

Comparação de métodos analíticos para determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil

Comparison of analytical methods in the determination of lipids and polyunsaturated fatty acids by gas chromatography in infant formula

RIALA6/1184

Mahyara Markievicz Mancio KUS^{1*}, Sabria AUED-PIMENTEL², Jorge MANCINI-FILHO¹

*Endereço para correspondência: Rua Boa Vista, 128, Centro, Mogi das Cruzes, SP, Brasil, CEP 08717-140, e-mail: mahyarakus@yahoo.com.br

¹Laboratório de Lipídeos, Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

²Divisão de Bromatologia e Química, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

Recebido: 10.02.2009 – Aceito para publicação: 26.03.2009

RESUMO

Os ácidos graxos polinsaturados de cadeia de longa participam em diversos processos fisiológicos e metabólicos no organismo humano, além de serem importantes na nutrição infantil. Os ácidos graxos são suplementados em fórmulas infantis utilizadas como substituto de leite materno. A quantificação dos ácidos graxos polinsaturados, em virtude da presença de vários sítios reativos na molécula, requer processos de extração da gordura em condições brandas. No presente trabalho foram comparadas as metodologias analíticas para determinação de lipídios totais e ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil. Nessa análise foi utilizada uma amostra de fórmula infantil (NIST) e foram empregadas as metodologias descritas nas Normas do Instituto Adolfo Lutz e pela AOAC (Association of Official Analytical Chemistry). A quantificação dos ácidos graxos foi realizada utilizando-se diferentes padrões interno e fatores de correção do detector de ionização em chama. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados de lipídios totais e ácidos graxos polinsaturados obtidos por meio de diferentes métodos de extração de gordura. As menores taxas de dispersão (%CV) de ácidos graxos polinsaturados foram obtidas pela metodologia oficial AOAC, que indica a preservação desses componentes, porém com menor recuperação dos lipídios. O uso de padrão interno do éster metílico de ácido graxo 23:0 e de fator de correção teórico do detector de ionização em chama em relação ao próprio padrão interno mostrou-se como o mais adequado para efetuar o cálculo dos ácidos graxos polinsaturados.

Palavras-chave. ácidos graxos polinsaturados, fórmula infantil, método analítico, cromatografia gasosa, lipídeos.

ABSTRACT

Long chain polyunsaturated fatty acids are involved in several physiological and metabolic processes of human organism. Considering the fatty acids as crucial compound in the infantile nutrition, they have been supplemented in infant formula to substitute maternal milk. For quantifying the long chain polyunsaturated fatty acids requires a fat extraction process in mild conditions, due to the occurrence of reactive sites in their molecules. In the present work the analytical methods for determining the polyunsaturated fatty acid and lipids in infantile formula were compared. For these purposes, a sample of infantile formula from the National Institute of Standards and Technology was analyzed, following methodologies described in the “*Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz*” and the Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). The polyunsaturated fatty acid contents were assessed by using distinct internal standards and correction factors for flame ionization detector. Significant differences ($p < 0.05$) were found among the total lipids and polyunsaturated fatty acids results, in infantile formula analyzed on different lipid extraction methods. The lowest dispersions results (rsd %), of polyunsaturated fatty acid were observed by the AOAC methodology. According to these data, the use of fatty acid methyl ester 23:0 internal standard and of theoretical correction factors of flame ionization detector in relation to the internal standard itself were the most suitable for determining the polyunsaturated fatty acid.

Key words. polyunsaturated fatty acid, infantile formula, analytical methodology, gas chromatography, lipids.

INTRODUÇÃO

A partir de meados dos anos de 1950 surgiu a ideia de alimentar crianças com o uso de fórmulas infantis desde o nascimento¹. Nos últimos anos houve uma notável melhoria nas fórmulas infantis. Atualmente há várias opções e estão sendo suplementadas para se tornarem parecidas com a composição do leite materno humano².

Os lipídios nas fórmulas infantis são compostos por diferentes fontes de gordura, podendo ser de origem animal (gordura láctea), vegetal (óleo de canola, óleo de milho, óleo de coco, óleo de palma) e ácidos graxos polinsaturados microencapsulados³. Na gordura láctea há predomínio de ácidos graxos saturados e no leite humano há uma maior quantidade de ácidos graxos insaturados quando comparado com o leite de vaca. Havendo diferenças nas proporções de ácidos graxos saturados e insaturados nestas fontes de lipídicas, torna-se importante a análise do perfil de ácidos graxos nestes alimentos, pois quanto maior for o tamanho da cadeia e mais saturada, menor sua absorção no organismo⁴.

