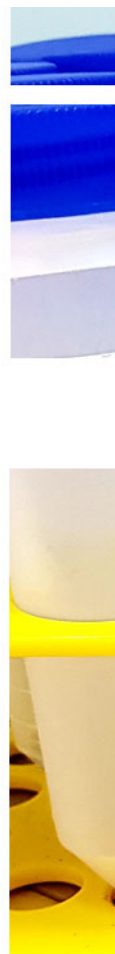


Otimização do Método Hartman e Lago de Preparação de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Ministério da Agricultura**

**BOLETIM DE PESQUISA
E DESENVOLVIMENTO
26**

**Otimização do Método Hartman e
Lago de Preparação de Ésteres
Metílicos de Ácidos Graxos**

*Rosemar Antoniassi
Allan Eduardo Wilhelm
Adelia Ferreira de Faria-Machado
Andrea Madalena Maciel Guedes
Humberto Ribeiro Bizzo*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Avenida das Américas, 29501 Guaratiba -

CEP 23020-470, Rio de Janeiro, RJ

Fone: +55 (21) 3622-9600

Fax: +55 (21) 3622-9713

www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos

embrapa.br/fale-conosco/sac

Comitê Local de Publicações
da Unidade Responsável

Presidente

Virginia Martins da Matta

Membros

André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares, Janine Passos Lima da Silva, Leda Maria Fortes Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Otniel Freitas Silva e Rogério Germani

Supervisão editorial

Otniel Freitas Silva

Revisão de texto

Regina Celi Araujo Lago

Normalização bibliográfica

Celma Rivanda Machado de Araujo

Tratamento das ilustrações

Marcos de Oliveira Moulin

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Marcos de Oliveira Moulin

Foto da capa

Allan Eduardo Wilhelm

1ª edição

Publicação digitalizada (2018)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,

constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroindústria de Alimentos

Otimização do Método Harman e Lago de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos / Rosemar Antriassi... [et al.]. – Rio de Janeiro : Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2018.

20 p. – (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Agroindústria de Alimentos, ISSN 0101-630X; 26).

1. Cromatografia Gasosa. 2. Óleos. 3. Gorduras. 4. Metilação. I. Antriassi, Rosemar. II. Wilhelm, Allan Eduardo. III. Faria-Machado, Adelia Ferreira de. IV. Guedes, Andrea Madalena Maciel. IV. Bizzo, Humberto Ribeiro. Série.

CDD (23. ed.) 543.85

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução.....	7
Material e Métodos	9
Resultados e Discussão	12
Conclusões.....	18
Referências	19

Otimização do Método Hartman e Lago de Preparação de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

Rosemar Antoniassi¹

Allan Eduardo Wilhelm²

Adelia Ferreira de Faria-Machado³

Andrea Madalena Maciel Guedes⁴

Humberto Ribeiro Bizzo⁵

Resumo—A análise da composição em ácidos graxos é realizada, praticamente, para todos os produtos alimentícios, seja por questões nutricionais ou para atender a rotulagem nutricional. Em geral, é uma análise realizada por cromatografia gasosa que requer uma etapa prévia de conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos. Entre os métodos mais utilizados para esta conversão, destaca-se o método de metilação de Hartman e Lago, publicado em 1973. Trata-se do método mais utilizado no Brasil, pela sua simplicidade, rapidez e baixo custo. Neste estudo, foi realizada uma otimização do método original que permitiu aumentar o número de amostras analisadas com redução da quantidade de reagentes e do tempo de análise. As condições de análise foram avaliadas a fim de garantir que houve conversão completa de ácidos graxos em ésteres metílicos. A otimização do método foi avaliada para diversos tipos de óleo e os resultados foram comparados com material de referência certificado apresentando resultados satisfatórios.

Termos para indexação: óleos; gorduras; cromatografia gasosa; metilação.

¹ Engenheira de Alimentos, D.Sc. em Engenharia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

² Farmacêutico, M.Sc. em Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

³ Engenheira de Alimentos, D.Sc. em Engenharia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

⁴ Engenheira Química, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

⁵ Químico, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

Optimization of the Hartman & Lago Method for Converting Fatty Acids to Methyl Esters

Abstract – Fatty acid composition analysis is required for virtually all food products, either for nutritional reasons or for meeting nutritional labeling. It is usually performed by gas chromatography that requires a previous step of converting the fatty acids to methyl esters. Among the methods most used for this conversion, the Hartman and Lago method, published in 1973, is the most used in Brazil for its simplicity, speed and low cost. In this study, an optimization of this method was carried out in order to increase the number of samples analyzed with reduction of reagents and time of analysis. The conditions of the reaction were evaluated to ensure complete conversion of fatty acids to methyl esters. The method was verified for several types of oil and the results were compared with certified reference material with satisfactory results

Index terms: oil; fats; gas chromatography; methylation

Introdução

A quantificação dos ácidos graxos é importante seja para a determinação da qualidade e valor nutricional de alimentos como também para atender a obrigatoriedade da rotulagem nutricional, quanto à declaração de gordura saturada e de gordura *trans* ou ainda para os casos de alegação de propriedades funcionais dos ácidos graxos (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2003, 2012).

