

INTERFERÊNCIA DE SOLVENTES UTILIZADOS NA EXTRAÇÃO DA GORDURA DO LEITE NA DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS POR CROMATOGRAFIA GASOSA

Antoniassi R¹; Gama MAS²; Wilhelm, AE¹; Faria-Machado, AF¹; Guedes AMM¹; Bizzo HR¹

¹Embrapa Agroindústria de Alimentos; ²Embrapa Gado de Leite

Introdução

O perfil de ácidos graxos do leite e produtos lácteos é, geralmente, determinado por cromatografia gasosa utilizando-se colunas capilares de alta polaridade de 100 ou 200 metros, permitindo a separação de parte dos isômeros de posição e geométricos de ácidos graxos da gordura do leite (Delmonte et al., 2007; Lindmark Månsson, 2008). Os ácidos graxos poli-insaturados, em particular aqueles contendo duplas ligações conjugadas (ex.: CLA), são susceptíveis à isomerização durante a etapa de transesterificação da gordura do leite, enquanto que os ácidos graxos de cadeia curta, notadamente o C4:0, podem volatilizar quando altas temperaturas são empregadas. De forma a minimizar a ocorrência destes eventos, os métodos de extração e transesterificação metílica da gordura do leite comumente utilizados são realizados à temperatura ambiente e com uso de catálise alcalina (ex.: metóxido de sódio em metanol).

Alguns métodos oficiais de extração da gordura de leite, como o AOAC 989.05, utilizam hidróxido de amônio na presença de etanol, com subsequente extração com éter etílico e de éter de petróleo. Outros métodos de extração, como o descrito por Chouinard et al, (1999), utilizam uma mistura de hexano com isopropanol. No entanto, a presença de resíduos de etanol e isopropanol na fração lipídica pode, potencialmente, levar à formação de ésteres etílicos e propílicos durante a transesterificação, interferindo na identificação e quantificação dos ésteres metílicos. Além disso, resíduos de solventes, como o metanol usado na transesterificação, ou ainda o éter etílico, o etanol e o isopropanol usados na extração podem coeluir com os ácidos graxos de cadeia curta presentes na gordura do leite.

Neste trabalho, etanol, isopropanol e solventes utilizados nos métodos de extração da gordura do leite, foram avaliados quanto à sua possível interferência na determinação do perfil de ácidos graxos de leite por cromatografia gasosa.

Material e Métodos

Material

Foi utilizado o padrão de triacilglicerol de C11:0 da marca SIGMA. Os solventes utilizados foram de grau PA, CG e HPLC.

Métodos

A transesterificação metílica foi realizada utilizando-se metóxido de sódio com adição de acetato de metila, conforme descrito por Christie (1993).

A análise cromatográfica por CGAR foi realizada em coluna de CP- SIL 88 (100 m x 0,32 μ m x 0,2mm) em equipamento Agilent 7890 com detector de ionização de chama a 280°C e injetor a 250°C, nas condições descritas por Cruz-Hernandez et al (2007). A análise por CG/EM (cromatografia gasosa com detector seletivo) foi realizada em equipamento Agilent 7890 e detector de massas Agilent 5973, utilizando-se coluna de HP5 (30 m x 0,25 μ m x 0,25mm) com programação de temperatura de 40 a 200°C.

Para se avaliar o efeito da presença de etanol e isopropanol na transesterificação metílica, o padrão de C11 foi dissolvido em hexano (0,04 g/mL) e a transesterificação foi realizada apenas com metanol e na proporção de 1:20 de etanol ou isopropanol em relação ao metanol, seguido de análise por CG/EM.

Os métodos de extração de gordura 989.05 (AOAC, 2010) e com hexano:isopropanol (Chouinard et al, 1999) foram aplicados sem adição de amostra e o solvente da extração, bem como as misturas de solventes utilizados, foram avaliados por CG/EM por monitoramento seletivo de íons e por CGAR.

Resultados e Discussão

Pelo cromatograma de íons totais da transesterificação metílica de C11 na presença de etanol por CG/EM (Figura 1 e Tabela 1) observou-se que éster metílico de C11 foi o componente majoritário, acompanhado pela presença de outros ésteres metílicos de ácidos graxos como C10 e C12 e C14, indicando que o padrão não é puro. Foi observada a formação de éster etílico de C11, embora o etanol estivesse presente na proporção de 1:20 em relação ao metanol. Resultado similar ocorreu com isopropanol, cujo éster propílico de C11 co-eluiu com éster metílico de C12 (C12OMe). Apesar das baixas proporções utilizadas (Tabela 1), a presença de outros álcoois além de metanol pode gerar outros compostos além da série metílica, resultando em erros de identificação e de quantificação de ácidos graxos.

