orgânico. Como essas pesquisas foram realizadas na Alemanha e na Coreia, respectivamente, os baixos valores de $\delta^{13}\text{C}$ são explicados pelo fato de serem países de clima temperado, onde se predomina o cultivo de plantas C_3 destinadas à alimentação animal.

Quanto ao $\delta^{15}\text{N}$, as fazendas orgânicas apresentaram os maiores valores, explicados pela utilização constante de adubação orgânica das pastagens com biofertilizantes e esterco, prática preconizada para a produção animal orgânica, como relatado pelos proprietários.

A Conv 2 apresentou o valor mais baixo ($\delta^{15}\text{N} = 5,63 \pm 0,29$), pois a adubação utilizada nas pastagens era feita com fertilizantes sintéticos, os quais apresentam $\delta^{15}\text{N}$ entre -6 e 6‰ (BATEMAN e KELLY, 2007). Já para a Conv 1, o valor foi mais próximo ao das fazendas orgânicas, não havendo diferença da Org 1. Muito provavelmente, isso se deva ao chorume jogado sobre as pastagens, o que pode ter ocorrido pouco antes do início das colheitas, aumentando o sinal isotópico de nitrogênio das pastagens, refletido, posteriormente, no leite.

Molkentin e Giesemann (2010) encontraram valores de $\delta^{15}\text{N}$ entre 4,70 e 6,38‰ no leite convencional e entre 3,92 e 5,35‰ no orgânico, enquanto Chung et al. (2014) obtiveram valores médio de 5,70‰ para o leite convencional e 5,00‰ para o orgânico. Em ambos os trabalhos, os autores afirmaram que os menores valores nos leites orgânicos provavelmente se deveram à inclusão de leguminosas, fixadoras de nitrogênio do ar ($\delta^{15}\text{N} = 0$ ‰), nas dietas das vacas de sistema orgânico. Já no presente trabalho, nenhum dos proprietários alegou fornecer fontes de plantas leguminosas nas dietas dos animais.

As diferenças entre as pesquisas possibilitam inferir que existe muita variação dos padrões de produção orgânica entre diferentes países ou regiões do mundo, não sendo correto generalizar valores ou fixar intervalos fechados para distinguir o leite orgânico do convencional. Logo, como um modelo de classificação global para distinção entre alimentos orgânicos e convencionais não pode ser determinado, a sua validade deve ser temporalmente ou espacialmente restrita (CAPUANO et al., 2013).

Compostos antioxidantes

As médias encontradas para os teores de compostos polifenólicos totais estão demonstradas na Tabela 3. Não houve diferença significativa entre os leites crus e os pasteurizados.

Tabela 3. Conteúdo de polifenóis totais (mg Eq. catequina/100 g) dos leites crus e pasteurizados das fazendas convencionais (Conv 1 e Conv 2) e orgânicas (Org 1 e Org 2)

Fazenda	Cru	CV (%)	Pasteurizado	CV (%)
Conv 1	108,22 ± 6,39 a	5,90	110,55 ± 6,65 a	6,02
Conv 2	100,29 ± 8,04 c	8,01	100,31 ± 10,78 b	10,75
Org 1	106,91 ± 5,18 ab	4,84	106,15 ± 5,87 ab	5,53
Org 2	101,62 ± 3,90 bc	3,84	101,80 ± 5,46 b	5,37

Valores expressos em média ± desvio padrão.

CV: coeficiente de variação.

Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$), pelo teste de Fisher.

Tanto para as amostras cruas, como para as pasteurizadas, não foi observada diferença entre as fazendas orgânicas. Partindo do pressuposto que os animais não sintetizam compostos fenólicos – apenas vegetais o fazem –, sua presença no leite provavelmente se deve à ingestão desses compostos pela dieta. Como as fazendas orgânicas eram bastante semelhantes quanto à estrutura, ao manejo alimentar dos animais e às práticas de produção, é muito provável que as dietas fossem semelhantes quanto ao teor de compostos polifenólicos. Vale lembrar também que, por serem certificadas, devem respeitar as mesmas normas e legislações vigentes que tratam sobre a pecuária orgânica, as quais exigem que a alimentação dos animais seja orgânica em quase sua totalidade.