Do ponto de vista nutricional, destaca-se a essencialidade dos ácidos graxos linoleico e alfa linolênico, dos benefícios à saúde humana atribuídos aos ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados, especialmente da série ômega 3, e a recomendação de limite de ingestão de ácidos graxos saturados e de ácidos graxos com duplas ligações *trans* (FAO, 2010).

A composição em ácidos graxos também é o principal parâmetro para o estabelecimento do padrão de identidade dos óleos e para avaliar possíveis adulterações (Machado et al., 2017a, 2017; Faria-Machado et al., 2017) ou para determinar a aplicação dos óleos e gorduras. Apresentam ainda influência decisiva na qualidade dos óleos e dos alimentos em virtude da redução de estabilidade e conseqüente deterioração (Antoniassi, 2001).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para a determinação do perfil dos ácidos graxos, como a RMN (Ressonância Magnética Nuclear), a cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar. No entanto, a cromatografia de alta resolução (CGAR) tem sido a mais utilizada em virtude da boa resolução entre os ácidos graxos, menor custo, simplicidade e disponibilidade de informação na literatura que auxilia na identificação (Christie, 1989).

Para análise por CGAR é necessária uma etapa prévia de tratamento dos óleos ou dos lipídios (compostos principalmente de triacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios, ésteres de esteróis, tocoferóis, glicolipídios e lipoproteínas), para conversão dos ácidos graxos em ésteres de ácidos graxos. Este tratamento permite romper as ligações dos ácidos graxos esterificados em diversas moléculas e, ao mesmo tempo, convertê-los em um derivado que permite que a análise seja realizada em temperatura mais baixa em relação aos ácidos graxos originais.

Embora os ácidos graxos ou os ésteres metílicos, etílicos ou propílicos possam ser analisados por CGAR, em geral é preferível converter os ácidos graxos para ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME em inglês), que apresentam ponto de

ebulição menor, como também, em virtude da grande disponibilidade de padrões existentes no mercado para sua identificação.

Existem diversos métodos para a produção de ésteres metílicos, tanto por transesterificação direta quanto pela saponificação do óleo, seguida de esterificação, que estão sintetizados por Christie (1989, 1993). Embora exista uma gama de métodos disponíveis, problemas tanto em relação a estes procedimentos, quanto em relação à quantificação e identificação dos ácidos graxos têm sido relatados na literatura (Gama et al., 2017; Antoniassi et al., 2017). Especificamente em relação à reação, dependendo das condições, a transesterificação ácida (H_2SO_4) e a alcalina (NaOH/KOH) não promovem conversão completa dos ácidos graxos a FAME. Além disso, algumas condições de análise podem ocasionar isomerização ou degradação dos ácidos graxos, pois alguns métodos utilizam temperaturas muito altas como 90 °C e tempo de, até, 4 horas.

Por outro lado, existem métodos de transesterificação realizados à temperatura ambiente, por exemplo, com metóxido de sódio. Este é o preferido para gordura de leite, mas requer amostra livre de umidade e com baixa acidez, pois os ácidos graxos livres não são convertidos por este método. Além disso, a reação é mais lenta para fosfolipídios e ésteres de colesterol e, como o procedimento é rápido, não há conversão completa (Christie, 1982).

Para a hidrólise de todos os ácidos graxos (presentes nos lipídios neutros e lipídios ligados), a solução é promover uma saponificação, seguida de acidificação e esterificação, como ocorre nos métodos oficiais da Association of Official Analytical Chemists (2010) e da American Oil Chemists' Society (2009) com BF_3 e para o método proposto por Hartman e Lago (1973). Após estas etapas, adiciona-se um solvente orgânico para recuperar os ésteres metílicos e lavagem para remover o ácido e sais formados. Estes métodos não apresentam restrições para a presença de ácidos graxos livres e são menos exigentes quanto à presença de água nas amostras e reagentes.

