

Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

Faculdade de Engenharia de Alimentos – FEA

Departamento de Ciência de Alimentos – DCA

METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE ADULTERAÇÃO EM GORDURA DE LEITE.

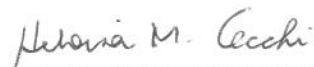
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Sidinéia Cordeiro de Freitas** aprovada pela Comissão Julgadora em 11 de setembro de 2001.

Sidinéia Cordeiro de Freitas

Engenheira Química

Campinas, 11 de setembro de 2001



Profa. Dra. Heloísa Máscia Cecchi
Presidente da Banca

Profa. Dra. Heloísa Máscia Cecchi

Orientadora

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: T/ UNICAMP
F884m
 V. 96975
 TROVADO BS/ 76.392/04
 AFROS. 76.392/04
 CC ☐ ☐ ☒ ☐
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 02/11/04
 N.º OPDO

CM00161233-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

F884m Freitas, Sidinéa Cordeiro de
 Metodologia analítica para determinação de adulteração em
 gordura de leite / Sidinéa Cordeiro de Freitas. – Campinas, SP:
 [s.n.], 2001.

Orientador: Heloísa Máscia Cecchi
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Gordura de leite. 2. Adulterações. I. Cecchi, Heloísa
 Máscia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Engenharia de Alimentos. III. Título.

BANCA EXAMINADORA

Heloisa M. Cecchi

Prof. Dra. Heloisa Máscia Cecchi (Orientador)

FEA - UNICAMP

Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli (Membro)

USP

Rosemar Antonassi

Prof. Dra. Rosemar Antoniassi (Membro)

CTAA – EMBRAPA

Deborah H. Markowicz Bastos

Profa. Dra. Deborah H. Markowicz Bastos (Membro)

Universidade São Francisco

Neura Bragagnolo

Prof. Dra. Neura Bragagnolo (Membro)

FEA – UNICAMP

Lireny Aparecida Guinaldo Gonçalves

Prof. Dra. Lireny Aparecida Guinaldo Gonçalves (Membro)

FEA – UNICAMP

Prof. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante (Membro)

FEA – UNICAMP

AGRADECIMENTOS

GRATIDÃO, é a única palavra que pode exprimir a síntese de meus sentimentos ao final desta longa e árdua jornada.

Seria impossível o desenvolvimento e a conclusão deste trabalho sem a colaboração, a compreensão, a dedicação e o esforço dos professores, funcionários e colegas da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e da Embrapa Agroindústria de Alimentos.

Um agradecimento em especial a minha orientadora, Professora Heloisa Máschia Cecchi, aos diretores e empregados da Cooperativa dos Produtos de Leite de Campinas, que de forma extremamente gentil e eficiente forneceram os produtos e itens necessários ao desenvolvimento desta tese, e ao Estatístico Jose Luis LLanos Carrillo que possibilitou a elaboração da análise estatística.

Enfim, a todos um muito obrigado

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

ÍNDICE GERAL

Índice de Figuras	xii
Índice de Tabelas	xv
Índice de Anexos	xviii
Resumo Geral	xxiii
General Summary	xxv
Introdução Geral	1
Referências Bibliográficas	3
 Capítulo 1 – Estudo da Composição da Gordura do Leite e sua	
Adulteração	7
Leite	7
Gordura de leite	8
Variação da composição da gordura	11
Métodos de análise de gordura do leite	17
Métodos cromatográficos	19
Adulteração da gordura do leite	22
Referências Bibliográficas	26
 Capítulo 2 – Análise de Triacilgliceróis por Cromatografia Gasosa	
usando Injeção com Temperatura Programada	37
1 – Resumo	37
2 – Summary	37
3 – Introdução	38
4 – Material e Métodos	41
4.1 – Material	41

4.2 – Métodos	42
4.2.1 – Testes preliminares	42
4.3 – Determinação do fator de resposta	43
5 – Resultados	43
5.1 – Problemas ocorridos nas condições cromatográficas testadas.....	43
5.2 - Melhores condições cromatográficas testadas	47
6 – Conclusão	49
7 – Referências Bibliográficas	50

Capítulo 3 – Determinação de Triacilgliceróis por Cromatografia

Gasosa a Alta Temperatura.....	55
1 – Resumo	55
2 – Summary	56
3 – Introdução	56
4 – Material e Métodos	60
4.1 – Material	60
4.2 – Métodos	61
4.2.1 – Testes preliminares	61
4.2.2 – Condições cromatográficas estabelecidas	62
4.3 – Determinação do fator de resposta	62
5 – Resultados	63
6 – Conclusão	67
7 – Referências Bibliográficas	69

Capítulo 4 – Perfil de triacilgliceróis em Óleos Vegetais.....