Isso já não foi observado entre as amostras convencionais, de forma que a Conv 1 apresentou as maiores médias e a Conv 2, as menores. Isso pode ser reflexo da diferença entre as realidades de ambas: enquanto a Conv 1 era uma propriedade rural de criação extensiva, pequeno porte e pouco tecnificada, a Conv 2 apresentava produção intensiva, com bom planejamento do manejo alimentar e maior estrutura, fazendo com que as dietas totais dos animais fossem bem distintas uma da outra.

Com exceção da Org 2, as demais fazendas apresentaram um valor de polifenóis condizente com o tempo de pastagem e, conseqüentemente, volume de matéria verde

ingerido pelos animais. Ou seja, a Conv 2 apresentou os menores valores, pois a maior parte da dieta das vacas não provinha das pastagens já que também era fornecida silagem de milho como alimento volumoso além do pasto. Já na Conv 1 e Org 1, que apresentaram os maiores valores, os animais eram mantidos por mais tempo em pastejo. Apesar de o pasto ser a única fonte de volumoso aos animais da Org 2, ela apresentou valores de polifenóis semelhantes aos da Conv 2, por motivos não elucidados nesta pesquisa. Por outro lado, não foi observada diferença entre a Org 1 e Org 2 também.

A partir disso, percebe-se que o tipo de sistema de produção empregado na fazenda pode alterar o teor de polifenóis do leite, sendo que pode existir uma relação entre o tempo de pastejo e, portanto, ingestão de matéria verde, com o conteúdo de compostos polifenólicos.

Li et al. (2009) encontraram valores entre 329 e 797 mg Eq. ácido ferúlico/kg de leite materno liofilizado. Já nesta pesquisa, os valores para o leite convencional variaram de 1.002,9 a 1.105,5 mg/kg e para o orgânico, de 1.016,2 a 1.069,1 mg/kg. Está evidente o maior conteúdo de compostos fenólicos no leite bovino.

A não observação de diferença entre as amostras cruas e pasteurizadas para todas as fazendas mostra que o processo de pasteurização não altera o teor de compostos fenólicos no leite, o que é bastante desejável, já que a inocuidade desse alimento pode ser obtida sem depreciar seu conteúdo de fenóis.

A Figura 1 apresenta as cinéticas das atividades antioxidantes de uma amostra de leite, tanto crua, quanto pasteurizada, de cada uma das quatro fazendas.

