

## CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA DE ÁCIDOS GRAXOS DE MANTEIGA DE CACAU DO BRASIL \*

Maria Elisa Wohlers de ALMEIDA \*\*  
Clara NAKANO \*\*  
Elza Gastaldo BADOLATO \*\*

RIAL-A/422

ALMEIDA, M.E.W.; NAKANO, C. & BADOLATO, E.G. — Cromatografia em fase gasosa de ácidos graxos de manteiga de cacau do Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36: 81-89, 1975/76.

**RESUMO:** Para a verificação do padrão de qualidade da manteiga de cacau produzida no Brasil, foram feitas as seguintes determinações: índice de acidez, índice de refração, índice de iodo, ponto de fusão, substâncias voláteis, substâncias insaponificáveis e prova de rancidez. Foi, também, determinada a composição de ácidos graxos.

Foi feita uma adaptação no processo de metilação por transesterificação em ampola com metilato de sódio.

Os ésteres metílicos foram analisados por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama. Foram identificados e dosados os ácidos láurico, mirístico, palmítico, palmitoléico, esteárico, oléico, linoléico, araquídico, linolênico e behênico. Foi ainda detectado um ácido graxo saturado com 17 átomos de carbono.

**DESCRIPTORIOS:** ácidos graxos em manteiga de cacau, determinação por cromatografia em fase gasosa; manteiga de cacau, determinação de ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa.

### I N T R O D U Ç Ã O

A manteiga de cacau constitui a fração lipídica das sementes do cacauzeiro (*Theobroma cacao*). Estas sementes, após retiradas de seus frutos, sofrem um processo de fermentação e depois são submetidas à secagem nos próprios locais de cultivo. Os processos de torrefação, moagem e extra-

ção da manteiga de cacau são executados nas fábricas de chocolate.

O desenvolvimento do odor e sabor característicos do chocolate ocorre durante as fases de fermentação e torrefação.

A manteiga de cacau é normalmente obtida por prensagem, mas pode, também,

\* Realizado na Divisão de Bromatologia e Química do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, S.P. Apresentado à 27.<sup>a</sup> Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, realizada em Belo Horizonte, M.G., de 9 a 16 de julho de 1975.

\*\* Do Instituto Adolfo Lutz.

ser extraída por meio de solventes adequados como hexano e tricloroetileno.

No processo de manufaturação do cacau em pó, parte da manteiga de cacau é removida; já na tecnologia do preparo de chocolate, estes lipídios são novamente adicionados.

A primeira parte de nosso trabalho consistiu em verificar o padrão de qualidade da manteiga de cacau empregada no preparo de chocolate em diferentes fábricas de São Paulo.

A segunda parte visou a identificação e determinação dos ácidos graxos da manteiga de cacau produzida no Brasil.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Analisamos 13 amostras de manteiga de cacau, sendo que 11 foram fornecidas por indústrias de chocolate, indústrias estas por nós consideradas idôneas; duas amostras foram por nós extraídas no laboratório a partir de semente de cacau. Todas as sementes empregadas na extração da manteiga de cacau eram provenientes do Estado da Bahia.

Para verificarmos o padrão de qualidade e o grau de pureza determinamos diferentes índices, de acordo com os processos indicados nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz<sup>4</sup>: ponto de fusão, índice de refração a 40°C, índice de acidez, índice de saponificação e índice de iodo (Hübl). Além destas constantes físico-químicas determinamos, também, substâncias voláteis e matéria insaponificável, esta última de acordo com A.O.A.C.<sup>1</sup>, como também foi verificada a rancidez das amostras por meio da reação de Kreiss.

A análise por cromatografia em fase gasosa dos ácidos graxos de óleos e gorduras exige, previamente, a transformação dos glicéridos em ésteres metílicos.

No início do trabalho, efetuamos a preparação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (4 amostras) de acordo com o pro-

cesso recomendado pela Organização Internacional do Cacau e Chocolate<sup>8</sup>. Este processo é baseado na esterificação dos ácidos graxos com metanol, após saponificação, usando como catalisador trifluoreto de boro (BF<sub>3</sub>).