1 – Resumo	73
2 – Summary	73
3 – Introdução	74

4 – Material e Métodos	77
4.1 – Material	77
4.2 – Separação dos triacilgliceróis	77
4.3. – Método cromatográfico	78
4.3.1 – Equipamento	78
4.3.2 – Condições cromatográficas.....	78
4.3.3 – Análise qualitativa e quantitativa	79
4.4 – Análise estatística	79
5 – Resultados	79
6 – Conclusão	89
7 – Referências Bibliográficas	90

**Capítulo 5 – Determinação de Triacilgliceróis na Gordura do Leite por
Cromatografia Gasosa a Alta Temperatura..... 95**

1 – Resumo	95
2 – Summary	96
3 – Introdução	96
4 – Material e Métodos	100
4.1 – Amostragem	100
4.2 – Preparação da amostra	101
4.2.1 – Extração da gordura.....	101
4.2.2 – Separação dos triacilgliceróis	101
4.2.3 – Condições cromatográficas.....	102
4.2.4 – Análise qualitativa e quantitativa	103
4.2.5 – Análise estatística	103
5 – Resultados	104
6 – Conclusão	125

7 – Referências Bibliográficas	126
--------------------------------------	-----

Capítulo 6 – Metodologia Analítica para Determinação de Adulteração

em Gordura de Leite	131
1 – Resumo	131
2 – Summary	131
3 – Introdução	132
4 – Material e Métodos	135
4.1 – Material	135
4.2 – Preparação da amostra	136
4.2.1 – Extração da gordura.....	136
4.2.2 – Separação dos triacilgliceróis.....	137
4.3 – Método	137
4.3.1 – Equipamento	137
4.3.2 – Reagentes.....	138
4.3.3 – Condições cromatográficas.....	138
4.4 – Análise qualitativa e quantitativa	139
4.5 – Análise estatística	139
5 – Resultados	140
5.1 – Análise fatorial.....	140
5.2 – Análise discriminante	161
5.3 – Regra de decisão	163
5.4 – Automatização da análise estatística.....	165
6 – Conclusão	172
7 – Referências Bibliográficas	173

Capítulo 7 – Aplicação do Método Estatístico Fatorial na Avaliação da

Pureza da Gordura em Leite e Produtos Lácteos.....	179
1 – Resumo	179
2 – Summary	180
3 – Introdução	180
4 – Material e Métodos	185
4.1 – Material	185
4.2 – Preparação da amostra	185
4.2.1 – Extração da gordura.....	185
4.2.2 – Separação dos triacilgliceróis.....	185
4.3 – Método	186
4.3.1 – Equipamento	186
4.3.2 – Reagentes.....	186
4.3.3 – Condições cromatográficas.....	187
4.4 – Análise qualitativa e quantitativa	187
4.5 – Análise estatística	188
5 – Resultados	188
6 – Conclusão	197
7 – Referências Bibliográficas	198
Conclusões Gerais	203
Anexos	209

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1 – Condições cromatográficas em que os picos apresentaram baixa resposta do detector	45
2.2 - Condições cromatográficas em que ocorreram subida da linha de base no início e fim da corrida	45
2.3 - Condições cromatográficas em que ocorreram discriminação dos picos, principalmente do C54	47
3.1 – Cromatograma de padrões de triacilgliceróis saturados	67
4.1 – Perfil de triacilgliceróis de óleo de soja comercial	85
4.2 – Perfil de triacilgliceróis de óleo de girassol comercial	87
4.3– Perfil de triacilgliceróis de óleo de milho comercial	87
5.1 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite de vaca da raça Mestiça, Produtor A	105
5.2 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite de vaca da raça Holandesa, Produtor B	105
5.3 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite de vaca da raça Girolanda, Produtor C	107
5.4 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite de vaca Jersey, Produtor D	107
5.5 – Variação da concentração do triacilglicerol C26 da gordura do leite da raça Mestiça, durante a coleta	115
5.6 - Variação da concentração do triacilglicerol C40 da gordura do leite da raça Mestiça, durante a coleta	115

