

Desenvolvimento de Metodologia de Derivatização Direta de Ácidos Graxos em Leite e Derivados

Alisson de Lima Figueiredo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jesuí Vergílio Visentainer (Orientador), e-mail: alissonfigueiredo99@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas e da Terra / Maringá, PR.

Química/Analítica (10604006).

Palavras-chave: Leite, quimiometria, desenvolvimento de metodologia.

Resumo:

O leite é o principal alimento desde os nossos primeiros dias de vida, sendo este fundamental devido à grande quantidade de nutrientes como proteínas, vitaminas, lipídios e alguns minerais. Para análise de ácidos graxos a etapa inicial é a extração de lipídios seguida da sua esterificação. Para isso, diversas metodologias são utilizadas, porém todas apresentam as suas limitações que acabam interferindo no resultado final. Assim, este trabalho tem por objetivo desenvolver um método analítico de derivatização direta de ácidos graxos em leite, utilizando a Quimiometria para a otimização da metodologia proposta. O planejamento de compósito central forneceu a condição que permite a maximização da resposta. As condições otimizadas forneceram CB (concentração básica) = $1,76 \text{ mol L}^{-1}$, TB (tempo básico) de 12 min e 40 s e CA (concentração ácida) = $2,84 \text{ mol L}^{-1}$.

Introdução

O leite é um alimento essencial para a alimentação humana, devido aos diversos nutrientes presentes em sua composição que são essenciais a saúde, como proteínas, vitaminas, lipídios e alguns minerais (Gouvêa *et al.*, 2012). Os lipídios do leite são constituídos principalmente por triacilgliceróis (ésteres formados por 3 ácidos graxos e glicerol). Estes apresentam uma grande quantidade de ácidos graxos saturados (AGS) (16:0 e 18:0) e de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), 18:2n-6 (LA) e 18:3n-3 (LNA) (Connor, 2000).

A etapa inicial para análise de lipídios é a sua extração. A metodologia proposta por Folch *et al.*, (1957) é largamente utilizada para a extração à frio de lipídios em amostras de leite utilizando uma mistura de clorofórmio/metanol. No entanto, esta metodologia apresenta como principais desvantagens o uso de grandes quantidades de solventes tóxicos, utilização de grande quantidade de amostra e a indesejável extração de compostos não lipídicos.

Os lipídios extraídos devem ser derivatizados a ésteres metílicos e para este fim, muitos métodos podem ser adotados, sendo o mais empregado o de Hartman & Lago (1973). No entanto este processo possui suas limitações, como a degradação da amostra devido ao uso de temperaturas elevadas (Kebede *et al.*, 2013).

Diante disso, este trabalho tem por objetivo desenvolver um método analítico de derivatização direta de ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa, utilizando ferramentas estatísticas e quimiométricas.

Materiais e métodos

Amostragem

As amostras de leite foram obtidas no mercado local de Maringá, homogeneizadas em um béquer de 500 mL, transferidas para frascos âmbar de 15 mL, 30 mL e 50 mL e conservados no congelador até o início das análises.

Desenvolvimento da metodologia de derivatização direta

Inicialmente, 1,0 g de leite UHT foi pesado em tubo de ensaio de 10 cm e adicionado 2,0 mL de NaOH em metanol (concentração no nível do planejamento – CB). A amostra foi agitada de forma a torná-la homogênea quando, então, colocadas no banho ultrassônico por um tempo de reação determinado pelo planejamento (tempo de reação alcalino - TB). Após este tempo, 2,0 mL de H₂SO₄ em metanol (CA no nível do planejamento) foi adicionado, e o tubo de ensaio novamente colocado no banho ultrassônico durante 5,0 min (Tempo ácido - TA). Em seguida, foram adicionados 1,0 mL de *n*-heptano e 500 µL de padrão interno (23:0me) e os tubos foram agitados durante 30 segundos, com posterior centrifugação a 2000rpm durante 1,0 min para a separação das fases. Por fim, a fase superior foi recolhida e injetada no cromatógrafo a gás.

Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos

A análise cromatográfica foi realizada em cromatógrafo a gás Thermo, modelo trace ultra 3300, equipado com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida CP - 7420 (Select FAME, 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de cianopropil). Para a quantificação absoluta dos ésteres metílicos, foi utilizada a padronização interna, utilizando como padrão o tricosanoato de metila (23:0), da marca SIGMA (USA) e os cálculos foram realizados segundo método de Joseph & Ackman (1992). Os valores do fator de correção teórico para o DIC foram utilizados para a determinação dos valores de concentrações de ácidos graxos (Visentainer, 2012). O teor dos ácidos graxos nas amostras foi calculado em mg g⁻¹ de amostra.

Análise estatística

Os resultados experimentais foram submetidos à ANOVA, utilizando o software R (R Core Team R, 2017).