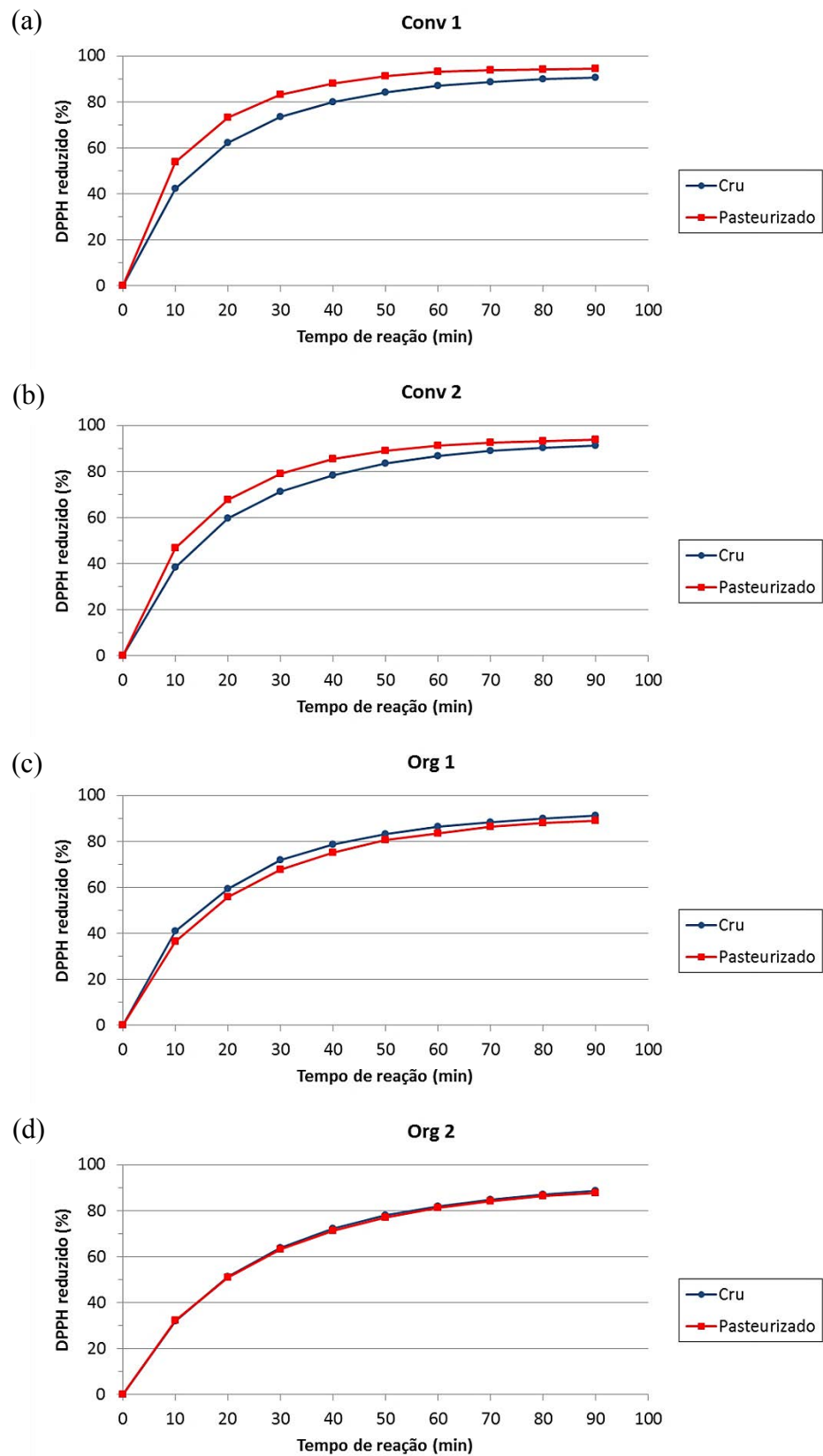


Figura 1. Cinéticas das atividades antioxidantes de uma amostra (crua e pasteurizada) das fazendas Conv 1 (a), Conv 2 (b), Org 1 (c) e Org 2 (d), usando o DPPH.

Pela observação dos gráficos, é possível perceber que todas as amostras, a partir de 60 minutos, alcançaram a atividade antioxidante total, ponto onde todos os radicais livres de DPPH foram reduzidos e, conseqüentemente, a velocidade da reação atingiu uma constância.

Li et al. (2009) avaliaram a cinética da redução do DPPH em leite humano, determinando, também aos 60 minutos de reação, a atividade antioxidante total, a qual variou de 52,8 a 61,2%. Estes valores estão bem abaixo dos encontrados nesta pesquisa, sendo que as amostras convencionais estiveram entre 86,7 e 93,1% e as orgânicas, entre 81,1 e 86,3%, sugerindo um maior poder antioxidante do leite bovino, em comparação ao humano.

As amostras convencionais pareceram apresentar um comportamento semelhante entre si: a velocidade de reação da pasteurizada mostrou-se levemente maior, bem como seu poder antioxidante total. As amostras orgânicas também pareceram se assemelhar, no entanto, nesse caso, as cinéticas das amostras cruas e pasteurizadas são mais semelhantes entre si. Dessa forma, existe uma aparente diferença entre as fazendas convencionais e as orgânicas.

Pode-se perceber também que a pasteurização não deve ter interferido negativamente na capacidade antioxidante do leite.

Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (PCA) redistribuiu a variação observada nas variáveis de forma a se obter um conjunto de eixos ortogonais não correlacionados, sendo que a primeira componente (PC₁, eixo x) explica a maior parte da variabilidade original dos dados e a segunda componente (PC₂, eixo y), a segunda maior parte. Nos gráficos, foi possível visualizar claramente a separação do leite orgânico e convencional da primeira amostragem (Figura 2) e das fazendas da segunda amostragem (Figura 3) em grupos de respostas distintos.