5.7 - Variação da concentração do triacilglicerol C54 da gordura do leite da raça Mestiça, durante a coleta	115
5.8 – Variação dos triacilgliceróis durante o verão de acordo com a raça do animal	119
5.9 - Variação dos triacilgliceróis durante o outono de acordo com a raça do animal	121
5.10 - Variação dos triacilgliceróis durante o inverno de acordo com a raça do animal	121
6.1 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite de vaca da raça Mestiça, Produtor A	143
6.2 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite de vaca da raça Holandesa, Produtor B	143
6.3 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite de vaca da raça Girolanda, Produtor C	145
6.4 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite de vaca Jersey, Produtor D	145
6.5 – Concentração média de triacilgliceróis durante a coleta de acordo com a raça	147
6.6 - Gráfico da rotação dos 3 fatores, mostrando onde estão localizados os triacilgliceróis no espaço tridimensional	153
6.7 – Fator 1 e fator 2 vistos no plano, mostrando os dados do leite puro e adulterado	153
6.8 - Fator 1 e fator 3 vistos no plano, mostrando os dados do leite puro e adulterado	155

6.9 - Fator 2 e fator 3 vistos no plano, mostrando os dados do leite puro e adulterado	155
6.10 – Gráfico dos escores do leite puro e adulterado em cada um dos fatores	157
6.11 – Fator 1 mostrando os escores do leite puro e adulterado com óleos de soja, girassol e milho, e o leite puro	157
6.12 - Fator 2 mostrando os escores do leite puro e adulterado com óleos de soja, girassol e milho, e o leite puro	159
6.13 - Fator 3 mostrando os escores do leite puro e adulterado com óleos de soja, girassol e milho, e o leite puro	159
6.14 – Gráfico da função discriminante linear canônica para leite puro e adulterado	163
6.15 – Programa desenvolvido. Exemplo de como são inseridos os dados de uma amostra desconhecida	167

ÍNDICE DE TABELAS

1.1 – Composição de triacilgliceróis individuais de gordura de leite	9
1.2 – Composição em ácidos graxos da gordura do leite	11
2.1 – Comparação dos fatores de resposta encontrados com os da literatura	49
3.1 – Fator de resposta relativo de triacilgliceróis	65
4.1 – Distribuição dos triacilgliceróis nos óleos vegetais (%)	74
4.2 – Composição percentual de triacilgliceróis de óleo de soja comercial	81
4.3 – Composição percentual de triacilgliceróis do óleo de girassol comercial	82
4.4 – Composição percentual de triacilgliceróis do óleo de milho comercial	83
4.5 – Triacilgliceróis que diferem entre cada par de óleos de acordo com o Teste de Tukey	89
5.1 – Composição de triacilgliceróis (% relativa) da raça Mestiça, Produtor A, de acordo com a época do ano, analisados por cromatografia gasosa, usando injeção com programação de temperatura e coluna capilar de sílica fundida	110
5.2 – Composição de triacilgliceróis (% relativa) da raça Holandesa, Produtor B, de acordo com a época do ano, analisados por cromatografia gasosa, usando injeção com programação de temperatura e coluna capilar de sílica fundida	111