O ácido linoleico (18:2 ω -6) e o ácido α -linolênico (18:3 ω -3) são ácidos graxos essenciais, pois não podem ser sintetizados endogenamente pelos seres humanos e alguns animais. Além disso, são precursores das séries ω -3 e ω -6, originando os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, entre eles o ácido araquidônico (20:4 ω -6) e o ácido docosahexaenoico (22:6 ω -3)². O recém-nascido, entretanto, tem um limite na capacidade de produção de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, em particular quando a dieta é pobre em seus precursores⁵. Dessa maneira, há a necessidade da suplementação desses ácidos graxos nas fórmulas infantis².

Ácidos graxos polinsaturados atuam em diversos processos fisiológicos e metabólicos, e são importantes na nutrição infantil pelo seu rápido aumento no cérebro durante o primeiro ano de vida^{6,7}. O ácido araquidônico é importante precursor da “série 2” dos eicosanoides, que são importantes biomedadores. Os ácidos graxos araquidônico e docosahexaenoico são os principais componentes da membrana fosfolipídica das células e são os ácidos graxos polinsaturados predominantes no sistema nervoso central. O ácido docosahexaenoico é o ácido graxo mais abundante na membrana foto receptora da retina².

Estudo realizado por Straarup et al. (2006)⁸, na Dinamarca, demonstrou que apenas quatro das 28 fórmulas infantis analisadas encontravam-se com níveis

superiores de ácido α -linolênico preconizado pela legislação daquele país. Em um pequeno número, especialmente aquelas para necessidades especiais, encontrou-se alto conteúdo de ácido linoleico e para a razão de ácido linoleico/ácido α -linolênico obtiveram-se valores entre 17:1 e 55:1. Recentes estudos indicam que a formação do ácido docosahexaenoico é inibida pela alta disponibilidade do ácido linoleico. A razão de ácido linoleico e ácido α -linolênico e a presença de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa em algumas formulas infantis comercializadas na Dinamarca demonstrou que houve uma melhora no perfil dos ácidos graxos, entretanto o conteúdo de α -linolênico ainda é baixo e o de ácido linoleico é alto comparado com a recomendação e com o leite das dinamarquesas. Somente algumas das fórmulas infantis estudadas continham ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa.

As recomendações de organismos internacionais e de legislações locais para fórmula infantil baseiam-se na composição do leite materno humano⁹. A legislação brasileira, Portaria nº 977 (1998)¹⁰, preconiza valores para gordura total e ácido linoleico, entre outros macro e micronutrientes. A Norma *Codex Alimentarius* stan 72-1981¹¹, depois de uma revisão realizada em 2007, aceitou as recomendações de um grupo da The European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN)⁹, o qual recomenda valores além dos lipídios totais e ácido linoleico, para ácido α -linolênico, razão de ácido linoleico/ α -linolênico, ácido araquidônico, ácido docosahexaenoico, ácidos graxos *trans*, soma dos ácidos mirístico e palmítico e ácido erúico.

A quantificação dos lipídios nos alimentos é realizada, tradicionalmente, por extração com solventes orgânicos (éter etílico, éter de petróleo, clorofórmio e metanol) e determinação gravimétrica. A habilidade de recuperar os vários componentes dos lipídios varia com o solvente de extração. Solventes mais polares como clorofórmio/metanol extraem lipídios polares, incluindo fosfolipídios, esteróis, terpenos, graxas, hidrocarbonetos e materiais não lipídicos¹². Matrizes alimentares ainda podem ser previamente tratadas, com hidrólise em meio básico para solubilizar proteínas, adição de ácido para quebrar emulsão ou hidrolizar lipídios de matrizes complexas^{12,13}. No caso das fórmulas infantis a quantificação dos ácidos graxos polinsaturados, devido à presença de vários sítios reativos na molécula (insaturações), deve envolver processos de extração da gordura em condições amenas, pois, podem

ocorrer reações de degradação e/ou isomerização nas insaturações dos ácidos graxos polinsaturados, podendo gerar resultados discrepantes na quantificação destes ácidos graxos¹².

Estudos de comparação de metodologias para ácidos graxos polinsaturados são muito importantes e de difícil execução, pois são realizadas diversas etapas e em cada uma delas há parâmetros que influenciam na quantificação final dos ácidos graxos. Além disso, gera subsídios para padronização de metodologia nos diversos laboratórios, fato este relevante, pois, os alimentos estão sendo suplementados com estes ácidos graxos, e sua correta quantificação torna-se necessária para uma clara informação ao consumidor.

O objetivo desse estudo foi comparar os métodos de extração de lipídios e quantificação (fatores de resposta do detector de ionização de chama e padrões interno) dos ácidos graxos polinsaturados: ácido linoleico, ácido α -linolênico, ácido araquidônico e ácido docosahexaenoico em amostra de referência de fórmula infantil da National Institute of Standard and Technological (NIST 1849/2006).