O método Hartman e Lago (1973) é o mais utilizado para preparação de FAME no Brasil e uma busca no Google Acadêmico indicou 1471 citações do artigo publicado até 04/10/2018. As razões para isto devem-se à utilização de reagentes de baixo custo, simplicidade e rapidez, sem utilizar altas temperaturas. Além disso, o BF_3 utilizado nos métodos oficiais é um reagente tóxico.

Neste estudo, a fim de aumentar o número de amostras por análise, o método foi otimizado para ser realizado em tubos do tipo falcon, com redução do volume de reagentes e de solventes.

Material e Métodos

Preparação da solução de potassa metanólica 0,5 M: Pesar 14 g de hidróxido de potássio P.A. em lentilhas e transferir para almofariz de porcelana. Triturar rapidamente com vigor, utilizando-se bastão de porcelana, para se obter um pó fino. Transferir o pó para béquero e utilizar 500 mL de metanol para lavagem do almofariz e solubilização do KOH.

Preparo do Reagente de esterificação: Em um balão de fundo redondo de 500 mL, em capela de exaustão, adicionar 240 mL de metanol, seguido de 8 gramas de cloreto de amônio. Adicionar gota a gota 12 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após conectar balão a condensador e manta aquecedora, a mistura deve ser mantida sob refluxo por 15 minutos, após a condensação de solvente.

Preparação da amostra: Fundir a amostra, se necessário, homogeneizar e pesar 0,1 grama de óleo em tubo falcon de 50 mL em posição vertical, de modo que o óleo não escorra pelas paredes. Manter o tubo na vertical utilizando-se a estante de tubos, de modo a obter-se 24 tubos com amostra e outro tubo sem amostra para o branco. Se necessário, utilizar fita teflon para garantir a vedação do tubo.

Reação: Adicionar 1,5 mL de potassa metanólica 0,5 M, fechar o tubo e colocar a estante de tubos em banho termostático à temperatura de 60 °C (Figura 1), em capela de exaustão, de modo que a altura do reagente no tubo fique abaixo do nível do líquido de aquecimento. Manter por 5 minutos. Retirar dois tubos de cada vez e agitar em vortex por 15 segundos e retornar ao banho, de modo que todos os tubos sejam submetidos à agitação. Repetir esta operação mais duas vezes para se obter saponificação completa. Retirar a grade do banho e esperar esfriar para adicionar 4,5 mL do reagente de esterificação. Colocar a estante de tubos em banho a 60 °C, por 5 minutos. Repetir a agitação, conforme está citado acima, em duas etapas, para esterificação completa. Retirar a estante do banho e esperar esfriar. Adicionar 10 mL de hexano e agitar com ajuda do vortex em duas etapas de contato de

15 segundos cada tubo. Adicionar 10 mL de água e agitar em duas etapas de contato de 15 segundos cada (Figura 2). Transferir 2 mL de hexano para o vial de cromatografia gasosa (Figura 3).