Entretanto, como tivéssemos dificuldade em adquirir o reagente trifluoreto de boro, empregamos para a metilação o processo de transesterificação em ampola indicado por DE FRANCESCO & MAGLITTO<sup>5</sup>, para óleos, sendo por nós introduzidas algumas modificações necessárias para o caso de manteiga de cacau. Em ambos os processos de metilação, os resultados obtidos foram idênticos.

#### *Método de transesterificação em ampola*

Transfira cerca de 1 g da amostra para uma ampola de vidro e adicione 2 ml de metilato de sódio (sódio metálico em álcool metílico a 1,5%). Feche a ampola com o maçarico tomando cuidado para não haver vasamento. Aqueça em banho-maria fervente, por 2 horas. Abra a ampola e transfira o conteúdo para um funil de separação de 125 ml, com auxílio de uma solução saturada de cloreto de sódio, quente. Adicione 10 ml de álcool etílico, agite e espere a separação das camadas (se houver formação de emulsão, adicione mais 5 ml de álcool). Despreze a camada inferior aquosa e recolha a superior onde estão dissolvidos os ácidos graxos metilados.

Para a análise dos ésteres metílicos assim obtidos foi usado um cromatógrafo a gás da marca Varian, modelo 1400, com detector de ionização de chama.

Os componentes foram separados em uma coluna de 6 pés de comprimento e 1/8 de polegada de diâmetro interno, tendo como fase estacionária succinato de dietileno glicol (DEGS) a 10% em Cromosorb W, como suporte sólido. Foram observadas as seguintes condições de operação: temperatura do injetor, 220°C; temperatura do detector, 220°C; temperatura da coluna, programada de 150 a 200°C,  $\beta = 4^\circ\text{C}/\text{min}$ ; gás de arraste, nitrogênio; fluxo, 30 ml/min; sensibilidade,  $1 \times 10^{-10}$  e  $32 \times 10^{-10}$ .

### Identificação dos componentes

Para a análise qualitativa foi injetado no cromatógrafo 1  $\mu$ l da solução dos ésteres metílicos.

A identificação dos picos no cromatograma foi efetuada por comparação dos tempos de retenção obtidos com os tempos de retenção de padrões injetados. Ainda, para confirmação, foi adicionado à amostra, padrão de ácido graxo suposto; isto foi feito no caso de ocorrência de alguma dúvida, principalmente quando o ácido graxo estava presente em pequena quantidade.

### Dosagem dos componentes

Para a análise quantitativa, como a concentração dos diferentes ácidos graxos fosse muito variada, foi necessária a obtenção de dois cromatogramas, injetando quantidades diferentes das soluções e variando, também, a atenuação da resposta do aparelho.

Para determinar a porcentagem relativa dos diferentes ácidos graxos foi empregado o processo de normalização interna <sup>7</sup>, também de acordo com as normas adotadas pela O.I.C.C. <sup>8</sup>.

Neste processo é admitido que a soma das áreas dos picos dos ésteres metílicos

dos ácidos graxos é proporcional à massa dos componentes e corresponde a 100% da mistura.

Assim, a porcentagem em massa foi determinada pela fórmula:

$$\text{éster metílico } x (\%) = \frac{a}{b} \times 100$$

a = área do pico do éster metílico x

b =  $\Sigma$  das áreas dos picos dos ésteres metílicos

Ainda a O.I.C.C. <sup>8</sup> recomenda que os resultados sejam sempre referidos com 3 algarismos significativos, na seguinte base: 3 algarismos para ácidos graxos em concentração acima de 10%; 2 algarismos para ácidos graxos em concentração entre 1 e 10% e 1 algarismo para ácidos graxos em concentração abaixo de 1%.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na primeira parte do trabalho, referente ao padrão de qualidade e índice de pureza da manteiga de cacau, estão reunidos na tabela 1 e podemos verificar que os dados obtidos caíram dentro dos limites estabelecidos pela legislação em vigor no Brasil <sup>10</sup> que coincidem com os limites constantes na Farmacopéia Brasileira <sup>6</sup>.

