

Ácidos graxos saturados em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia gasosa

Saturated fatty acids in foodstuffs: comparison of procedures in gas chromatographic analysis

RIALA6/1035

Sabria AUED-PIMENTEL^{1*}, Miriam Solange Fernandes CARUSO¹, Edna Emy KUMAGAI¹, Valter RUVIER², Odair ZENEBO³

* Endereço para correspondência: Laboratório de Cromatografia, Divisão de Bromatologia e Química. Av Dr Arnaldo, 355. 2º andar, sala 27. e-mail: spimente@ial.sp.gov.br

¹ Instituto Adolfo Lutz, Laboratório de Cromatografia

² Instituto Adolfo Lutz, Seção de Química Biológica

³ Instituto Adolfo Lutz, Diretoria da Divisão de Bromatologia e Química

Recebido: 17/02/2005 – Aceito para publicação: 29/09/2005

RESUMO

No presente trabalho são apresentados os resultados obtidos da comparação de metodologias adotadas nas análises de ácidos graxos saturados em laboratórios brasileiros. Foram comparados dois procedimentos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos lipídios extraídos (IUPAC 2301 e Hartman e Lago) e dois métodos de cálculo para expressar a concentração de ácidos graxos saturados em g/100g de amostra (cálculo com padrão interno ou com normalização de área multiplicada por fator de conversão teórico). As análises foram feitas por cromatografia gasosa. Foram analisadas seis amostras, sendo: ovo, biscoito recheado, biscoito amanteigado, extrato de soja, mistura para cappuccino e café. Para avaliar as diferenças entre os procedimentos foi aplicada a ANOVA, e no caso de valores com $p < 0,05$ foi utilizado o teste de Tukey (nível de confiança de 95%). Comparando os processos de preparação de ésteres metílicos não foi observada diferença significativa entre eles para todas as matrizes (considerando mesmo método de cálculo); com relação ao método de cálculo observou-se diferenças estatisticamente significativas para as amostras de café e cappuccino. Os resultados mostram que é necessária a utilização de um padrão interno para determinação quantitativa dos ácidos graxos nos alimentos e que estudos mais abrangentes devem feitos para verificar a aplicação dos fatores teóricos nos cálculos de ácidos graxos, principalmente, em produtos com ingredientes diversos.

Palavras-Chave. ácidos graxos saturados, rotulagem nutricional, análise por cromatografia em fase gasosa, ésteres metílicos de ácidos graxos.

ABSTRACT

The present paper describes the data observed in comparing procedures for determining saturated fatty acids for nutritional labeling by GC/FID. Two procedures to prepare the fatty acids methyl esters [a cold base-catalyzed with KOH 0,2 molL⁻¹ methanolic, and a base and acid - combined procedure (Hartman and Lago)] were compared. Also, two methods were evaluated for calculating the fatty acid concentration, expressed in grams per 100 grams of food (by means of internal standard, and by normalization of area multiplied by theoretical conversion factors). Six samples were analyzed: egg, two types of cookies, soya extract, cappuccino powder, and coffee powder. Variance analysis and Tukey test ($p < 0,05\%$) were applied. No significant difference was observed between the methylation procedures. On the other hand, significant difference was observed in calculating both method for determining the saturated fatty acids in cappuccino and coffee samples. The results point out that it is necessary to use internal standard to quantify the fatty acids in foodstuffs, and further studies should be done to evaluate the use of theoretical factors to calculate fatty acids composition in foodstuffs containing several ingredients.

Key Words. saturated fatty acids, nutritional labeling, GC analysis, fatty acids methyl esters.