O método de transesterificação de lipídios do leite com metóxido de sódio é rápido, com tempo de contato sob agitação em vortex de 2 minutos para reação. Nas condições avaliadas houve formação de ésteres etílicos e propílicos, apesar da elevada proporção de metanol e da transesterificação metílica ser mais rápida que a síntese etílica ou propílica.

Os métodos de extração de lipídios com hidróxido de amônio e etanol (AOAC 989.05) e com hexano:isopropanol (Chouinard et al, 1999) foram realizados

sem adição de amostra e os resultados observados pela análise por CG/EM por monitoramento seletivo de íons. Os álcoois foram encontrados nos solventes após extração e podem permanecer no extrato lipídico mesmo após evaporação dos solventes em rotavapor.

Nos métodos de extração de gordura de leite, a adição de isopropanol e de etanol se justifica para aumentar o contato entre as fases aquosa e a gordura. Após o rompimento de ligação entre lipídios e proteína, adiciona-se o solvente apolar e água para promover a separação entre gordura e proteína. Nestes casos, os álcoois tenderiam a se solubilizar em água, mas como se trata de partição, uma parte pode permanecer em solvente apolar. A remoção do solvente, entretanto, não impede que traços de álcool estejam presentes na gordura de leite e interfiram na transesterificação metílica.

Na análise por CGAR ocorreu eluição de metanol, etanol e isopropanol na região dos ácidos graxos mais leves, sendo que o metanol promoveu uma elevação da linha de base do cromatograma na coluna de 100 metros, prejudicando a separação e a quantificação dos ácidos graxos de cadeia curta (Figura 2). A transesterificação metílica é, em geral, uma reação em micro-escala em tubos de ensaio, na qual os ésteres metílicos não são lavados, e resíduos como glicerol, metanol e reagentes são removidos por adsorção. Desta maneira, é necessário avaliar a possível interferência do metanol nesta análise.

Foi observado, ainda, que o BHT, um antioxidante muito comum em éter etílico pode permanecer também no extrato lipídico, eluindo na região dos ésteres metílicos de C14:0.

CONCLUSÃO

Foi observado que etanol e isopropanol provenientes dos métodos de extração de gordura podem gerar ésteres etílicos e propílicos e, assim, interferir na quantificação e identificação dos ácidos graxos da gordura de leite.

Resíduos de alcoóis como metanol, etanol e isopropanol eluem na região dos ácidos graxos de cadeia curta e o BHT presente no éter etílico eluiu próximo de C14:0 e ainda, o metanol pode elevar a linha de base da corrida cromatográfica nesta mesma região, podendo levar a erros de identificação e quantificação dos ácidos graxos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AOAC - Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL (2005) 18th Ed., AOAC INTERNATIONAL , Gaithersburg, MD, USA
2. Christie WW Preparation of ester derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: Advances in Lipid Methodology – Two; 1993. pp. 69-111.

3. Chouinard PY, Corneau L, Barbano DM, Metzger LE, Bauman DE The Journal of nutrition; 1999;129(8):1579-1584.
4. Cruz-Hernandez C, Kramer JK, Kennelly JJ, Glimm DR, Sorensen BM, Okine EK et al. J Dairy Sci; 2007;90(8):3786-3801.
5. Delmonte P, Kia ARF, Kramer JK, Mossoba MM, Sidisky L, Rader JI. Journal of Chromatography A, 2011;1218(3):545-554.
6. Lindmark Månsson H Food & nutrition research, 2008;52(1):1821.

Tabela 1. Resultados de proporções de ésteres de ácidos graxos (%) do cromatograma de íons totais por CG/EM

Ácido Graxo	Transesterificação metílica (Controle)	Transesterificação etanol:metanol 1:20	Transesterificação isopropanol:metanol 1:20
C10OMe	0,4	0,34	0,34
C11OMe	98,7	98,7	98,2
C11OEt	-	0,2	-
C11OProp+C12OMe	-	-	0,8
C12OMe	0,14	0,1	-
C14OMe	0,24	0,19	0,19