TABELA 1

Constantes físico-químicas e determinações em manteiga de cacau\*

	Mínimo	Máximo
Ponto de fusão em °C	28,0	32,8
Índice de refração, a 40°C	1,456	1,458
Índice de acidez	2,18	5,00
Índice de saponificação	189,45	196,50
Índice de iodo	34,54	39,74
Substâncias voláteis a 105°C %	0,03	0,22
Matéria insaponificável %	0,23	0,76

\* N.º de amostras = 13

Na composição dos ácidos graxos da manteiga de cacau, identificamos em todas as amostras os seguintes ácidos: mirístico, palmítico, palmitolêico, ácido graxo saturado com 17 átomos de carbono, esteárico, oléico, linoléico, araquídico, linolênico e behênico (fig. 1). Apenas em uma amostra

identificamos, a mais, ácido láurico. Esta amostra foi metilada pelos dois processos citados e o ácido láurico identificado nos cromatogramas obtidos (fig. 2).

Para a determinação da porcentagem dos ácidos graxos, foram utilizados dois cromatogramas para cada amostra, como

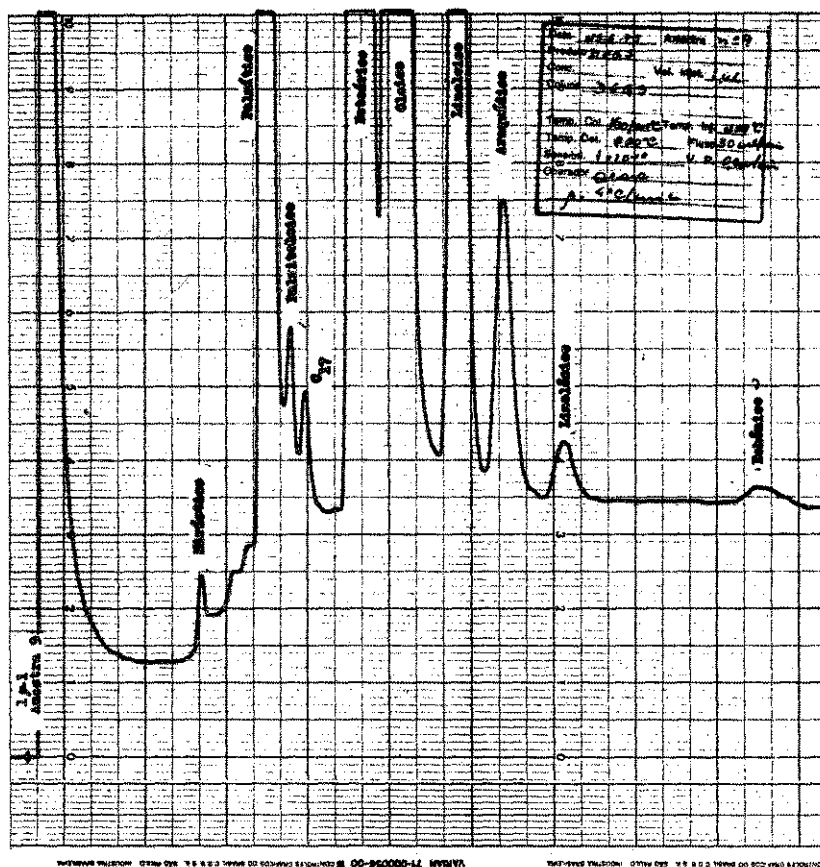
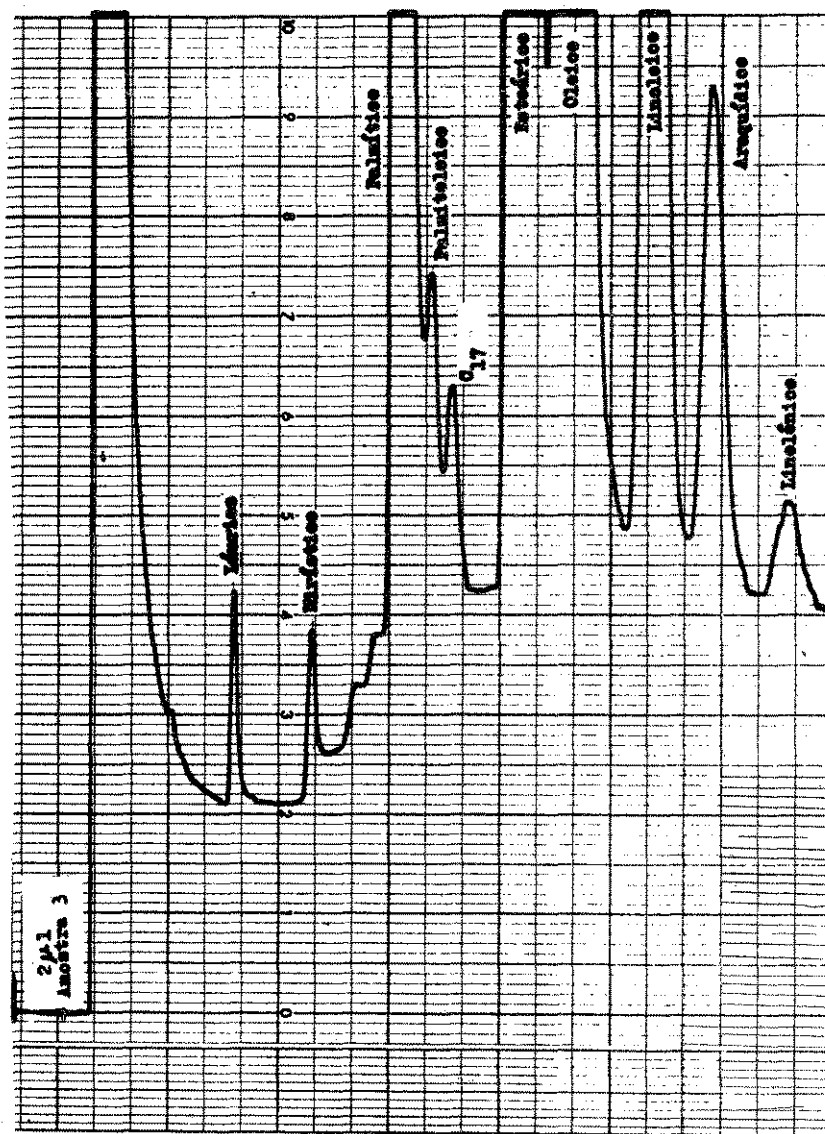