INTRODUÇÃO

A adoção de hábitos alimentares saudáveis é um dos grandes desafios da humanidade, especialmente no que se refere à ingestão de alimentos ricos em gorduras. Nos países do ocidente são consumidos diariamente de 100 a 200g de gordura, o que corresponde à cerca de 35 a 45% da energia total da dieta¹. As gorduras, tanto de origem animal como vegetal, são constituídas por ácidos graxos saturados e insaturados, os quais desempenham importantes funções metabólicas no organismo, como transporte de vitaminas, síntese de hormônios, entre outras². Entretanto, de acordo com diversos estudos realizados em animais e em seres humanos, a ingestão de alimentos ricos em ácidos graxos saturados aumenta o risco de desenvolvimento de doenças coronarianas, devido à elevação dos níveis de colesterol plasmático¹. Com a finalidade de orientar o consumidor na escolha de alimentos saudáveis, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu, através da Resolução RDC nº 40/01, normas para a informação nutricional na rotulagem de alimentos e bebidas embalados. Uma das informações obrigatórias era a declaração do teor de ácidos graxos saturados³. Esta legislação esteve em vigor até dezembro de 2003, quando foi substituída pela Resolução RDC nº 360/03, a qual determina que também se declare a concentração de ácidos graxos *trans* no rótulo dos produtos alimentícios. As empresas têm o prazo até 31/07/06 para se adequarem a este novo regulamento⁴. Cabe aos laboratórios credenciados pela ANVISA, a função de verificar as informações declaradas através da análise destes alimentos.

A técnica de cromatografia em fase gasosa (CG) tem sido utilizada com eficácia na determinação da composição de ácidos graxos de óleos e gorduras comestíveis⁵. Entretanto, na análise de outros produtos alimentícios mais complexos, ainda não estão padronizados os procedimentos de extração da gordura, preparação dos ésteres metílicos e cálculo dos ácidos graxos para expressá-los em g/100g do alimento, os quais têm sido empregados nos laboratórios brasileiros para a determinação da composição de ácidos graxos por CG.

Organizações internacionais de excelência em química analítica como AOAC⁶ (Association of Official Analytical Chemistry), A.O.C.S.⁷ (American Oil Chemists' Society)⁷, I.S.O.⁸ (International Organization for Standardization) preconizam a determinação quantitativa dos ácidos graxos por CG empregando metodologia com adição de padrão interno. O padrão interno é um composto de natureza química semelhante ao composto que será determinado e é adicionado à amostra, sendo que o cálculo da composição dos analitos de interesse é feito em relação à área e massa deste componente. Na análise de ácidos graxos são utilizados padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos com número ímpar de carbono, uma vez que muitos destes não são encontrados na gordura dos alimentos.

A A.O.A.C. recomenda um método em que a gordura e os ácidos graxos são extraídos das amostras de alimentos por hidrólise (hidrólise ácida para a maioria das amostras, hidrólise

básica para produtos lácteos e combinada para amostras de queijos). Antes da extração dos lipídios é adicionado um padrão interno de triacilglicerídeo (C_{11:0} ou C_{13:0}). A gordura é extraída com éter (petróleo e etílico), então transformada em ésteres metílicos de ácidos graxos, usando trifluoreto de boro (BF₃) em metanol. A gordura total é calculada como soma dos ácidos graxos individuais, expressos como triacilgliceróis equivalentes⁶.

Na elaboração das tabelas de composição de alimentos de vários países são empregados fatores de conversão teóricos para expressar a concentração dos ácidos graxos em gramas por cem gramas do alimento. O cálculo da concentração dos ácidos graxos saturados e insaturados é feito por normalização de área. A porcentagem em massa obtida para cada éster metílico de ácido graxo, no total dos ácidos graxos, é multiplicada pelo teor de lipídios da amostra e por fatores de conversão teóricos de gordura para ácidos graxos. Estes fatores ponderam a contribuição das diferentes frações da gordura dos alimentos (triacilgliceróis, fosfolipídios, entre outros) no fornecimento dos ácidos graxos, variando conforme o tipo de alimento^{9,10,11}. Os valores destes fatores foram determinados, com base em dados da literatura, para algumas classes de alimentos^{9,10}.

Visando trazer subsídios técnicos para o aprimoramento das análises de ácidos graxos, este trabalho apresenta resultados da comparação de metodologias que estão sendo adotadas nas determinações de ácidos graxos saturados, utilizando a cromatografia em fase gasosa^{5,12,13,14,15}. Foram comparados dois procedimentos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos lipídios extraídos (IUPAC 2301 e Hartman e Lago) e dois métodos de cálculo para expressar a concentração de ácidos graxos saturados em g/100g de amostra (cálculo com padrão interno ou com normalização de área multiplicada por fator de conversão teórico).