Foto: Allan Eduardo Wilhelm

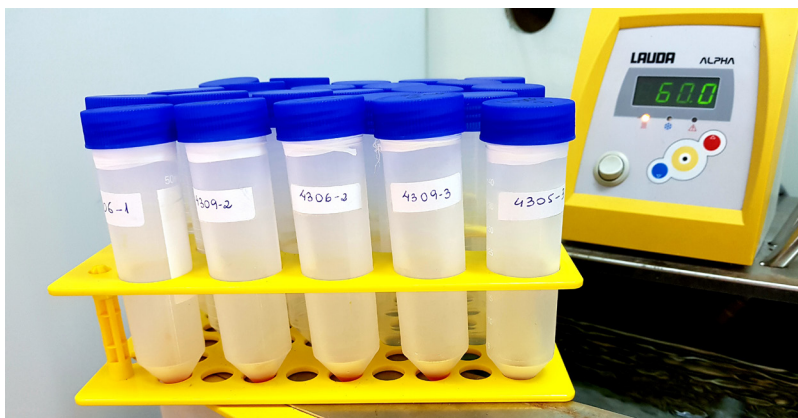


Figura 1. Estante com tubos falcon próximo ao banho termostático

Foto: Allan Eduardo Wilhelm

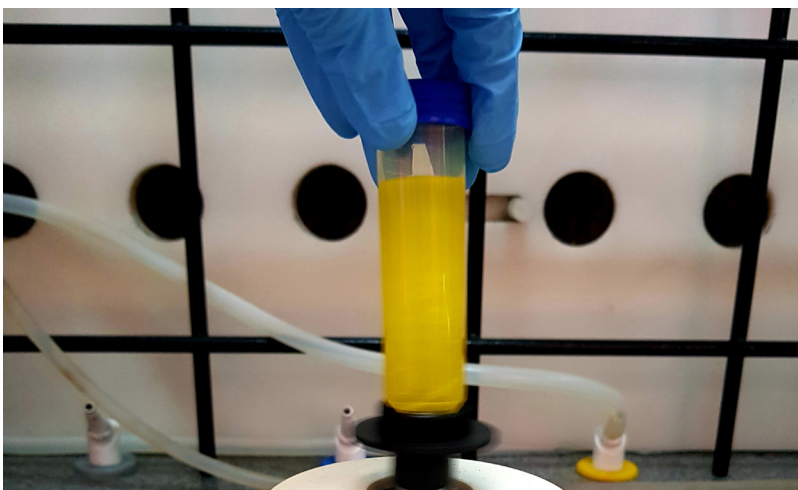


Figura 2. Agitação do tubo em vortex, após a reação e adição de solvente e água

Foto: Allan Eduardo Wilhelm



Figura 3. Transferência da fase de hexano para vial de cromatografia gasosa

Análise por cromatografia gasosa para avaliação de síntese incompleta: Análise realizada em Cromatógrafo Agilent 7890 em coluna da Thermo TG 5HT (15 m x 0,25 mm x 0,10 μm) – 5 % fenil 95 % metil silicone, com programação de temperatura de 50 °C a 180 °C com taxa de 15 °C/min., de 180 °C a 230 °C a 7 °C/min., de 230 °C a 350 °C a 10 °C/min, mantendo-se por mais 25 minutos. Injetor a 320 °C, detector de ionização de chama a 380 °C, taxa de split de 1:50 e injeção de 1 μL .

Análise por cromatografia gasosa de FAME: Análise realizada em equipamento Agilent 7890, equipado com detector de ionização por chama operado a 280 °C. Utilizou-se coluna capilar HP FFAP (25 m x 0,2 mm x 0,30 μm) e a seguinte programação de temperatura: temperatura inicial de 150

°C por 1 min; de 150 a 180 °C com taxa de 30 °C/min; de 180 a 200 °C a 20 °C/min; de 200 a 230 °C a 3 °C/min e na temperatura final de 230 °C por 10 min. Utilizou-se variação de pressão conforme descrito: pressão inicial 15 psi por 10 min; de 15 a 25 psi com taxa de 5 psi/min e pressão final de 25 psi por 11 min. Foi injetado 1 µL de amostra em injetor aquecido a 250 °C operado no modo de divisão de fluxo de 1:50. Realizou-se a identificação por comparação dos tempos de retenção com os padrões da NU-CHEK PREP, Inc, (Elysian, MN) e a quantificação foi realizada por normalização interna.

Resultados e Discussão

Comparação entre condições de análise entre o método Hartman & Lago original e o método reduzido em tubos

No método Hartman e Lago (1973) original como também no método oficial com BF₃, a reação é realizada em vidrarias que permitem que sejam conectadas a um condensador, para evitar perdas de metanol. Neste tipo de operação, é necessário instalar diversos condensadores, o aquecimento depende de placas ou mantas de aquecimento que exigem espaço e a reação requer agitação manual ou por meio magnético. A etapa de extração de FAME com solvente apolar e as etapas de lavagem, em geral, são realizadas em funil de separação, para promover agitação e contato entre as fases, o que consome maior quantidade de solvente. Além disso, é necessário filtrar o extrato etéreo utilizando-se sulfato de sódio anidro (o éter etílico é o solvente recomendado no método original) e, logo após, deve-se concentrar em rotaevaporador, para ajustar a diluição da amostra. Nestas condições, é possível preparar por dia, no máximo, três amostras em triplicata, com consumo de, pelo menos, 400 mL de solvente.

Na otimização proposta neste trabalho, com a realização da reação em tubos de plástico de fundo cônico (tipo falcon), o tempo de análise de 8 amostras em triplicata (uma estante), foi reduzido para, no máximo, 2 horas, consumindo 250 mL de hexano. Assim, considera-se ser possível preparar 24 amostras/dia.

O hexano foi selecionado como solvente, entre outras características, pela capacidade de extrair o FAME da mistura de reagentes e metanol, promover boa separação na etapa de lavagem com água (Figura 3), ser solvente compatível com o material plástico, não arrastar umidade e ser adequado para

injeção na análise por CGAR. Não há necessidade da etapa de concentração porque a amostra está na concentração de 1% (100 mg de óleo/10 mL de solvente), que é compatível com a taxa de divisão de fluxo do injetor de 1:50, selecionada no método por CGAR. Outra característica distinta é que a adição de 10 mL de água com duas etapas de contato foi eficiente para lavagem da fase de hexano.