Fig 1 — Cromatograma de ácidos graxos de manteiga de cacau (sensibilidade =  $1 \times 10^{-10}$ ).  
*Chromatogram of fatty acids in cocoa butter (sensitivity =  $1 \times 10^{-10}$ ).*



VARIAN 71-00056-00

Fig. 2 — Cromatograma de ácidos graxos de manteiga de cacau apresentando ácido láurico (sensibilidade =  $1 \times 10^{-10}$ ).

*Chromatogram of fatty acids in cocoa butter with lauric acid (sensitivity =  $1 \times 10^{-10}$ ).*

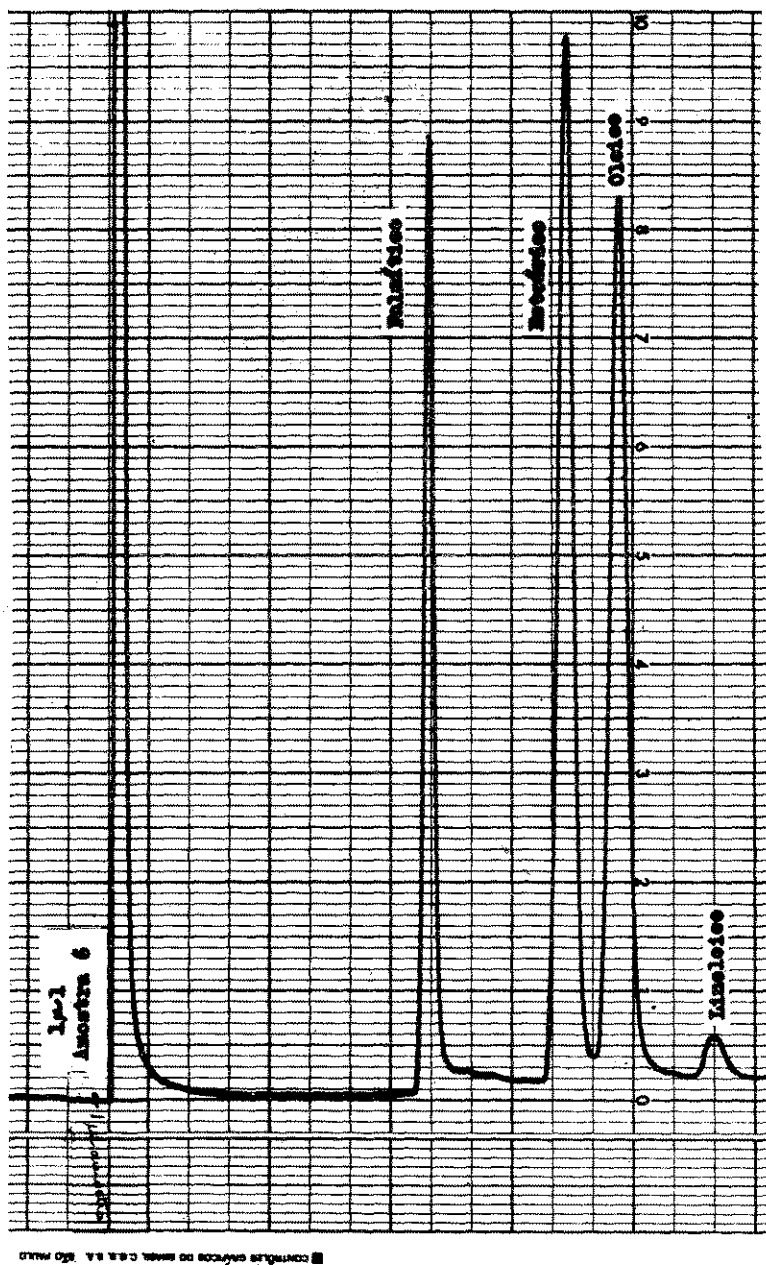


Fig. 3 — Cromatograma de ácidos graxos de manteiga de cacau (sensibilidade =  $32 \times 10^{-10}$ ).

*Chromatogram of fatty acids in cocoa butter (sensitivity =  $32 \times 10^{-10}$ ).*