Na primeira amostragem (Tabela 4), a PC₁, que respondeu por 68,4% da variância total dos dados, possuiu maior representação da variável $\delta^{13}\text{C}$ e a PC₂, da variável $\delta^{15}\text{N}$. Por isso, pela observação do gráfico (Figura 2), a distinção entre os sistemas de produção deu-se pela PC₂, já que, pela ANOVA, houve diferença para $\delta^{15}\text{N}$.

Tabela 4. Dados gerados pela análise de componentes principais da primeira amostragem

Componentes principais	Variância (%)	Coeficiente de ponderação associado	
		$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
PC ₁	68,4	1,000	0,018
PC ₂	31,6	-0,018	1,000

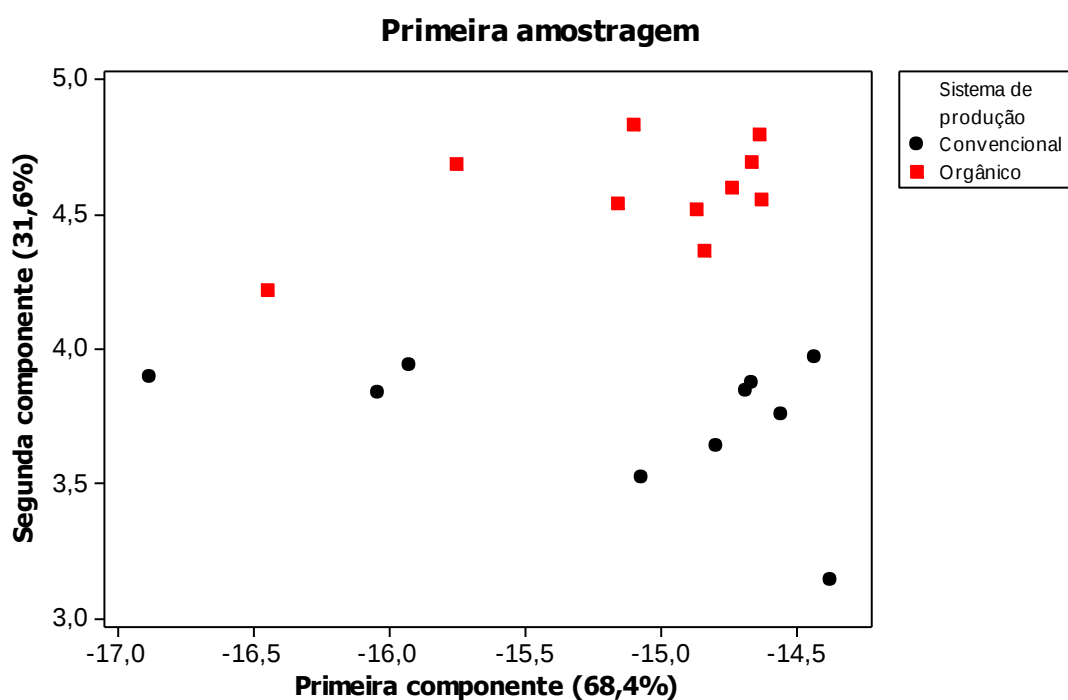


Figura 2. Análise de componentes principais das variáveis $\delta^{13}\text{C}$ e $\delta^{15}\text{N}$ no leite convencional e orgânico da primeira amostragem.

Houve uma concentração dos dados em ambos os grupos de resposta na porção direita do gráfico e uma dispersão de apenas algumas amostras. Como a colheita das amostras foi feita por vaca, pode-se inferir que existe um agrupamento maior de animais que apresenta valores em torno da média e poucos que apresentam valores mais discrepantes, evidenciando as variações individuais.