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Para o estudo foi utilizada uma amostra de fórmula infantil da NIST 1849/2006, que tem indicados os teores de ácido linoleico, ácido α -linolênico, ácido araquidônico e ácido docosahexaenoico. A amostra foi armazenada em freezer. As análises foram realizadas entre os anos de 2006 a 2008.

■ Reagentes e padrões

Os solventes e reagentes utilizados para as etapas de extração de gordura e preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram de grau analítico: metanol, clorofórmio, éter de petróleo, éter etílico, etanol a 95%, ácido clorídrico, hidróxido de amônio, hidróxido de potássio, sulfato de sódio e hidróxido de sódio. Foram também utilizados os seguintes solventes de grau cromatográfico: n-hexano e metanol.

Foram utilizados dois padrões cromatográficos de triacilgliceróis 11:0 e 13:0 e de éster metílico de ácido graxo 13:0, 21:0 e 23:0, marca Sigma com alta pureza.

Para identificar os componentes foram utilizados: uma mistura com quantidades certificadas de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos, variando de 4:0 a

24:0, marca Supelco; uma de ésteres metílicos de ácidos graxos dos isômeros *cis-trans* do ácido linoleico (18:2) e ácido α -linolênico (18:3), marca Sigma; e padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos individuais, marca Sigma, sendo: elaídico (18:1 9*t*); vacênico (18:1 11*c*); *trans* vacênico (18:1 11*t*); (18:1 7*c*); (18:1 12*c*); CLA (18:2 9*c*, 11*t* e 18:2 10*t*, 12*c*); palmitoelaídico (16:1 9*t*), palmitico (16:0); linolelaídico (18:2 9*t*, 12*t*); EPA (20:5 5*c*, 8*c*, 11*c*, 14*c*, 17*c*); araquidônico (20:4 5*c*, 8*c*, 11*c*, 14*c*); docosahexaenoico (20:6 4*c*, 7*c*, 10*c*, 13*c*, 16*c*, 19*c*).

Métodos

■ Determinação de lipídios totais

A determinação de lipídios totais foi realizada de acordo com os métodos gravimétricos descritos por Bligh e Dyer¹⁴; AOAC 963.15¹⁵ (hidrólise ácida) e Roese Gottlieb¹⁶ (AOAC 989.05) e método de cálculo pela somatória de ácidos graxos como triacilgliceróis de acordo com a AOAC 996.06¹⁶ (hidrólise ácida).

■ Preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos

Três metodologias foram comparadas para a preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos: Hartman e Lago¹⁷, modificado por Maia e Rodrigues-Amaya¹⁸ (catálise mista, básica e ácida), o qual possui reagentes menos tóxicos que o método oficial do AOAC, que utiliza trifluoreto de boro; IUPAC¹⁹ (meio básico, KOH), sendo que este método utiliza reagentes simples e é de rápida execução; *in situ*²⁰ (básico, com metóxido de sódio), metodologia amplamente estudada por realizar em uma única etapa a extração de gordura e preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos.

■ Análise dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa

Os ácidos graxos foram analisados em cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama, da marca Shimadzu e modelo 17A, com coluna capilar de sílica fundida com fase 100% bis-cianopropil polisiloxana (SP 2560) de 100m, 0,25mm de diâmetro e 0,20 μ m de espessura de filme. A otimização das condições cromatográficas foi realizada em estudo prévio, descrito por Aued-Pimentel²¹. Foram empregadas as seguintes condições: temperatura do injetor e detector: 250°C; fluxo – 1,90 mL/min; rampa de temperatura: 45 °C (1 min); 13 °C/min até 175 °C; 4 °C/min até 215 °C por 35 min; gás de arraste: hidrogênio; pressão na coluna: 175

kPa; razão de divisão da amostra 1:15.

■ Quantificação dos ácidos graxos

A quantificação dos ácidos graxos foi realizada pela adição de padrão interno à gordura extraída das fórmulas infantis. Os padrões utilizados foram os ésteres metílicos de ácidos graxos 13:0, 21:0, 23:0; e os cálculos foram realizados de acordo com a equação 1¹⁵ e expressos em g/100 g de amostra:

$$conc_{AG_i} = \frac{M_{PI} \cdot A_{AG_i} \cdot K'_{AG_i} \cdot f_{AG_i} \cdot L}{m \cdot A_{PI}} \quad (1)$$

Onde:

M_{PI} = massa do padrão interno adicionada à amostra;

A_{AG_i} = área do éster metílico de ácido graxo no cromatograma da amostra;

K'_{AG_i} = fator de correção de resposta de cada éster metílico de ácido graxos no detector de ionização em chama com relação ao 16:0, 18:0 ou 23:0;

f_{AG_i} = fator de conversão de éster metílico de ácido graxos para ácido graxo¹⁵;

L = teor de lipídios em gramas por cem gramas de amostra;

m = massa da amostra em gramas;

A_{PI} = área do padrão interno do éster metílico de ácido graxo no cromatograma da amostra.