5.3 - Composição de triacilgliceróis (% relativa) da raça Girolanda, Produtor C, de acordo com a época do ano, analisados por cromatografia gasosa, usando injeção com programação de temperatura e coluna capilar de sílica fundida	112
5.4 – Composição de triacilgliceróis (% relativa) da raça Jersey, Produtor D, de acordo com a época do ano, analisados por cromatografia gasosa, usando injeção com programação de temperatura e coluna capilar de sílica fundida	113
5.5 – Resultado do Teste de Tukey para as diferenças entre as raças. Os triacilgliceróis descritos em cada quadro apresentam diferenças significativas entre as respectivas raças($p<0,05$)	124
5.6 – Resultado do Teste de Tukey para a variável estação do ano. Os triacilgliceróis descritos em cada quadro apresentam diferenças significativas entre as estações do ano ($p<0,05$)	125
6.1 – Composição de triacilgliceróis da gordura do leite em % determinados por cromatografia gasosa	142
6.2 – Análise de componentes principais e variação aplicada aos três fatores	150
6.3 – Matriz de componentes rotacionados, mostrando a composição dos três fatores e seus respectivos pesos	151
6.4 – Comparação dos dados da gordura do leite adulterada empregando o programa desenvolvido e as fórmulas de Timms (1980) e Precht (1992)	170
7.1 – Composição de Triacilgliceróis (%) de Leite Integral tipo Longa Vida Comercial	189

7.2 – Composição de Triacilgliceróis (%) de Leite tipo C Comercial	190
7.3 – Composição de Triacilgliceróis (%) de Leite tipo B Comercial	191
7.4 – Composição de Triacilgliceróis (%) da manteiga	192
7.5 – Composição e Triacilgliceróis (%) de Queijo Prato Comercial	193
7.6 – Composição de Triacilgliceróis (%) de Requeijão Cremoso Comercial	194
7.7 – Aplicação das fórmulas de detecção de adulteração em produtos comerciais	196

ÍNDICE DE ANEXOS

1 – Formulário de controle das variáveis sobre os animais	209
2 – Variação da concentração do triacilglicerol C26 da gordura de leite da raça Holandesa, durante a coleta	211
3 - Variação da concentração do triacilglicerol C40 da gordura de leite da raça Holandesa, durante a coleta	211
4 - Variação da concentração do triacilglicerol C54 da gordura de leite da raça Holandesa, durante a coleta	211
5 - Variação da concentração do triacilglicerol C26 da gordura de leite da raça Girolanda, durante a coleta	213
6 - Variação da concentração do triacilglicerol C40 da gordura de leite da raça Girolanda, durante a coleta	213
7 - Variação da concentração do triacilglicerol C54 da gordura de leite da raça Girolanda, durante a coleta	213
8 - Variação da concentração do triacilglicerol C26 da gordura de leite da raça Jersey, durante a coleta.	215
9 - Variação da concentração do triacilglicerol C40 da gordura de leite da raça Jersey, durante a coleta	215
10 - Variação da concentração do triacilglicerol C54 da gordura de leite da raça Jersey, durante a coleta	215
11 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C26	217

12 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C28	218
13 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C30	219
14 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C32	220
15 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C34	221
16 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C36	222
17 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C38	223
18 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C40	224
19 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C42	225
20 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C44	226
21 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C46	227
22 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C48	228
23 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C50	229

24 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C52	230
25 – Resultado do Teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C54	231
26 – Composição de triacilgliceróis da gordura de leite adulterada com óleo de soja	232
27 - Composição de triacilgliceróis da gordura de leite adulterada com óleo de girassol	233
28 - Composição de triacilgliceróis da gordura de leite adulterada com óleo de milho	234
29 – Gráfico mostrando a importância dos fatores gerados	235
30 – Composição completa dos três fatores	235
31 - Teste t, mostrando as diferenças significativas entre os 3 fatores	237
32 – Análise das variáveis	237
33 – Classificação dos resultados	238
34 – Predição dos resultados nos três percentuais de adulteração	238
35 – Perfil de triacilgliceróis de gordura do leite integral tipo longa vida em embalagem “tetrapak”, marca P	239
36 – Perfil de triacilgliceróis de gordura do leite tipo B comercial, marca L	239
37 – Perfil de triacilgliceróis de gordura do leite tipo C comercial, marca L	241

38 – Perfil de triacilgliceróis de manteiga comercial, marca P	241
39 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de queijo prato comercial, marca L	243
40 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de requeijão cremoso comercial, marca L	243

Resumo Geral

A pesquisa de adulteração da gordura do leite através da determinação dos triacilgliceróis por cromatografia gasosa iniciou-se pelo estudo do efeito da técnica de injeção, peso molecular da substância, programação de temperatura do injetor e coluna e determinação do fator de correção do peso, ou fator de resposta do detector em um modelo de amostra constituída de quantidades semelhantes de triacilgliceróis saturados (C30 a C54). Foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa a alta temperatura com coluna capilar de sílica fundida recoberta com fase estacionária apolar de 5% fenilmetilsilicone. A condição que apresentou melhor separação e recuperação de padrões foi o injetor com programação em "splitless" por 2 minutos, temperatura de 100 a 380°C, com isoterma de 15 segundos na temperatura inicial, em gradiente de 200°C/min, coluna de 210 a 250°C, a 20°C/min e de 250 a 360°C a 4°C/min, e detector a 400°C.