Já na segunda amostragem (Tabela 5), a PC₁, que explicou 54,5% da variabilidade dos resultados, teve maior contribuição da variável $\delta^{15}\text{N}$ e a PC₂, da variável polifenóis. Juntas, as componentes explicaram 79,3% da variabilidade, denotando a relevância do $\delta^{15}\text{N}$ e do teor de polifenóis na distinção entre as fazendas.

Tabela 5. Dados gerados pela análise de componentes principais da segunda amostragem

Componentes principais	Variância (%)	Coeficiente de ponderação associado		
		$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$	Polifenóis
PC ₁	54,5	0,564	0,611	0,554
PC ₂	24,8	-0,673	-0,048	0,738
PC ₃	20,7	-0,478	0,79	-0,385

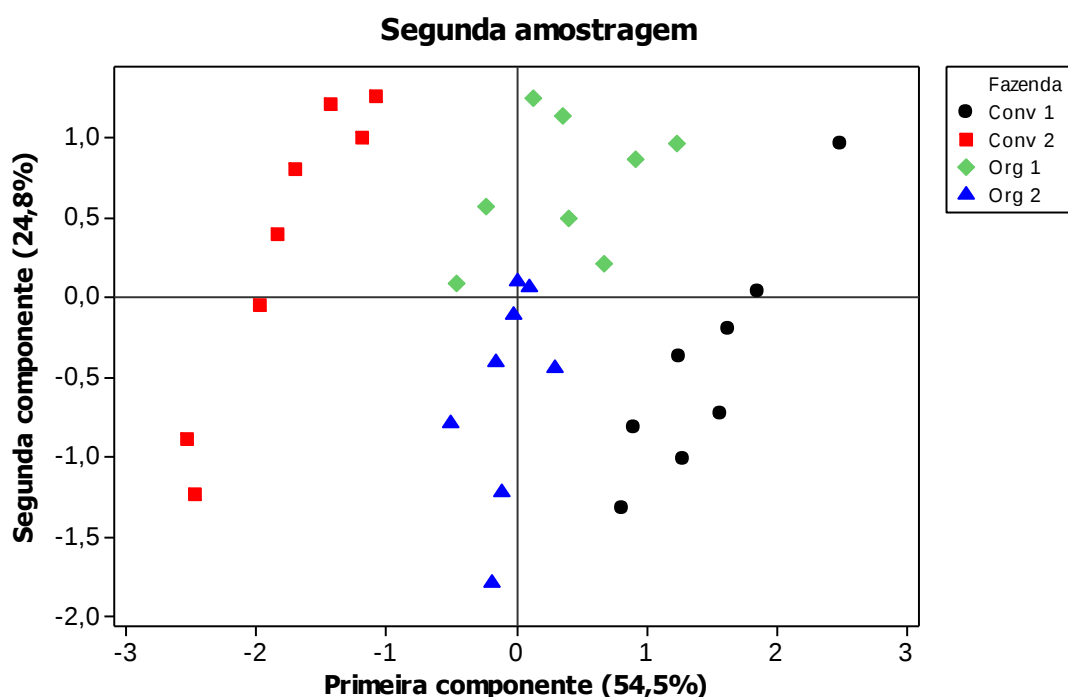


Figura 3. Análise de componentes principais das variáveis $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^{15}\text{N}$ e polifenóis nos leites das fazendas convencionais (Conv 1 e 2) e orgânicas (Org 1 e 2) da segunda amostragem.

Nota-se que a PC₁ distinguiu as duas fazendas orgânicas das convencionais. Em outras palavras, o $\delta^{15}\text{N}$ foi a característica de maior peso na diferenciação dos sistemas de produção. A PC₂ distinguiu a Org 1 da Org 2, ou seja, o teor de polifenóis foi a característica que mais contribuiu para isso.

É visível também maior proximidade entre as fazendas orgânicas e maior distância entre as convencionais. Devido a legislações específicas que tratam da produção orgânica, dos manejos com os animais, de insumos proibidos e permitidos, é mais comum que propriedades rurais orgânicas adotem práticas semelhantes, existindo uma uniformidade maior entre elas, do que entre as convencionais.