No método de determinação da gordura por cálculo adicionou-se o triacilglicerol 13:0 e ésteres metílicos de ácidos graxos 21:0 e 23:0 no começo da extração, os ácidos graxos foram calculados de acordo com as equações 2 e 3¹⁶, e a gordura total a partir da soma dos componentes em forma de triacilglicerol, de acordo com a equação 4¹⁶.

$$M_{EMAG_i} = \frac{A_{AG_i} \cdot m_{PI} \cdot 1,0059 \cdot K'_{AG_i}}{A_{AGPI}} \quad (2)$$

Onde:

M_{EMAG_i} = massa de cada componente de éster metílico de ácido graxo;

A_{AG_i} = área do pico de cada componente;

m_{PI} = massa do padrão interno;

1,0059 = fator de conversão do padrão interno de triacilglicerol em éster metílico de ácido graxo correspondente;

K'_{AG_i} = fator de resposta experimental do detector de ionização em chama, em relação ao padrão interno;

A_{AGPI} = área do pico do padrão interno.

$$M_{AG_i} = M_{EMAG_i} \cdot f_{AG_i} \quad (3)$$

$$M_{TAG_i} = M_{EMAG_i} \cdot f_{TAG_i} \quad (4)$$

M_{AG_i} = massa de cada componente expressa como ácido graxo correspondente;

f_{AG_i} = fator de conversão de éster metílico de ácido graxo em ácido graxo¹⁶.

M_{TAG_i} = massa de cada componente expressa como triacilglicerol correspondente ;

f_{TAG_i} = fator de conversão de éster metílico de ácido graxo em triacilglicerol¹⁶.

Para a quantificação dos ácidos utilizaram-se fatores de resposta do detector de ionização de chama teóricos em relação aos ácidos graxos 16:0, 18:0 e 23:0, calculados de acordo com as equações 5 e 6^{22,23}.

$$K_{AG_i} = \frac{M_{AG_i}}{(n_{AG_i} - 1) \cdot A_c} \quad (5)$$

K_{AG_i} = fator de correção da resposta para o ácido graxo "i".

M_{AG_i} = massa molecular do éster metílico de ácido graxo "i".

n_{AG_i} = número de átomos de carbono do éster metílico do ácido graxo "i".

A_c = massa atômica do carbono (12,01).

$$K' = \frac{K_{AG_i}}{K_{PI}} \quad (6)$$

K'_{AG_i} = fator relativo de correção, para o éster metílico de ácido graxo "i".

K_{PI} = fator de resposta do detector de ionização em chama em relação ao 16:0, 18:0 ou 23:0.

K_{AG_i} = fator de resposta do detector de ionização em chama para o ácido graxo "i".

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão. Para a comparação dos procedimentos foi aplicado teste de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Foram calculados os coeficientes de variação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios obtidos para a comparação das variáveis para a quantificação dos ácidos graxos foram realizados em etapas distintas e independentes. No caso da extração de lipídios as análises foram feitas quando a amostra chegou ao laboratório, nos anos de 2006 e 2007, e as demais comparações, durante o decorrer do estudo, sendo o último estudo da metodologia *in situ* e conseqüentemente a comparação dos métodos de metilação, nos anos de 2007 e 2008.

■ Determinação dos lipídios ou gordura total

A Tabela 1 apresenta os valores de lipídios para a amostra da NIST 1849/2006 pelos diferentes métodos de extração, entretanto esta amostra não apresentava valor indicativo para lipídios.

Os métodos de extração de lipídios revelaram diferenças estatísticas entre eles. Pelo método gravimétrico por hidrólise ácida obteve-se o maior teor de lipídios. Os métodos de Bligh e Dyer e o de Roese Gottlieb não apresentaram diferença estatisticamente entre eles, bem como os métodos de Roese Gottlieb e AOAC 996.06. O tratamento ácido prévio pode extrair componentes não lipídicos da amostra, como glicerol, carboidratos de baixo peso molecular, aminoácidos e sais de ureia, superestimando assim os valores¹². O método por cálculo, de acordo com a AOAC 996.06, demonstrou resultados

comparáveis aos demais métodos. Este método considera como lipídios totais a soma dos ácidos graxos de todas as fontes lipídicas, expressos como triacilgliceróis, entretanto necessita de um maior número de padrões de éster metílico de ácido graxo para identificação dos picos cromatográficos.