OMe – Ester metílico

OEt – Éster etílico

OProp – éster propílico

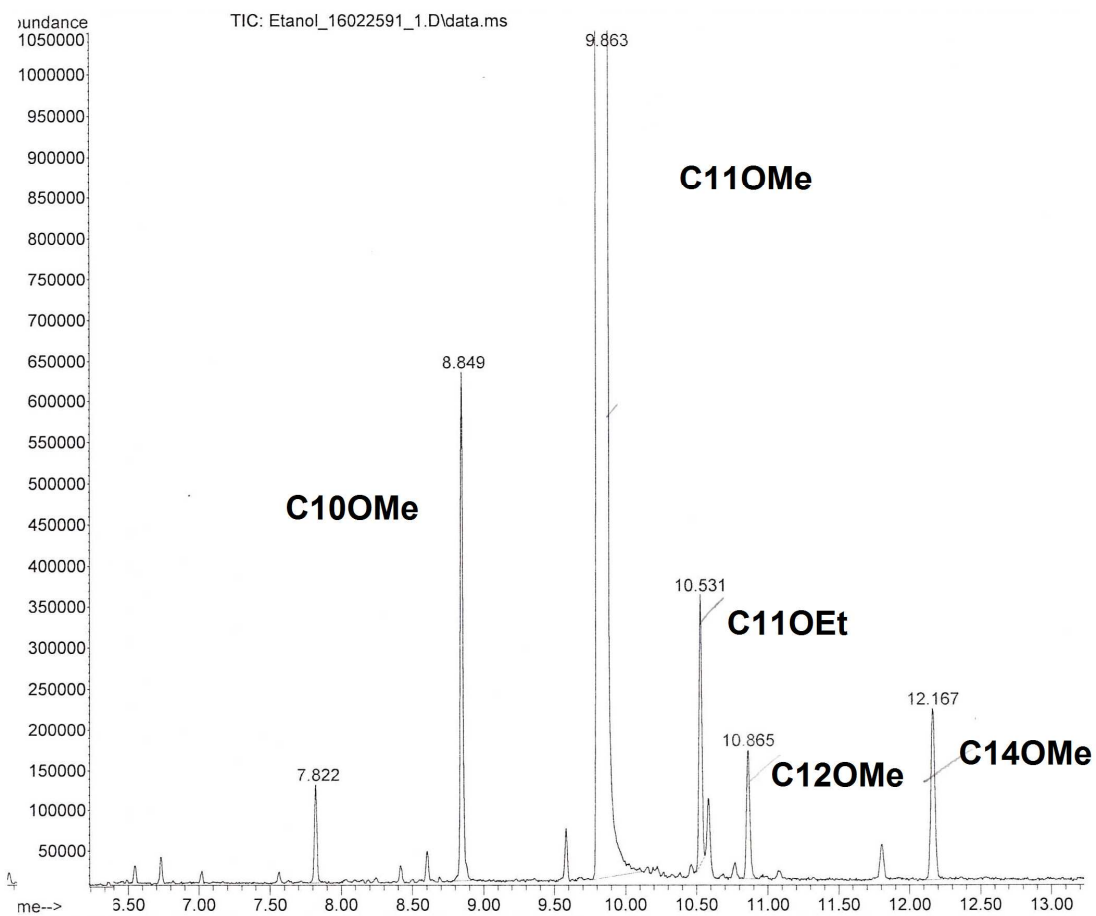


Figura 1. Cromatograma de íons totais da análise por CG/EM da transesterificação com metóxido de sódio de padrão de triacilglicerol C11, com solução de etanol:metanol 1:20 v/v. (C11OMe – éster Metílico de C11; C11OEt – éster etílico de C11)

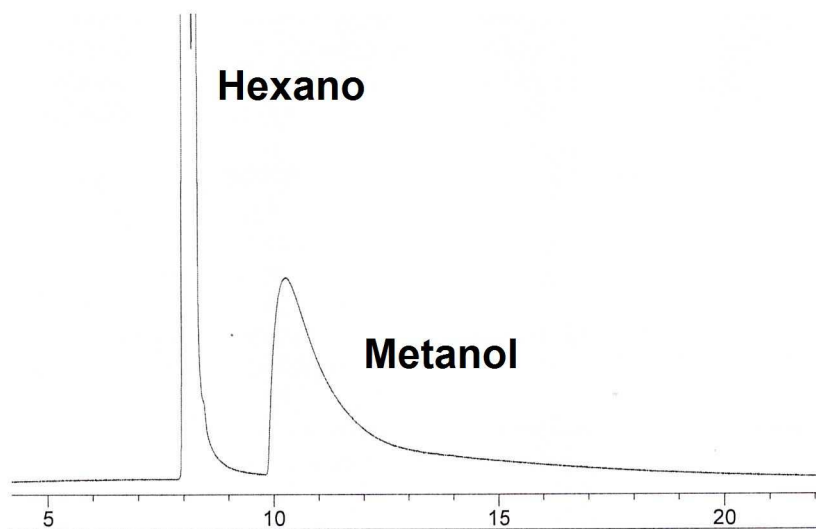


Figura 2. Cromatograma por CGAR em coluna CPSil 88 de 100 m x 0,32 mm x 0,2 μ m de solução de 1mL de hexano e 60 μ L de metanol, nas condições reportadas por Cruz Hernandez et al (2007)