A proximidade da Conv 1 com as fazendas orgânicas indica que ela apresenta mais semelhanças com o sistema orgânico, apesar de não adotar esse modelo de produção. Na Conv 1, a criação era extensiva, ou seja, os animais ficavam exclusivamente em pasto. O mesmo ocorria com as fazendas orgânicas, com a diferença que estas forneciam uma suplementação na dieta, além das pastagens, o que pode ter provocado a distinção entre os grupos de resposta das fazendas orgânicas e o da Conv 1. Assim, pode-se afirmar que a PCA permitiu a distinção entre diferentes sistemas de criação.

A técnica dos isótopos estáveis, sobretudo de nitrogênio, bem como a análise do teor de polifenóis, mostraram-se viáveis na identificação do leite oriundo de um sistema orgânico de produção. Entretanto, o emprego destes parâmetros isolados não oferece a confirmação absoluta da procedência da amostra, já que são reflexos das práticas agrícolas adotadas na fazenda, podendo haver casos em que elas sejam semelhantes para sistemas convencionais e orgânicos.

Em vista disso, a PCA torna-se indispensável para complementar a interpretação dos dados visando a autenticação do leite. Ela permitiu que sistemas de produção fossem diferenciados não apenas entre orgânico ou convencional, mas também em função de práticas de manejo empregadas, principalmente no que se refere à alimentação dos animais.

Ainda assim, é imprescindível o aprofundamento do estudo a respeito da utilização de outros isótopos estáveis e/ou de parâmetros bioquímicos diferentes, complementares às análises desta pesquisa, aliados à PCA, de forma a aumentar a acurácia e a precisão na identificação de amostras.

Conclusão

A técnica de isótopos estáveis e o teor de polifenóis total distinguiram leites obtidos de sistemas de produção convencional e orgânico, sobretudo quando avaliados pela análise multivariada de componentes principais, a qual revelou maior importância da razão isotópica de nitrogênio para a distinção. A capacidade antioxidante aparentou diferenciar os sistemas. A pasteurização não depreciou o conteúdo dos compostos antioxidantes avaliados no leite.

Referências bibliográficas

- BAHAR, B. et al. Seasonal variation in the C, N and S stable isotope composition of retail organic and conventional Irish beef. *Food Chemistry*, v. 106, p. 1299-1305, 2008.
- BATEMAN, A. S.; KELLY, S. D. Fertilizer nitrogen isotope signatures. *Isotopes in Environmental and Health Studies*, v. 43, p. 237-247, 2007.
- BATEMAN, A. S.; KELLY, S. D.; WOOLFE, M. Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 7, p. 2664-2670, 2007.
- BOUTTON, T. W. Stable carbon isotope ratios of soil organic matter and their use as indicators of vegetation and climate change. In: BOUTTON, T. W.; YAMASAKI, S. I. (Ed). *Mass Spectrometry of Soils*. New York: Marcel Dekker Inc., p. 47-82, 1996.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BRASIL. Decreto-lei nº 923, de 10 de outubro de 1969. Dispõe sobre a comercialização do leite. *Lex: Coleção de Leis do Brasil*, São Paulo, v. 7, p. 121, 1969.
- BUTLER, G. et al. Fatty acid and fat-soluble antioxidant concentrations in milk from high- and low-input conventional and organic systems: seasonal variation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 88, p. 1431-1441, 2008.
- CAMIN, F. et al. Potential isotopic and chemical markers for characterising organic fruits. *Food Chemistry*, v. 125, n. 3, p. 1072-1082, 2011.
- CAPUANO, E. et al. Analytical authentication of organic products: an overview of markers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 93, p. 12-28, 2013.
- CHUNG, I. et al. Determination of organic milk authenticity using carbon and nitrogen natural isotopes. *Food Chemistry*, v. 160, p. 214-218, 2014.
- CRUZ, C. D. *Aplicações de algumas técnicas multivariadas no melhoramento de plantas*. 1990. 188f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 1990.
- FANTI, M. G. N. et al. Contribuição ao estudo das características físico-químicas e da fração lipídica do leite orgânico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 28 (supl.), p. 259-265, dez. 2008.
- KNOBBE, N. et al. C and N stable isotope variation in urine and milk of cattle depending on the diet. *Anal Bioanal Chem*, v. 386, p. 104-108, 2006.