No método Hartman e Lago (1973) e nos métodos oficiais com BF_3 , a temperatura de reação é controlada pela condensação do metanol. Assim, no método usando tubos é necessário manter a temperatura do banho para que não exceda 60 °C, por razões de segurança. Porém, como não ocorre imersão total do tubo no banho (imerso numa altura de 3 cm contra altura total de 12 cm), a parte superior deste tubo está mais fria, permitindo a condensação de metanol. Não se observou perda de metanol nas condições de aquecimento citadas. Adicionalmente, há vantagem da menor temperatura de reação em relação ao método original.

Apesar do tempo total de análise ser muito reduzido, há diferença em relação ao método original quanto ao tempo de aquecimento da amostra. O método foi otimizado para 25 tubos na estante, compatível com a abertura do banho termostático. Para se garantir saponificação do óleo e esterificação completa dos ácidos graxos, agita-se com auxílio de vortex e o tubo de reação deve retornar ao banho de aquecimento para manter a temperatura. Assim, o tempo de permanência da amostra no banho de aquecimento após o início da agitação nas etapas de saponificação e esterificação, foi respectivamente de 10 e 7 minutos.

Para o sucesso da otimização considera-se, também, como crítica a etapa de pesagem. Resíduos de óleo nas paredes do tubo podem levar a reação incompleta, em virtude da redução do volume dos reagentes, especialmente na etapa inicial de saponificação. A quantidade de óleo de 100 ± 20 mg é compatível com 1,5 mL de potassa metanólica mas o vortex formado na agitação não atinge a parte mais alta do tubo. Recomenda-se que o tubo de amostra seja pesado em posição vertical e permaneça nesta posição até o final da análise.

Por outro lado, como benefício da redução de amostra, os volumes de potassa metanólica e do reagente de esterificação foram reduzidos à metade, produzindo excelente economia de insumos.

Condições de análise necessárias para promover conversão completa de ácidos graxos para FAME

Para se avaliar a eficiência de conversão dos ácidos graxos a ésteres metílicos utilizou-se coluna capilar de sílica fundida termoestabilizada compatível com altas temperaturas de análise por CGAR que permite a separação de FAME, de triacilgliceróis, mono e diacilgliceróis. Na amostra analisada na Figura 4, observa-se a presença de óleo (triacilgliceróis) e de glicerídios parciais confirmando que não houve saponificação completa do óleo. Para evitar esta ocorrência, no método proposto a saponificação completa é atingida após três etapas de contato no vortex.

Para avaliar a eficiência da etapa de esterificação, utilizou-se análise por CGAR em coluna de FFAP que permite a separação de ácidos graxos dos ésteres metílicos. No método proposto, a esterificação completa dos ácidos graxos a FAME foi atingida após duas etapas de contato em vortex.

A otimização proposta foi avaliada com diferentes óleos de cadeia média rico em ácidos graxos de comprimento de cadeia variando de C8 a C14 e óleos com ácidos graxos de cadeia normal de C16 a C24, conforme pode ser observado nas Figuras 5 e 6.

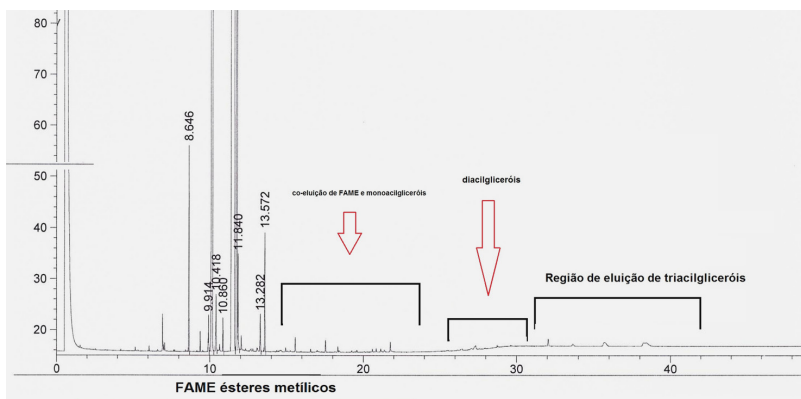


Figura 4. Cromatograma de FAME obtido em condições de hidrólise incompleta do óleo: Coluna TG 5HT (15 m x 0,25 mm x 0,10 µm) – 5% fenil 95% metil silicone. Temp. 50 °C a 180 °C / 15°C/min., de 180 °C a 230 °C/7 °C/min., de 230 °C a 350 °C/10 °C/min, por mais 25 minutos. Injetor a 320 °C, detector a 380 °C, 1:50 e 1 µL

Comparação de resultados do método otimizado com material de referência certificado e ensaio de repetitividade

Para avaliar a exatidão do estudo, foi analisado um material de referência certificado cujos resultados estão apresentados na Tabela 1.