Resultados e Discussão

As condições para o planejamento compósito central estão descritas na Tabela 1. Os maiores valores de somatório de ácidos graxos foram obtidos no ensaio 16 correspondente a um ponto axial, indicando que a região escolhida de trabalho não seja adequada para explorar as melhores condições para as três variáveis simultaneamente. Uma análise completa permite verificar isoladamente quais variáveis estão em condições otimizadas. No ponto central foi obtido um somatório de $15,70 \pm 1,04 \text{ mg g}^{-1}$ de amostra com erro percentual de 6,64%. Erros menores que 10% são desejáveis para análises precisas.

Tabela 1: Variáveis e níveis utilizados no design experimental

Variáveis	Níveis				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
CB (mol L^{-1})	0,16	0,5	1,0	1,5	1,84
CA (mol L^{-1})	1,16	1,5	2,0	2,5	2,84
TB (min)	4,96	7	10	13	15,04

(± 1) = pontos fatoriais, ($\pm \alpha$) = pontos axiais e (0) = ponto central.

Os modelos lineares, 2FI e quadráticos foram avaliados, sendo o último o que apresentou melhor descrição dos dados. No modelo, os coeficientes CB, TB, CB^2 , TB^2 e CB:CA são significativos e devem ser utilizados na equação do modelo. Além disso, CA deve ser mantida devido ao fato de a interação CB:CA ser significativa para o modelo e ter sido variado ao longo do experimento. A Equação 1 apresenta o modelo matemático que descreve os dados experimentais.

$$\sum AG = 15,520 + 5,382CB + 0,049CA + 1,449TB + 0,677CB \times CA - 1,765CB^2 - 0,819TB^2 \quad \text{Equação 1}$$

Nesta equação, o termo $\sum AG$ corresponde ao somatório de ácidos graxos em mg g^{-1} de amostra, CB corresponde a concentração básica codificada, CA corresponde a concentração ácida codificada e TB corresponde ao tempo básico codificado. O modelo proposto apresentou R^2 de 0,9709 e R^2 ajustado de 0,9575 indicando que o modelo está adequado aos dados experimentais.

Ainda pela Equação 1 pode-se notar que CA, CB e TB apresentaram valores positivos o que indica que maiores concentrações e maior tempo básico favorecem o somatório de ácidos graxos. CA foi à única variável que não apresentou termo quadrático, sendo assim ela possui ascendência sem a curvatura de máximo ou mínimo. Os termos quadráticos CB^2 e TB^2 possuem valor negativo na equação, indicando que apesar de TB e CB serem ascendentes estes possuem uma região de máxima resposta.

O ponto ótimo foi obtido através da derivação da Equação 1 para cada uma das variáveis e igualando a zero, para obter o valor máximo do somatório de ácidos graxos. As condições de máxima resposta foram: CB = $1,76 \text{ mol L}^{-1}$ e TB de 12 min e 40 s. Já para a CA não é possível determinar uma melhor condição específica

para maximizar a resposta, uma vez que este não apresentou um termo quadrático. O modelo mostrou que quanto maior for CA melhores os valores obtidos de resposta. A região trabalhada permite usar CA de até 2,84 mol L⁻¹.

Conclusões

Os experimentos do compósito central forneceram dados suficientes para a construção de uma superfície de resposta utilizando o modelo quadrático para tal. A equação que descreve o modelo quadrático apresentou R² de 0,9709 e R² ajustado de 0,9575 mostrando boa concordância entre o modelo e os dados experimentais. Com isso, condições ótimas para o trabalho foram definidas para a validação da metodologia e posterior comparação com as metodologias convencionais.

Agradecimentos

Ao CNPQ, a Fundação Araucária pelo apoio financeiro, ao DQI e APLE-A.

Referências

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease 1-3. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1-5, 2000.

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

GOUVÊA, M.M., FRANCO, C. F. J., DE C. MARQUES, F. F., PEREIRA NETTO, A. D. Conjugated Linoleic Acids (CLA) – The Benefits They Have on Human Health and the Main Analytical Methodologies Applied to its Determination in Milk. **Revista Virtual de Química**, v. 4, p. 653-669, 2012.

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

JOSEPH, J. D., ACKMAN, R. G. Capillary column gas-chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl-esters—collaborative study, **J. AOAC Int.** v.75, p. 488-506, 1992.

KEBEDE, B. T., GRAUWET, T., GIPSY, T. M., PALMERS, S., VERVOORT, L., HENDRICKX, M., LOEY, A. V. Headspace components that discriminate between thermal and high pressure high temperature treated green vegetables: Identification and linkage to possible process-induced chemical changes. **Food Chemistry**. v. 141, p. 1603-1613, 2013.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v. 35, p. 274-279, 2012.