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram analisadas seis amostras de alimentos de diferentes tipos, colhidas no comércio da cidade de São Paulo, sendo: ovo, biscoito recheado, biscoito amanteigado, extrato de soja em pó, mistura para cappuccino e café torrado e moído.

Métodos

Extração de lipídios

Com o objetivo de não alterar a composição original dos ácidos graxos foram utilizados diferentes métodos de extração de lipídios de acordo com o tipo de alimento. Para as amostras de biscoito recheado, biscoito amanteigado, extrato de soja e café, os lipídios foram obtidos pelo método de Soxhlet¹⁶ para a determinação do teor de gordura e da composição de ácidos graxos. Nas amostras de ovo foi utilizado o método de Folch¹² para a extração de lipídios e para a análise dos ácidos graxos. Para o cappuccino foi utilizada a hidrólise ácida (AOAC) para

obtenção do teor de lipídios, e extração a frio com éter etílico para análise de ácidos graxos^{6,14}.

Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos

Dois procedimentos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a partir dos lipídios extraídos foram comparados, sendo um de acordo com IUPAC 2301¹⁴ e outro segundo Hartman e Lago^{13,15} (Figura 1).

Análise cromatográfica

Os ésteres metílicos foram analisados em cromatógrafo a gás, marca Shimadzu, modelo GC-17A, com detector de ionização de chama. Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB 23 de 60 m com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,20 µm. As condições de operação foram: temperatura programada da coluna: 60 °C (2 min), taxa de aquecimento 15 °C/min até 135 °C (1 min), taxa de aquecimento 3 °C/min até 215 °C (10 min.); temperatura do injetor: 230 °C; temperatura do detector: 240 °C; gás de arraste: hidrogênio; velocidade linear do gás de arraste de 20 cm/s; razão de divisão da amostra 1:50. Foi empregado um padrão certificado de uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos, variando de 4 a 24 átomos de carbono, tanto para identificação dos ácidos graxos por comparação com os tempos de retenção, quanto para a determinação dos fatores de resposta do detector de ionização de chama. Os fatores de correção de resposta do detector de ionização de chama foram calculados a partir de um cromatograma da amostra de padrões certificados nas mesmas

condições de análise da amostra e calculados com relação ao C_{13:0}. Para expressar a porcentagem de ácidos graxos saturados em g/100g de amostra foram utilizados dois métodos de cálculo. Em um dos métodos foi adicionado um padrão interno de éster metílico tridecanóico (C13:0, marca Sigma, 98% de pureza), após a extração dos lipídios^{3,14}. A quantificação foi feita com base nas relações de área de cada ácido graxo com a área do padrão interno, utilizando os fatores de correção de resposta do detector de ionização de chama (DIC) e de conversão de metil ésteres de ácidos graxos para ácidos graxos. Os valores das somas dos ácidos graxos saturados, foi multiplicado pelo teor de lipídios da amostra para expressar o resultado em gramas de ácidos graxos por cem gramas do alimento^{5,7,8,16,17}. No outro método, o cálculo da concentração dos ácidos graxos saturados foi feito por normalização de área, determinando os fatores de correção de resposta para cada ácido graxo no detector de ionização de chama. A porcentagem em massa obtida para cada éster metílico de ácido graxo foi multiplicada pelo teor de lipídios da amostra e por fatores de conversão teóricos (FCT) de gordura para ácidos graxos, variáveis conforme o tipo de alimento^{9,16}. Foram feitas cinco repetições para cada amostra a partir da etapa da extração dos lipídios.

Análise estatística

Para avaliar se havia diferença significativa entre os procedimentos foi aplicada análise de variância (ANOVA), e no caso de valores com $p < 0,05$ foi utilizado o teste de Tukey (nível de confiança de 95%)¹⁸.