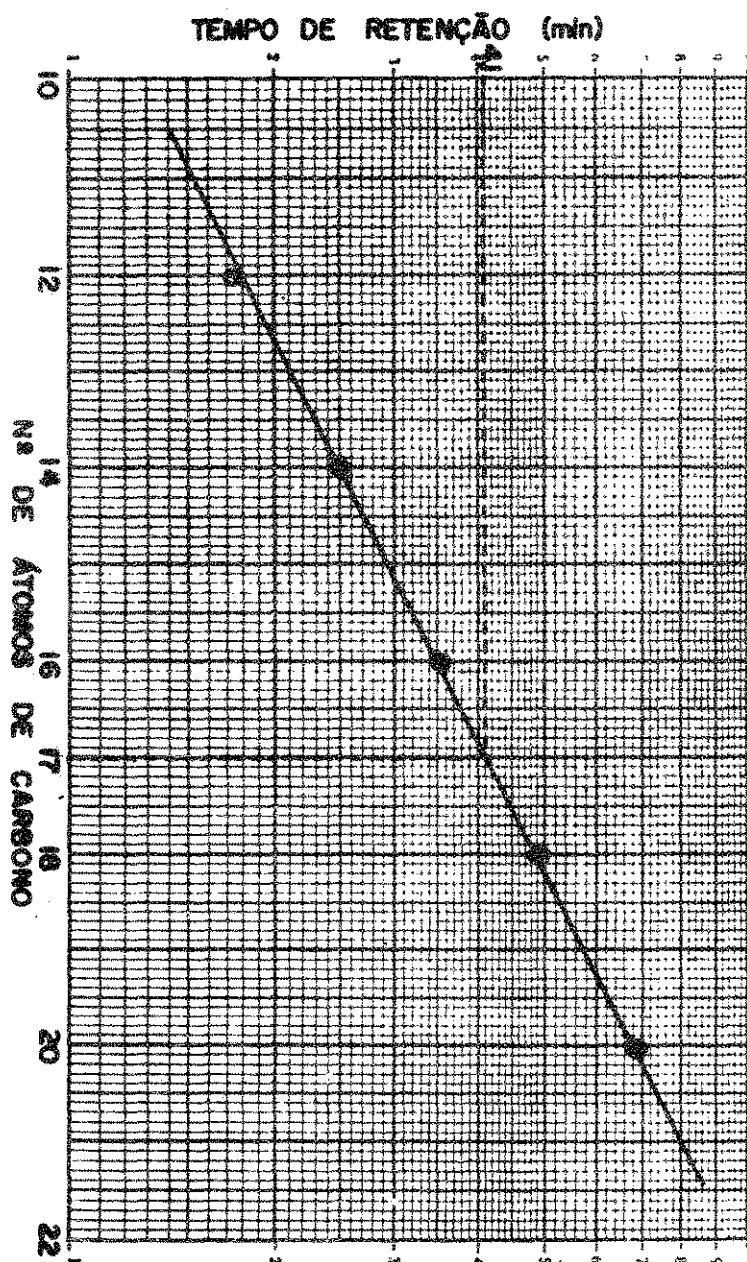


Fig. 4 — Gráfico para a identificação do ácido graxo com 17 átomos de carbono.

*Identification of the fatty acid with 17 carbon atoms.*

mostram as figuras 1 e 3. Os resultados obtidos estão reunidos na tabela 2.

TABELA 2

Composição dos ácidos graxos de manteiga de cacau \*

Ácidos graxos	Mínimo %	Máximo %
Láurico	—	0,2
Mirístico	0,05	0,1
Palmitico	23,3	27,7
Palmitoléico	0,1	0,1
C <sub>17</sub>	0,1	0,2
Estearico	32,1	36,4
Oléico	32,5	37,8
Linoléico	2,5	4,4
Araquídico	0,8	1,5
Linolênico	0,1	0,3
Behênico	0,1	0,2

\*N.º de amostras = 13

Para a identificação do pico que emerge logo após o pico correspondente ao ácido palmitoléico, como não coincidissem com nenhum dos padrões disponíveis, foi empregado o método gráfico<sup>4</sup>, baseado no princípio que o logaritmo dos tempos de retenção é função linear do número de átomos de carbono (fig. 4). Tal conclusão foi baseada, também, nos trabalhos de BELLA-VITA & DAMIANI<sup>2</sup> e VAN WIJNGAARDEN *et alii*<sup>11</sup> que citam a presença desse ácido em manteiga de cacau.

Na literatura consultada não encontramos nenhum trabalho referente à composição de ácidos graxos em manteiga de cacau, efetuado no Brasil, por cromatografia em fase gasosa.

Entretanto, se compararmos os nossos resultados com trabalhos efetuados em outros países, verificamos que os nossos dados, praticamente, caem dentro dos limites citados por BRACCO *et alii*<sup>3</sup> e VAN WIJNGAARDEN *et alii*<sup>11</sup> (tabela 3).

TABELA 3

Porcentagens dos ácidos graxos da manteiga de cacau encontradas pelos autores

Ácidos graxos	ALMEIDA <i>et alii</i> %	BRACCO <i>et alii</i> <sup>3</sup> %	VAN WIJNGAARDEN <i>et alii</i> <sup>11</sup> %
Láurico	0,2	0,1	tr
Mirístico	0,05 - 0,1	0,1 - 0,3	tr - 0,2
Palmitico	23,3 - 27,7	24,5 - 27,8	24,9 - 29,2
Palmitoleico	0,1	0,2 - 0,3	0,2 - 0,5
C <sub>17</sub>	0,1 - 0,2	—	0,4
Estearico	32,1 - 36,4	32,2 - 35,7	32,5 - 37,0
Oleico	32,5 - 37,8	32,3 - 38,7	32,6 - 35,8
Linoleico	2,5 - 4,4	2,6 - 4,9	2,6 - 3,7
Araquídico	0,8 - 1,5	0,5 - 1,2	0,9 - 1,4
Linolênico	0,1 - 0,3	0,1 - 0,2	tr - 0,3
Behênico	0,1 - 0,2	—	0,9 - 1,4
N.º de amostras	13	21	31

tr = traços

— = não mencionada pelo autor

### CONCLUSÃO

As amostras de manteiga de cacau analisadas apresentaram um padrão de qualidade de acordo com as exigências internacionais.