KUHNEN, S. et al. Phenolic content and ferric reducing–antioxidant power of cow's milk produced in different pasture-based production systems in southern Brazil. *J Sci Food Agric*, v. 94, p. 3110-3117, 2014.

LI, W. et al. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. *Nutrition*, v. 25, p. 105-114, 2009.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*, v. 79, p. 727-747, 2004.

MINITAB®16. Version 16.1.1. State College, PA: Minitab Inc., 2010. Software.

MOLKENTIN, J. Applicability of organic milk indicators to the authentication of processed products. *Food Chemistry*, v. 137, p. 25-30, 2013.

MOLKENTIN, J.; GIESEMANN, A. Follow-up of stable isotope analysis of organic versus conventional milk. *Anal Bioanal Chem*, v. 398, p. 1493-1500, 2010.

POTTER, N. N.; HOTCHIKISS, J. H. *Food Science*. 5.ed. New York: Chapman & Hall, 1995. 608 p.

RAPISARDA, P. et al. Influence of different organic fertilizers on quality parameters and the $\delta^{15}\text{N}$, $\delta^{13}\text{C}$, $\delta^2\text{H}$, $\delta^{34}\text{S}$, and $\delta^{18}\text{O}$ values of orange fruit (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 58, n. 6, p. 3502-3506, 2010.

ROGERS, K. M. Nitrogen isotopes as a screening tool to determine the growing regimen of some organic and nonorganic supermarket produce from New Zealand. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 11, p. 4078-4083, 2008.

ROGERS, K. M. Stable isotopes as a tool to differentiate eggs laid by caged, barn, free range, and organic hens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, p. 4236-4242, 2009.

SCHMIDT, O. et al. Inferring the origin and dietary history of beef from C, N and S stable isotope ratio analysis. *Food Chemistry*, v. 91, n. 3, p. 545-549, 2005.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic*, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOARES, J. P. G. *Produção Orgânica de Leite – Qualidade e Segurança Alimentar*. Embrapa Agrobiologia, fev. 2009.

SOARES, J. P. G. et al. Produção orgânica de leite: desafios e perspectivas. In: *Simpósio Nacional de Bovinocultura Leiteira*, 3., 2011, Viçosa. *Simpósio Internacional de Bovinocultura Leiteira*, 1., 2011, Viçosa. *Anais...* Viçosa: 2011.

VARELLA, C. A. A. *Análise Multivariada Aplicada às Ciências Agrárias: Análise de Componentes Principais* [Apostila], 2008. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2008. 12 p.

CAPÍTULO IV

Implicações

IMPLICAÇÕES

A consciência socioambiental e a exigência por inocuidade dos alimentos têm crescido entre os consumidores, o que vem impulsionando a agropecuária orgânica em todo o mundo. Essa área ainda carece muito de pesquisas, desde para melhorias do sistema de produção em si até para o conhecimento do próprio alimento produzido. Dessa forma, essa pesquisa contribuiu, primeiramente, para a obtenção de mais informações sobre o leite orgânico, mostrando, por outro lado, que ainda há muito o que se investigar.

A técnica de isótopos estáveis permitiu a diferenciação entre o leite orgânico e o convencional, denotando uma grande utilidade dessa técnica como ferramenta na identificação da procedência do leite. Isso é de extrema valia para a certificação dos produtos, assegurando qualidade ao consumidor.

A avaliação dos compostos antioxidantes no leite trata-se de uma exploração empírica das técnicas laboratoriais, já que elas não são enrijecidas, exigindo constantes adaptações e reformulações. Isso reforça a necessidade de estudos subsequentes a este, já que os dados na literatura também são escassos. Os resultados desta pesquisa reforçam a existência de mais diferenças, os compostos antioxidantes, entre os leites convencional e orgânico, as quais ainda não estão completamente elucidadas.

Para se alcançar a autenticação do leite orgânico cada vez mais precisa, é imprescindível um conhecimento multidisciplinar de diversos tipos de análises, de forma a combinar vários parâmetros independentes.