A técnica descrita acima foi utilizada para caracterizar o perfil de triacilgliceróis da gordura de leite brasileira, uma vez que a composição de triacilgliceróis da gordura do leite de vaca é influenciada principalmente por fatores associados aos animais (genéticos e estágio de lactação), variações na alimentação e efeitos sazonais e regionais.

Amostras de leite genuíno das raças Jersey, Holandesa, Girolanda e Mestiça foram coletadas de dezembro a setembro (verão, outono e inverno). Outras variáveis foram monitoradas, como componentes da dieta oferecida ao animal (15 dietas) e localização do animal no período, se no pasto ou estábulo. A análise estatística dos dados genuínos foi comparada a dados obtidos pela do leite adulterado com óleos vegetais de soja, milho e girassol (5, 10 e 20%). O perfil de triacilgliceróis de óleos vegetais foi determinado, pois são as prováveis fontes de adulteração.

Um programa de computador baseado em análise estatística fatorial permitiu determinar a adulteração de gordura de leite com gordura estranha, em

uma faixa maior ou igual a 10%. A aplicação deste programa em amostras adulteradas em laboratório e em produtos lácteos comerciais mostrou sua validade na determinação da adulteração da gordura do leite, mesmo considerando a grande variação na composição da gordura. Este estudo também demonstrou que a análise estatística por regressão linear utilizada por Timms (1980) em leites australianos e Precht (1991) em leites de origem germânica não se aplica às gorduras de leite produzidas no Brasil.

GENERAL SUMMARY

Research on the adulteration of milk fat by determining the triacylglycerols by gas chromatography started with the study of the effect of the injection technique, molecular weight of the substance, temperature programming of the injector and column, and determination of the correction factor of the weight or detector response factor, using a sample model consisting of similar quantities of saturated triacylglycerols (C30 to C54). A high temperature gas chromatography technique was used, using a capillary fused silica column covered with a stationary apolar phase of 5% high temperature phenylmethylsilicone. The condition which gave the best separation and recuperation of the standards was "splitless" injection for 2 minutes at 100°C, with an isotherm of 15 seconds, up to 380°C, with a gradient of 200°C, and column from 210-250°C at 20°C/minute and from 250-360°C at 4°C/minute, and the detector at 400°C.

The triacylglycerol composition of cow's milk fat is mostly influenced by factors associated with the animal (genetic and stage of lactation), feed variations and seasonal and regional effects.

Genuine milk samples from the breeds Jersey, Dutch, "Girolanda" and Half Breed were collected from December to September (summer, autumn and winter). Other sources were monitored, such as: components of the diet offered to the animal and localizations of the animal during the period, in the pasture or in the stable. The statistical analysis of the genuine data was compared with the data obtained from milk adulterated with soybean, corn and sunflower vegetable oils. The triacylglycerol profile of the vegetable oils was determined, since these were the possible sources of adulteration.

A computer programme based on a factorial statistical analysis allowed for the determination of milk fat adulteration with strange fat, in a range equal or greater to 10%. The application of this programme in laboratory adulterated samples and in commercial milk based products, demonstrated its validity in the

determination of milk fat adulteration, in spite of the great variation in composition of milk fat. This study also showed that, statistical analysis by multiple linear regression used by Timms (1980) in Australian milks and by Precht (1991) in milks of German origin cannot be applied to Brazilian milk.