Os resultados obtidos encontram-se dentro das faixas certificadas indicando que o método apresentou precisão satisfatória para os ácidos avaliados. A otimização foi avaliada também em ensaio de proficiência do PRIDAA CITA para patê de

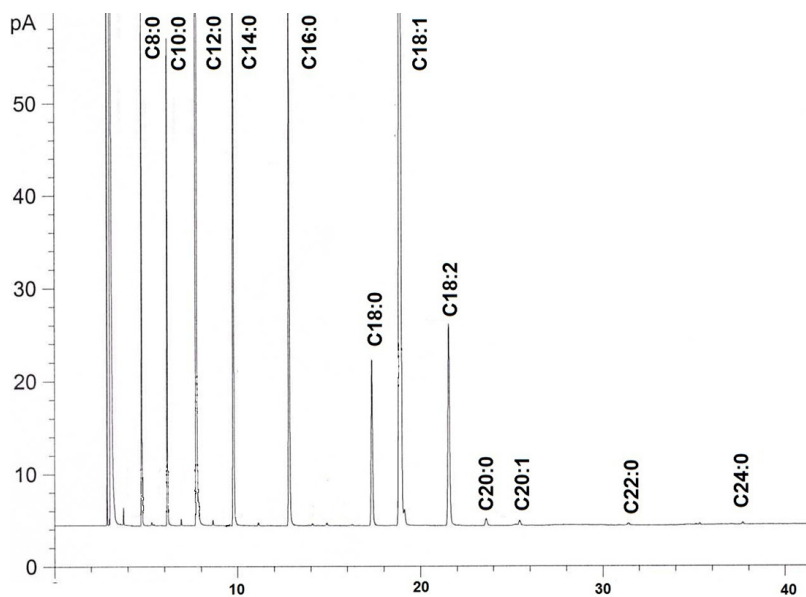


Figura 5. Cromatograma de FAME de óleo de amêndoa de palma em coluna de HP FFAP (25m x 0,2mm x 0,30 μ m) e programação de temperatura de 150 °C a 230 °C; detector a 280 °C e injetora a 250 °C; injeção de 1 μ L de solução 1% em split 1:50

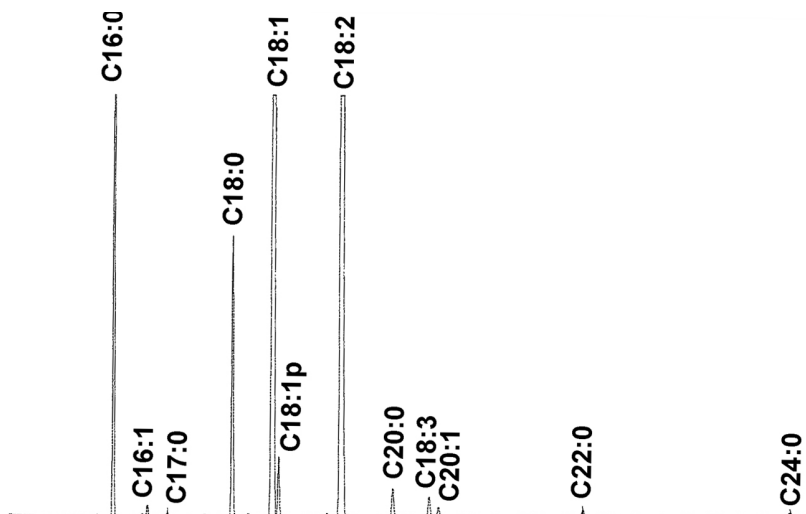


Figura 6. Cromatograma de FAME de óleo de polpa de palma em coluna de HP FFAP (25 m x 0,2 mm x 0,30 μ m) e programação de temperatura de 150 °C a 230 °C; detector a 280 °C e injetor a 250 °C; injeção de 1 μ L de solução 1% em split 1:50.

carne apresentando resultados satisfatórios, de acordo com o critério z score na faixa de ± 2 para todos os ácidos graxos. De acordo com as normas internacionais e documentos nacionais relacionados à validação de métodos, a participação em ensaio de proficiência e a análise de material de referência certificado são requisitos para a validação de métodos de análise (INMETRO, 2018).