O método oficial para determinação de lipídios totais para fórmula infantil segundo a AOAC é o de Roese Gottlieb. Esse método revelou valores próximos ao descrito por Bligh e Dyer, o qual apresentou o menor teor de lipídios. Pelo método de Bligh e Dyer a relação metanol, clorofórmio e água é crítica na etapa de extração¹². No método de Roese Gottlieb é feito um tratamento prévio com álcalis para solubilizar a proteína e facilitar a quebra da emulsão, em seguida ocorre a extração utilizando éter etílico e éter de petróleo¹². O teor de lipídio encontrado pelo método de Roese Gottlieb pode estar relacionado com o tempo de contato da amostra com os solventes, a quantidade de amostra, e a capacidade destes solventes extraírem mono, di e triacilglicerol e apenas alguns lipídios polares^{12,14}.

O método mais apropriado para a determinação de lipídios em fórmula infantil é o método do Roese Gottlieb, pois utiliza condições experimentais brandas não comprometendo as insaturações dos ácidos graxos polinsaturados, extrai apenas os componentes lipídicos dos alimentos, não superestimando seus valores, além de ser o método oficial da AOAC para este produto e o recomendado pelo *Codex Alimentarius*. Entretanto, os resultados indicaram uma menor recuperação da gordura pelo método oficial. Novas tecnologias têm sido empregadas, como o microencapsulamento dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, para suplementação das fórmulas e são apresentadas propostas de validação de métodos para a determinação

Tabela 1. Valores de lipídios para amostra da NIST 1849/2006 pelos diferentes métodos de extração de lipídios

Métodos	Lipídios (g/100g)	
	Média \pm Desvio padrão	CV (%)
HA (AOAC 963.15)	31,53 \pm 0,29 ^a	0,92
HA (AOAC 996.06)	28,20 \pm 0,5 ^b	1,78
Roese Gottlieb	26,71 \pm 0,36 ^{b,c}	1,34
Bligh Dyer	25,15 \pm 0,24 ^c	0,95

Análise realizada em triplicata; HA: hidrólise ácida, CV(%): coeficiente de variação em porcentagem; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si de acordo com ANOVA e teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

de lipídios e ácidos graxos, que utilizam tanto hidrólise ácida como enzimática para digerir as microcápsulas e extrair adequadamente os lipídios e ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa das fórmulas infantis³.

■ Análise dos ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa

Os resultados da comparação entre os três métodos de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos encontram-se na Tabela 2. Para a comparação das metodologias de Hartman e Lago modificada por Maia e Rodrigues-Amaya e IUPAC, a determinação da gordura foi normalizada, isto é, extraída de acordo com Roesse Gottlieb. O padrão interno empregado para o cálculo foi o éster metílico de ácido graxo 23:0. No caso do método *in situ* não há etapa de extração de gordura.

Os três métodos revelaram resultados equivalentes, apenas houve diferenças estatísticas para o ácido α -linolênico. No método descrito pela IUPAC observaram-se os maiores valores, incluindo os desvios padrão, mais altos que os obtidos pela metodologia de Hartman e Lago modificada por Maia e Rodrigues-Amaya^{17,18}.

A metodologia da IUPAC que utiliza como catalisador o KOH metanólico apesar de não ser recomendada para produtos alimentícios devido à ocorrência de hidrólise e formação de ácido graxo livre²⁴, é rápida e tem fornecido resultados adequados para alguns produtos alimentícios²⁵. No presente trabalho, para a fórmula infantil, as limitações acima descritas podem ter gerado desvios-padrão mais altos do que o observado pelo método de Hartman e Lago modificado. Quanto ao método *in situ* este apresentou resultados comparáveis

com o método de Hartman e Lago modificado por Maia e Rodrigues-Amaya. Entretanto mais estudos devem ser realizados, para otimizar esta metodologia, pois, há a influência de variáveis experimentais como a quantidade de água da amostra, acidez, tomada de amostra, entre outros, no desempenho do método²⁰.

■ Determinação dos ácidos graxos polinsaturados

Na Tabela 3 estão presentes os valores de ácidos graxos para os diferentes métodos de extração de lipídios, bem como para os diferentes padrões internos (PI) utilizados. O método AOAC 963.15 foi o que apresentou os teores mais próximos dos valores indicativos, principalmente quando se utiliza os PIs 21:0 e 23:0, fato este explicado pelo maior teor de lipídios. Entretanto, os valores de desvios padrão foram os maiores quando comparado aos outros métodos. Este procedimento utiliza tratamento ácido e a quente, podendo afetar as duplas ligações das moléculas de ácido graxo polinsaturado de cadeia longa e conseqüentemente resultar em maiores dispersões nos resultados¹². Entretanto, pode auxiliar na extração dos lipídios e ácidos graxos no caso de produtos microencapsulados³.