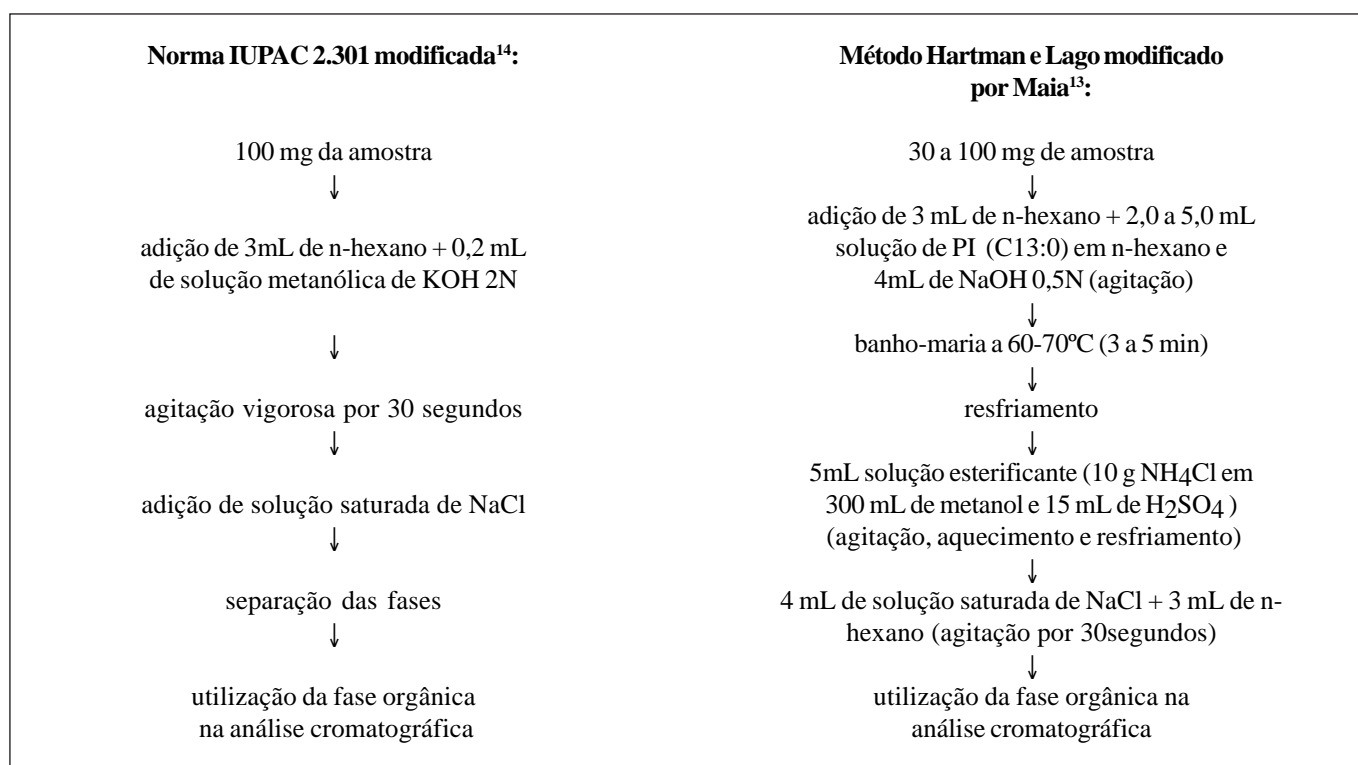


Figura 1. Fluxograma dos procedimentos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os dados obtidos pelos diferentes procedimentos para a composição de ácidos graxos saturados nas amostras.

Na Figura 2 estão descritos os resultados do estudo estatístico para a comparação daqueles procedimentos.

Comparando os procedimentos de preparação de ésteres metílicos, para todas as matrizes, não foi observada diferença significativa entre os métodos IUPAC 2301 e Hartman e Lago,

Tabela 1. Composição de ácidos graxos saturados em diferentes produtos alimentícios, g/100g.