Tabela 1. Comparação dos resultados de composição em ácidos graxos para o material de referência certificado (BCR 162 R) com a otimização proposta

Ácido graxo	Valor obtido (%)*	Faixa certificada
C16:0	10,61	10,580 - 10,900
C18:0	2,83	2,780 - 2,860
C18:1	26,83	26,100 - 26,900
C18:2	53,96	53,880 - 54,380
C18:3	3,34	3,300 - 3,400
C20:0	0,39	
C20:1	0,33	
C22:0	0,30	

* média de oito repetições

Em relação à repetitividade da análise foi analisado o óleo de palma cujos resultados estão apresentados na Tabela 2.

Os desvios esperados na análise de ácidos graxos estão relatados na AOCS (2009), como a Diferença Absoluta (DIF ABS) que é a diferença entre o valor mínimo e o máximo, que deve ser menor que 1% para ácidos graxos com teor maior que 5%. Já a Diferença Relativa (DIF REL) que é a diferença entre o maior e o menor valor dividido pela média e multiplicada por 100, deve ser menor que 3% para ácidos graxos com teor maior que 5%.

Tabela 2. Avaliação da repetitividade dos resultados de ácidos graxos de óleo de palma (% do total de ácidos graxos)

Ácido graxo	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0
rep1	0,409	34,755	8,266	43,361	11,944	0,289	0,395
rep2	0,395	34,542	8,290	43,507	11,982	0,291	0,399
rep3	0,408	34,805	8,236	43,350	11,944	0,291	0,385
rep4	0,418	35,072	8,166	43,188	11,906	0,290	0,392
rep5	0,406	34,831	8,236	43,248	11,922	0,288	0,390
rep6	0,414	35,022	8,154	43,144	11,917	0,290	0,389
rep7	0,414	35,066	8,162	43,103	11,901	0,289	0,387
rep8	0,419	35,174	8,195	43,006	11,870	0,288	0,382
rep9	0,416	35,225	8,168	43,127	11,886	0,289	0,379
rep10	0,404	34,884	8,234	43,338	11,941	0,289	0,389
rep11	0,410	35,088	8,253	43,565	12,004	0,292	0,388
rep12	0,410	35,126	8,212	43,353	11,947	0,290	0,387
rep13	0,410	34,742	8,233	43,390	11,949	0,290	0,392
rep14	0,401	34,473	8,273	43,541	11,986	0,292	0,405
rep15	0,417	35,194	8,159	43,088	11,878	0,290	0,382
rep16	0,417	35,229	8,150	43,072	11,875	0,288	0,381
média	0,411	34,952	8,212	43,274	11,928	0,290	0,389
DP	0,007	0,240	0,047	0,177	0,041	0,001	0,007
CV	1,645	0,686	0,573	0,410	0,345	0,415	1,753
mínimo	0,395	34,473	8,150	43,006	11,870	0,288	0,379
máximo	0,419	35,229	8,290	43,565	12,004	0,292	0,405
DIF ABS	0,024	0,756	0,139	0,559	0,133	0,004	0,026
DIF REL	5,82	2,16	1,70	1,29	1,12	1,31	6,80

Rep – repetição; DP desvio padrão; CV coeficiente de variação (%); DIFABS (diferença entre o valor mínimo e o máximo); DIF REL (diferença entre o maior e o menor valor dividido pela média e multiplicada por 100).

Adicionalmente, optou-se por utilizar-se coeficiente de variação (CV) menor que 3% para ácidos graxos com teor menor que 1% e CV menor que 1% para os demais ácidos graxos. Os resultados obtidos estão em consonância com os desvios previstos na AOCS (2009) e avalia-se que a repetitividade do método é adequada, especialmente para este tipo de gordura que é sólida, e seria o tipo de amostra mais crítica para análise, considerando-se que a fusão, homogeneização e pesagem do óleo são etapas críticas devido à rápida cristalização da gordura.

A otimização foi também avaliada para óleos de amêndoa de dendê (óleo do tipo láurico), óleo de soja (rico em C18:3), híbrido de palma e caiaué (*Elaeis oleifera*) e os resultados atenderam aos requisitos de repetitividade descritos acima.

Conclusões

A otimização do método Hartman e Lago (1973) para tubos do tipo falcon permitiu a redução do volume de reagentes e de solventes em 50% e 80%, respectivamente.

O tempo de análise foi reduzido permitindo a execução de 24 amostras por dia em relação ao método original de três amostras/dia (em triplicata).

A otimização do método nas condições relatadas permitiu conversão completa dos ácidos graxos para ésteres metílicos de ácidos graxos.

A otimização apresentada foi avaliada quanto à precisão, pela análise de material de referência certificado e participação em ensaio de proficiência, com resultados satisfatórios de acordo com os critérios de normas nacionais e internacionais de validação. Quanto à repetitividade, a otimização do método atendeu aos critérios estabelecidos pela American Oil Chemists' Society (2009).