Os métodos de Bligh e Dyer e Roesse Gottlieb são os que mais preservam as ligações características dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, pois utilizam tratamentos brandos. O método por cálculo mostrou resultados satisfatórios quando comparado aos valores indicativos e/ou outros métodos para o ácido linoleico e ácido α -linolênico, quando o cálculo foi com PI 13:0, porém houve uma perda do ácido araquidônico e do ácido docosahexaenoico. O tempo de aquecimento do método (40 min) pode ter desencadeado reações

Tabela 2. Comparação dos teores de AG obtidos por diferentes métodos de preparação para ésteres metílicos de ácidos graxos na amostra de referência de fórmula infantil da NIST

	Roese Gottlieb PI EMAG 23:0		Método "in situ"
	Hartman e Lago	IUPAC	Golay et al.
LA (g/100g)	5,98 ± 0,03 ^a	6,1 ± 0,1 ^a	5,8 ± 0,2 ^a
ALA (g/100g)	0,53 ± 0,01 ^{a,b}	0,540 ± 0,008 ^b	0,51 ± 0,01 ^a
ARA (g/100g)	0,096 ± 0,001 ^a	0,100 ± 0,005 ^a	0,097 ± 0,003 ^a
DHA (g/100g)	0,0224 ± 0,0003 ^a	0,024 ± 0,004 ^a	0,021 ± 0,002 ^a

Média ± desvio padrão (triplicata); LA: ácido linoléico; ALA: ácido α -linolênico; ARA: ácido araquidônico; DHA: ácido docosahexaenoico; PI: padrão interno; EMAG: éster metílico de ácido graxo; médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si de acordo com ANOVA e teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

Tabela 3. Valores de ácidos graxos de acordo com os diferentes métodos de extração de lipídios, metilação dos ácidos graxos por Hartman e Lago modificado, e diferentes padrões internos utilizados na quantificação de ácidos linoléico, α -linolênico, araquidônico e docosahexaenóico na amostra de referência da NIST 1849

	Bligh e Dyer (1959)		Roese Gottlieb (1972)		Hidrólise ácida AOAC 963.15 (2005)		Hidrólise ácida AOAC 996.06 (2005)	
	Média \pm Dp	CV (%)	Média \pm Dp	CV (%)	Média \pm Dp	CV (%)	Média \pm Dp	CV (%)
Referência								
				5,87				
Ácido linoleico (g/100g)	5,39 \pm 0,13 ^a	2,33	5,84 \pm 0,02 ^b	0,42	6,37 \pm 0,14 ^c	2,26	6,02 \pm 0,15 ^b	2,26
	4,70 \pm 0,05 ^a	1,12	4,88 \pm 0,09 ^a	1,85	6,00 \pm 0,06 ^b	1,05	6,73 \pm 0,15 ^c	1,05
	4,94 \pm 0,07 ^a	1,42	5,09 \pm 0,04 ^a	0,71	6,18 \pm 0,06 ^b	0,92	7,01 \pm 0,11 ^c	0,92
Referência								
				0,601				
Ácido α -linolênico (g/100g)	0,53 \pm 0,02 ^a	3,12	0,61 \pm 0,01 ^b	1,72	0,67 \pm 0,01 ^c	1,57	0,60 \pm 0,01 ^b	1,57
	0,48 \pm 0,01 ^a	1,06	0,50 \pm 0,01 ^a	1,71	0,60 \pm 0,01 ^b	1,14	0,65 \pm 0,01 ^c	1,14
	0,50 \pm 0,01 ^a	0,94	0,51 \pm 0,01 ^a	1,88	0,61 \pm 0,01 ^b	1,57	0,68 \pm 0,01 ^c	1,57
Referência								
				0,21				
Ácido araquidônico (g/100g)	0,135 \pm 0,006 ^a	4,53	0,193 \pm 0,007 ^b	3,93	0,177 \pm 0,006 ^{b,c}	3,21	0,166 \pm 0,005 ^c	3,21
	0,150 \pm 0,002 ^a	1,39	0,158 \pm 0,003 ^a	1,65	0,195 \pm 0,008 ^b	3,89	0,173 \pm 0,003 ^c	3,89
	0,165 \pm 0,005 ^j	2,74	0,177 \pm 0,004 ^{j,k}	1,96	0,216 \pm 0,009	4,19	0,189 \pm 0,003 ^k	4,19
Referência								
				0,07				
Ácido docosahexaenóico (g/100g)	0,034 \pm 0,002 ^a	5,02	0,049 \pm 0,001 ^a	1,39	0,056 \pm 0,001 ^b	2,45	0,034 \pm 0,001 ^a	2,45
	0,046 \pm 0,004 ^a	7,7	0,051 \pm 0,001 ^a	1,12	0,064 \pm 0,001 ^b	2,51	0,045 \pm 0,002 ^a	2,51
	0,057 \pm 0,004 ^a	7,59	0,058 \pm 0,002 ^a	1,2	0,070 \pm 0,002 ^b	2,99	0,053 \pm 0,003 ^a	2,99

Análise realizada em triplicata; Dp: desvio padrão; CV: coeficiente de variação; médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, na mesma linha, de acordo com ANOVA e teste de Tukey ($\alpha=0,05$).

de degradação e/ou isomerização desses ácidos graxos, diminuindo sua quantificação.