Produto	Método Hartman e Lago				Método IUPAC			
	Padrão Interno (C13:0)		Normalização Fator de Conversão Teórico		Padrão Interno (C13:0)		Normalização Fator de Conversão Teórico	
	média	dp	média	dp	média	dp	média	dp
Ovo (FCT = 0,830)	2,95	0,16	2,94	0,07	2,84	0,13	2,86	0,14
Biscoito recheado doce leite (FCT = 0,956)	4,32	0,32	4,62	0,14	4,44	0,31	4,59	0,04
Biscoito amanteigado (FCT = 0,956)	5,27	0,27	5,10	0,17	5,24	0,22	5,03	0,04
Cappuccino (FCT = 0,945)	4,31	0,38	5,16	0,11	4,41	0,16	5,05	0,04
Extrato de soja (FCT = 0,956)	3,35	0,27	3,46	0,04	3,22	0,12	3,39	0,03
Café (FCT = 0,956)	3,83	0,18	4,97	0,04	3,16	0,26	4,78	0,02

FCT = Fator de Conversão Teórico⁹.

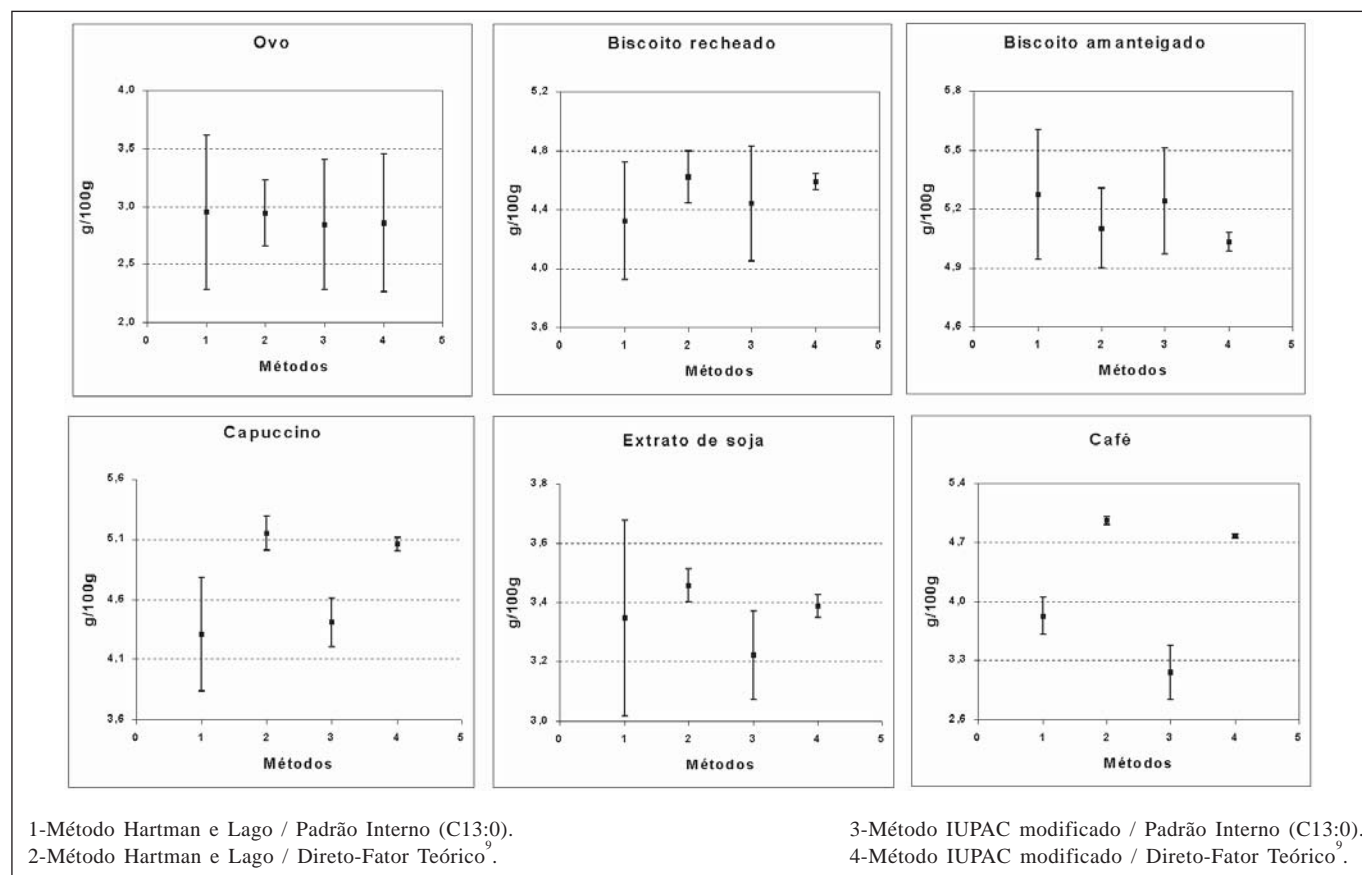


Figura 2. Intervalo de confiança de 95% para média das seguintes amostras: ovo, biscoito recheado, biscoito amanteigado, extrato de soja, mistura para o preparo de capuccino e café.