A modificação por nós introduzida, no método de transesterificação em ampola,

deu bons resultados comparáveis ao processo de metilação clássico que utiliza BF<sub>3</sub> como catalisador.

Salientamos, ainda, a identificação, em todas as amostras, de um ácido graxo com 17 átomos de carbono.



RIAL-A/422

ALMEIDA, M.E.W.; NAKANO, C. & BADOLATO, E.G. — Gas-liquid chromatography of fatty acids in cocoa butter from Brazil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36: 81-89, 1975/76.

**SUMMARY:** In order to establish the quality standards of the cocoa butter produced in Brazil the following determinations were made: acid value, index of refraction, iodine absorption number, melting point, moisture and volatile matters, and unsaponifiable residues.

The composition of the fatty acids was also determined. An adaptation to the process of methylation through transesterification with sodium methylate was made too. Methyl esters were analysed by gas-liquid chromatography with a flame ionization detector.

The following acids were identified and determined: lauric, myristic palmitic, palmitoleic, stearic, oleic, linoleic, arachidic, linolenic and behenic acids.

Furthermore, another saturated fatty acid with 17 carbon atoms was also detected.

**DESCRIPTORS:** fatty acids, determination in cocoa butter by gas-liquid chromatography; cocoa butter, fatty acids determination by gas-liquid chromatography.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 12nd ed. Washington, A.O.A.C. 1975. p. 500.
2. BELLAVITA, N.C. & DAMIANI, P. Indagini gas-cromatografiche su grasse di cocco rettificato impiegato per la sofisticazione del burro di cacao. *Chimica (Milano)*, 45: 10-5, 1969.
3. BRACCO, V.; ROSTAGNO, W. & EGLI, R.H. — A story of cocoa butter — Illipe butter mixtures (*Shorea stenoptera* L.). *Int. Choc. Rev.*, 25: 38-43, 1970.
4. CIOLA, R. — *Introdução à cromatografia em fase gasosa*. São Paulo, Edgard Blücher, 1973. p. 98 e 103.
5. DE FRANCESCO, F. & MAGLITTO, C. — Transesterification of glycerides by methyl alcohol. Preparation of methyl esters for vapor phase chromatography. *Riv. Ital. Sostanze Grasse*, 39, 245-8. 1962.
6. FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2.<sup>a</sup> ed. São Paulo, Siqueira, 1959. 1265 p.
7. McNAIR, H.M. & BONELLI, E.J. — *Basic gas chromatography*. 5th ed. Bekerley, Cal., Varian Aerograph [1939]. p. 139-40.
8. OFFICE INTERNATIONAL DU CACAO ET DU CHOCOLAT. Préparation des esters méthyliques des acides gras. *Rev. int. Choc*, 28: 226-7, 1973.
9. SÃO PAULO. Instituto Adolfo Lutz. *Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1, Métodos químicos e físicos para análises de alimentos*. São Paulo [1967].
10. SÃO PAULO. Leis, decretos, etc. Decreto n.º 52.504 de 28 de julho de 1970. Aprova normas técnicas especiais relativas a alimentos e bebidas. São Paulo, Serv. gráf. Secretaria da Saúde, 1970. p. 143.
11. VAN WIJNGAARDEN, D.; THYSSEN, L.A. & OSSINGA, T.D. — Fatty acid composition of cocoa butter by gas chromatography. *Z. Lebemsm. Unters. Forsch.*, 137(3): 171-9, 1968 apud *Chem. Abstr.* 69, 58476a, 1968.

Recebido para publicação em 1.º de outubro de 1975