A escolha do padrão interno é de grande importância para a quantificação dos ácidos graxos. O padrão interno deve eluir numa região próxima dos ácidos graxos de interesse, ser estável e não co-eluir com outros ácidos graxos²⁶. No presente trabalho verificou-se que o padrão interno do éster metílico de ácido graxo 13:0 eluiu muito antes dos ácidos graxos polinsaturados e também superestimou os valores de ácido linoleico e ácido α -linolênico; o padrão interno do éster metílico de ácido graxo 21:0, nas condições cromatográficas descritas, pode co-eluir com o ácido linoleico conjugado (CLA), normalmente presente em gorduras lácteas. Portanto, o padrão interno do éster metílico de ácido graxo 23:0 revelou ser o mais apropriado para a quantificação de ácidos graxos polinsaturados, pois possui os requisitos citados, ou seja, elui numa região próxima dos ácidos graxos de interesse, não co-elui com outros ácidos graxos, é estável, além de apresentar resultados adequados quanto à precisão e exatidão para quantificação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa em alimentos^{26,27}.

Os fatores de correção teóricos do detector de ionização em chama foram estudados em relação ao 16:0, 18:0 e 23:0, e os resultados encontram-se na Tabela 4. Para o estudo da influência desses fatores na quantificação dos ácidos graxos, normalizaram-se o método de extração de gordura utilizando Roesse Gottlieb, metilação por Hartman e Lago modificado e cálculo com padrão interno do éster metílico de ácido graxo 23:0.

Houve apenas diferença estatisticamente significativa no uso de diferentes fatores de correção teóricos para o detector de ionização em chama para a quantificação de ácido linoleico e ácido α -linolênico. Os

valores em relação ao 16:0 e 18:0 foram menores que o da referência, sendo o fator de correção teórico do detector de ionização em chama em relação 23:0 o mais próximo dos valores da referência. Shreiner (2005)²⁶ demonstrou que a utilização de fatores de correção teóricos do detector de ionização em chama são mais apropriados para quantificação de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, e que podem ocorrer erros de quantificação do ácido docosahexaenoico de até 22,6% em relação à escolha de fatores experimentais.

CONCLUSÃO

O método de extração de lipídios revelou influenciar de maneira significativa na quantificação final dos lipídios totais e ácidos graxos polinsaturados nas fórmulas infantis. As menores dispersões nos resultados dos ácidos graxos polinsaturados foram obtidas pela extração de gordura pelo método oficial, ou seja, Roesse Gottlieb, entretanto, houve menor recuperação da gordura por este método. Com relação às metodologias de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos a de Hartman e Lago e a *in situ* apresentaram desempenho satisfatório. Quanto à quantificação dos ácidos graxos polinsaturados em fórmula infantil recomenda-se o uso de padrão interno de éster metílico de ácido graxo 23:0 e fatores de resposta teóricos do detector de ionização em chama em relação a esse padrão interno. Futuros trabalhos devem ser realizados para estabelecer métodos adequados de extração dos lipídios e esterificação direta (*in situ*) para quantificação dos ácidos graxos polinsaturados em fórmulas infantis, tendo em vista as tecnologias de suplementação das fórmulas infantis e objetivando a melhoria de desempenho e diminuição do tempo de análise.

Tabela 4. Comparação dos teores dos ácidos graxos calculados com diferentes fatores teóricos de correção de resposta do DIC para amostra NIST 1849

	Referência	16:0	18:0	23:0
LA (g/100)	5,87	5,6 ± 0,1 ^a	5,7 ± 0,1 ^a	5,9 ± 0,1 ^b
ALA (g/100)	0,601	0,56 ± 0,01 ^a	0,57 ± 0,01 ^{a,b}	0,59 ± 0,01 ^b
ARA (g/100)	0,21	0,21 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,01 ^a
DHA (g/100)	0,07	0,068 ± 0,007 ^a	0,070 ± 0,007 ^a	0,072 ± 0,007 ^a

Média ± desvio padrão (triplicata); LA: ácido linoléico; ALA: ácido α -linolênico; ARA: ácido araquidônico; DHA: ácido docosahexaenoico; médias seguidas pela mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si de acordo com ANOVA e teste de Tukey ($\alpha=0,05$). Lipídios totais por hidrólise ácida AOAC 963.15, extração de lipídios por Roesse Gottlieb, metilação por Hartman e Lago e quantificação por padrão interno de éster metílico de ácido graxo 23:0.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e ao Instituto Adolfo Lutz pela colaboração e parceria.