onde foi considerado o mesmo método de cálculo. Com relação a este foram observadas diferenças estatisticamente significativas para as amostras de café e cappuccino. No método de cálculo que emprega os fatores de conversão teóricos, utilizou-se para as amostras de café o fator 0,956, cujo valor é aplicado a alimentos que contêm principalmente gordura de origem vegetal, uma vez que não está estabelecido um fator de conversão para este produto (Tabela 1). Na primeira versão da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos, um procedimento similar ao descrito acima, foi utilizado para o cálculo da composição de ácidos graxos em amostra de café¹¹. O café é um dos produtos que possui em sua rotulagem a declaração de gordura saturada igual a zero, pois os teores de gordura saturada na porção final a ser consumida são insignificantes. Entretanto, o teor de lipídios (extrato etéreo) das amostras de pó de café é considerável e diversos produtos podem ter o café como ingrediente, como é o caso do cappuccino. Para as amostras de cappuccino, no cálculo dos ácidos graxos saturados foi empregado o fator calculado para leite (0,945), já que este ingrediente é o que contribuiu com a maior quantidade de gordura na amostra. A amostra de cappuccino analisada continha como ingredientes majoritários: açúcar (cerca de 50%), leite em pó integral (30%), leite em pó desnatado (10%), café solúvel (8%), cacau (1,5%) e outros diversos componentes minoritários. O procedimento que utiliza fatores teóricos, para o cálculo quantitativo de ácidos graxos em alimentos como cappuccino ou café pode induzir a erro. Entretanto, neste trabalho utilizamos tais fatores, para estes produtos como um alerta, uma vez que este tem sido o procedimento adotado em diferentes laboratórios brasileiros que realizam a determinação da composição de ácidos graxos em alimentos. O resultado obtido por aquele método,

apesar de simples, não é aplicável a qualquer tipo de alimento, especialmente em alimentos de composição complexa, ou seja, com diversos ingredientes. Nos alimentos para os quais os fatores de conversão não estão estabelecidos é necessária a utilização do cálculo com padrão interno.

Apesar de existirem diferenças estatisticamente significativas para as amostras de cappuccino, isto é, os métodos não são equivalentes do ponto de vista analítico, os resultados obtidos pelos dois métodos estariam dentro da faixa de tolerância de $\pm 20\%$, aceita pela Resolução RDC 360/03, se considerarmos o método 2 como referência. A Figura 3 apresenta os resultados obtidos pelos diferentes procedimentos em comparação ao método 2, referente à metilação por Hartman e Lago com cálculo utilizando fatores teóricos, considerando a tolerância da legislação em vigor. Este procedimento foi o empregado na primeira versão da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos¹¹ e, portanto, foi considerado como referência.

CONCLUSÃO

O método da IUPAC para a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos é mais rápido, barato e emprega menor volume de solvente, sendo, portanto, uma boa alternativa para os laboratórios que realizam análises de ácidos graxos em sua rotina.

O procedimento que emprega os fatores de conversão teóricos no cálculo dos ácidos graxos é o mais simples, entretanto sua aplicação para determinar os ácidos graxos se restringe aos alimentos que possuem fatores de conversão teóricos já definidos.

O método que utiliza padrões internos para a determinação de ácidos graxos em alimentos é o preconizado pelas organizações internacionais de excelência em química analítica e, portanto, é o que deve ser adotado nos laboratórios.

Há a necessidade de um estudo mais abrangente, com amostras de referência ou certificada, para avaliar os procedimentos de extração de lipídios, preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos e métodos de cálculo, visando a determinação de ácidos graxos nos alimentos.

REFERÊNCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Estrategia Mundial sobre régimen alimentario, actividad física e salud (57° Asamblea Mundial de la Salud - 22 de mayo de 2004). Ginebra, Organización Mundial de la Salud 2004 (WHA 57.17).
2. Curi R, Pompéia C, Miyasaka CK, Procópio J. Entendendo as gorduras - os ácidos graxos. 1ª ed., São Paulo: Ed. Manole; 2002.
3. Brasil. Resolução-RDC nº 40, de 21 mar. 2001 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre Regulamento Técnico Obrigatório sobre rotulagem nutricional de alimentos e bebidas embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 mar. 2001, Seção I, nº 57-E, p. 22-5.

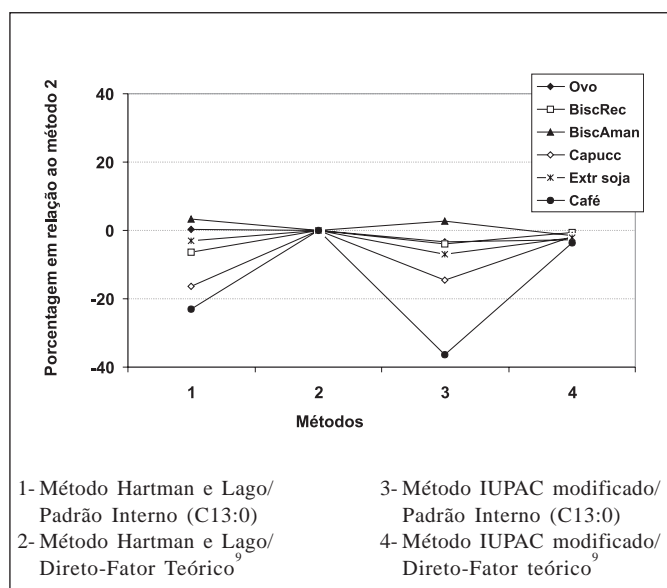


Figura 3. Resultados obtidos pelos diferentes procedimentos em relação ao método 2 de acordo com a variação de $\pm 20\%$, tolerada pela RDC 360/03 (ANVISA/MS).

4. Brasil. Resolução-RDC nº 360, de 23 dez. 2003 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 26 dez. 2003. Seção I, nº 251, p 33-4.
5. American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. (A.O.C.S. Official, Method Ce 1f-96: Determination of *cis*-and *trans*-fatty acids in hydrogenated and refined oils and fats by capillary GLC); Champaign, USA; 1997
6. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17 ed., Githersburg, Maryland, 2000.
7. American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. (A.O.C.S. Official Method Ce 1-62: Fatty acid composition by gas chromatography); Champaign, USA; 1995
8. International Organization for Standardization (ISO). Animal and vegetable fats and oils – Analysis by gas chromatography of methyl esters of fatty acids. ISO 5508-1990.
9. Mc Cance and Widdowson's, editors. The composition of food. 6th ed., Royal Society of Chemistry; 2002.
10. Weihrauch JL, Posati LP, Anderson BA, Exler, J. Lipid conversion factors for calculating fatty acids contents of foods. *J Am Oil Chem Soc* 1977; 54: 36-40.
11. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação (NEPA), UNICAMP (BR). Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. Campinas; 2004.
12. Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497-509.
13. Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Prac* 1973; 22: 475-6.
14. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives. Blackwell Scientific Publications, 7th Edition; Method 2.301; Report of IUPAC Working Group WG 2/87; 1987.
15. Maia EL, Rodrigues-Amaya DBR. Avaliação de um método simples e econômico para metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1993; 53(1/2): 27-35.
16. Instituto Adolfo Lutz. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz, Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4^a ed., Brasília, ANVISA, 2005.
17. American Oil Chemists' Society. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. 4th ed. (A.O.C.S. Official Method Ce 2-66, Preparation of methyl esters of long-chain fatty acids); Champaign, USA; 1995
18. Ayres M, Ayres MJr, Ayres DL, Santos AS. BioEstat. 3.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém, Sociedade Civil Mamirauá, Brasília, CNPq, 2003.