Referências

ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p. 353-380, 2001.

ANTONIASSI, R.; GAMA, M. A. S.; WILHELM, A. E.; FARIA-MACHADO, A. F.; GUEDES, A. M. M.; BIZZO, H. R. Interferência de solventes utilizados na extração da gordura do leite na

determinação do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa. In: ENCONTRO NACIONAL, 20.; CONGRESSO LATINO AMERICANO DE ANALISTAS DE ALIMENTOS, 6., 2017. Belém. Segurança e qualidade de alimentos. Belém, PA: LACEN: UFPA, 2017. p. 1-6. ENAAL. 1 CD-ROM. Seção Trabalhos. Ref. 2564. Promoção: SBAAL. 13 a 16 de agosto. 6 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANTITÁRIA (Brasil). RDC nº 54, de 12 de nov. de 2012. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, Brasília, DF, n. 219, p. 122. 13 nov. 2012. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/4825974/%281%29RDC_54_2012_.pdf/921d3c25-cef9-40d8-9b3f-7861eb7b8235>. Acesso em: 31 out. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (Brasil). RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, Brasília, DF, n. 251, p. 33. 26 dez. 2003. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_360_2003_COMP.pdf/caab87a1-e912-459f-8bc0-831a48b95da9>. Acesso em: 12 dez. 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 18th ed. Gaithersburg: AOAC, 2010.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 6th ed. Champaign, IL: AOCS, 2009.

CHRISTIE, W. W. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. **Journal of Lipid Research**, v. 23, n. 7, p. 1072-1075, 1982.

CHRISTIE, W. W. **Gas Chromatography and Lipids, a Practical Guide**. Ayr, Scotland: The Oily Press, 1989. 307 p.

CHRISTIE, W. W. Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. **Advances in lipid methodology**, v. 2, n. 69, p. e111, 1993.

FAO. **Fats and Fatty acids in human Nutrition**: Report of an expert consultation. Rome: FAO, 2010. 166 p. (FAO. Food and Nutrition Paper, 91). Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i1953e.pdf>>. Acesso em: 31 out. 2018.

FARIA-MACHADO, A. F.; ANTONIASSI, R.; WILHELM, A. E.; GUEDES, A. M. M.; SCOFANO, M.; SILVA, L. F. O.; GONÇALVES, E. D.; BIZZO, H. R. Fatty acid composition of monovarietal olive oils grown in Brazil. In: SIMPÓSIO CIENTÍFICO-TÉCNICO EXPOLIVA, 18., 2017, Jaén, Espanha. [Anais...]: Comunicaciones Científicas. Espanha, 2017. 6 p.

GAMA, M. A. S.; BARBOSA FILHO, H. G.; BIZZO, H. R.; ANTONIASSI, R. Analytical shortcomings and other considerations related to the identification of biomarkers of dairy fat intake. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 71, p. 1022-1023, 2017.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 6, p. 475-494, 1973.

INMETRO. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo: DOQ-CGRE-008. Rev. 07. jul. 2018. 28 p.

MACHADO, A. F. de F.; WILHELM, A. E.; GUEDES, A. M. M.; BIZZO, H. R.; OLIVEIRA, M. E. C.; YOKOYAMA, R.; BORGES, P. P. V.; ANTONIASSI, R. Óleo de palma de alto oleico produzido no Brasil. In: CONGRESSO LUSO-BRASILEIRO DE HORTICULTURA, 1., 2018, Lisboa. Lisboa: Associação Portuguesa de Horticultura, mar., 2018. p. 581-586. (Actas Portuguesas de Horticultura, 29). Suporte eletrônico. ISBN: 978-972-8936-28-0. I CLBHort. Editores Paulo César Tavares de Melo, António Calado. 1-4 nov. 2017a.

MACHADO, A. F. de F.; WILHELM, A. E.; GUEDES, A. M. M.; OLIVEIRA, A. F.; SILVA, L. F. O. da; GONÇALVES, E. D.; JORGE, R. O.; SCOFANO, M.; BIZZO, H. R.; ANTONIASSI, R. Qualidade de azeites de oliva extravirgens produzidos no Brasil. In: CONGRESSO LUSO-BRASILEIRO DE HORTICULTURA, 1., 2018, Lisboa. Lisboa: Associação Portuguesa de Horticultura, mar., 2018. p. 531-536. (Actas Portuguesas de Horticultura, 29). Suporte eletrônico. ISBN: 978-972-8936-28-0. I CLBHort. Editores Paulo César Tavares de Melo, António Calado. 1-4 nov. 2017b.



Agroindústria de Alimentos



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