REFERÊNCIAS

1. Koo WWS, M BBS, FACN. Efficacy and safety of docosahexaenoic acid and arachidonic acid addition to infant formulas: can one buy better vision and intelligence?. *J Am Coll Nutr* 2003; 22 (2): 101-7.
2. Carver JD. Advances in nutritional modifications of infant formulas. *Am J Clin Nutr* 2003; 77: 1550S-4S.
3. Curtis JM, Berrigan N, Dauphinee P. The determination of n-3 fatty acid levels in food products containing microencapsulated fish oil using the one-step extraction method. Part 1: measurement in the raw ingredient and dry powdered foods. *J Am Oli Chem Soc* 2008; 85: 297-305.
4. Hirayama KB, Speridião PGL, Fagundes-Neto U. Ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa. *The electronic J Ped Gastroent Nutr and Liver Disease* 2006, v. 10, n. 3, p. 1-10.
5. Schaafma G. The Western diet with a special focus on dairy products. *Institut Danome*, 1997; 4:29-43.
6. Auestad N, Scott DT, Janowsky JS, Jacobsen C, Carroll, RE, Montalto MB et al. Visual, cognitive and language assessments at 39 months: a follow-up study of children fed formulas containing long-chain polyunsaturated fatty acids to 1 year of age. *Pediatrics* 2003; 112(3): 177-83.
7. McCann JC, Ames BN. Is docosahexaenoic acid, a n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid, required for development of normal brain function? An overview of evidence from cognitive and behavioral tests in humans and animals. *Am J Clin Nutr* 2005; 82:281-95.
8. Straarup EM, Lauritzen L, Faerk J, Hoy CE, Michaelsen KF. The stereospecific triacylglycerol structures and fatty acid profiles of human milk and infant formulas. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 293-9.
9. Koletzko B, Baker S, Cleghorn G, Fagundes-Neto U, Gopalan S, Hernell O et al. Global standard for the composition of infant formula: Recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41(5): 584-99.
10. Brasil. Portaria nº 977, de 5 de dezembro de 1998 da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde. Regulamento técnico referente às fórmulas infantis para lactentes e às fórmulas infantis de seguimento. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 29 dez. 1998. Seção 1, p 20-1.
11. Codex Alimentarius Commission. JOINT FAO/WHO. Food standards programme. Codex standard for infant formula – Codex Stan 72 1981, revisado em 2007.
12. Carpenter DM, Ngeh-Ngwainbi J, Lee S. Lipid Analysis. In: Carpenter DE, Sullivan DM, editores. *Methods of analysis for nutritional labeling*. Arlington: AOAC International; 1993. p. 85-104.
13. Iverson SJ, Lang SLC, Cooper MH. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids* 2001; 36:1283-7.
14. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid. Extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 1959; 37:911-7.
15. Métodos Analíticos Físicos-Químicos do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4.ed., Brasília: ANVISA, 2005.
16. Official Methods of Analysis of AOAC. 18. ed., Gaithersburg: AOAC International, 2005.
17. Hartman L, Lago RCA. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Lab Prac* 1973; 22: 475-6.
18. Maia EL, Rodrigues-Amaya DBR. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. *Rev Inst Adolfo Lutz* 1993; 53(1/2): 27-35.
19. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). *Standard Methods for Analyses of Oils, Fats and Derivatives*. Report of IUPAC Working Group WG 2/87, Method 2.301. 7.ed. Blackwell Scientific Publications, 1987.
20. Golay PA, Dionisi F, Hug B, Giuffrida F, Destaillets, F. Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on *trans* fatty acid content. *Food Chemistry* 2006, 101: 1115-21.
21. Aued-Pimentel S. Avaliação de procedimentos analíticos para a determinação de lipídios e ácidos graxos em produtos alimentícios [Tese de doutorado]. São Paulo: Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, 2007. 230 pp.
22. Ackman RG, Sipos JC. Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detector. *J AOCS* 1964; 41: 377-8.
23. Bannon CD, Graskie JD, Hillker AE. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability: Validation of theoretical relative response factors of unsaturated esters in the flame ionization detector. *J AOCS* 1986; 63: 105-10.
24. Christie WW. Preparation of esters derivatives of fatty acids for chromatographic analysis. In: *Advances in lipid methodology – two*. 1993; p.69-111. [Acesso em: 05 out.2004]. Disponível em: <http://www.lipid.co.uk/infores/topics/methests/index.htm>.
25. Aued-Pimentel S, Caruso MSE, Kumagai EE, Ruvieri V, Zenebon O. Ácidos graxos saturados em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia gasosa. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2005; 64(2):167-72.
26. Schreiner M. Quantification of long chain polyunsaturated fatty acids by gas chromatography. Evaluation of factors affecting accuracy. *J Chrom A* 2005; 1095: 126-30.
27. Mazalli MR, Bragagnolo N. Validation of two methods for fatty acids analysis in eggs. *Lipids* 2007; 42: 483-90.