Introdução Geral

O leite é uma emulsão de gordura em água, constituída por 85,5 a 88,7% de água e 2,4 a 5,5% de gordura, estabilizada por uma dispersão coloidal de proteína de cerca de 3,25% em solução de sais de cerca de 0,18%, na forma de citrato, formiato, acetato, lactato e oxalato. Possui também vitaminas A, E, C, B₁, B₂, B₁₂, ácido fólico, ácido pantotênico e ácido nicotínico; carboidratos, sendo o mais abundante a lactose (4,6%); anticorpos e hormônios, e outros como leucócitos, CO₂, O₂, N₂ e minerais (0,65%), principalmente cálcio, potássio, sódio, zinco, ferro, fósforo, magnésio e cobre (Goff, 2000).

Segundo Banks (1991), o leite contém de 3,5 a 5,5% de gordura, constituída por cerca de 98% de triacilgliceróis e os 2% residuais são compostos por ácidos graxos livres, monoacilgliceróis e diacilgliceróis (resultantes da síntese incompleta ou quebra dos triacilgliceróis), esteróis (principalmente colesterol) e fosfolipídios. A composição da gordura pode ser afetada por fatores genéticos, zootécnicos, climáticos e alimentares.

A composição da gordura de leite pode ser determinada por métodos físico-químicos, cromatográficos, espectrofotométricos, calorimétricos e técnicas combinadas, como cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massa, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa e espectrometria de massa. Os métodos por cromatografia gasosa e líquida são utilizados na determinação de ácidos graxos, triacilgliceróis e esteróis (Lipp, 1995). Em cromatografia gasosa, o desenvolvimento de colunas capilares de sílica fundida e o progresso na tecnologia de imobilização da fase estacionária líquida ampliaram a possibilidade de análise de triacilgliceróis e outras substâncias naturais de baixa volatilidade. A introdução da técnica de injeção com programação de temperatura possibilitou a injeção em temperaturas relativamente baixas indicada para compostos sensíveis e de alto ponto de

ebulição, onde os efeitos da injeção a quente não podem ser eliminados, apesar da otimização (Hinshaw Jr, 1987).

A adulteração de gorduras e óleos tem sido um problema desde que o comércio destas mercadorias começou, até os dias de hoje. Os primeiros testes para se determinar a adulteração de gordura de leite foram realizados através de testes químicos, como os índices de Reichert-Meissl e Polenske (Laruelle, et al., 1976). Os métodos comumente usados para determinar a autenticidade da gordura do leite são a identificação da presença de fitosteróis, as relações entre os ácidos graxos e triacilgliceróis e a análise de regressão linear obtida através do perfil dos triacilgliceróis (Fox, et al., 1988; Juarez, 1980; Precht, 1992).

Os adulterantes mais citados na literatura são: óleo de soja puro, óleo de soja parcialmente hidrogenado, gorduras de substituição, óleo de girassol, óleo de coco, óleo de oliva, óleo de algodão, óleo de palma, óleo obtido da parte comestível do gérmen de trigo, óleo de gérmen de trigo, óleos vegetais hidrogenados, leite de soja e gordura animal como toucinho e sebo (Hendrickx e Huyhebaert, 1971; Parodi, 1972; Sato, et al, 1990; Precht, 1991).

Precht (1992) desenvolveu um método para determinação de adulteração em gorduras de leite produzidas na Alemanha, baseado no estudo proposto por Timms (1980), que utiliza regressão linear múltipla para a detecção da adulteração de acordo com o tipo de adulterante. A fórmula proposta por Precht tem sido estudada em outros países a fim de se definir a sua aplicabilidade.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método simples por cromatografia gasosa para determinação do perfil de triacilgliceróis da gordura do leite da região de Campinas e, através de um estudo estatístico, estabelecer regras para a definição da autenticidade da gordura do leite e produtos lácteos.

Referências Bibliográficas

- 1 - BANKS, W. Milk Fat. **Journal of the Society of Dairy Technology**. v. 442, p. 31-32. 1991.
- 2 - FOX, J.R.; DUTHIE, A.H.; WULFF, S. Precision and sensitive of a test for vegetable fat adulteration of milk fat. **Journal of Dairy Science**. v. 71, p. 574-578. 1988.
- 3 - GOFF, H. D. Dairy science and technology. Education series. University of Guelph. Disponível em: <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/home.html>. Acesso em: 22/04/00.
- 4 - HENDRICKX, H. & HUYGHEBAERT, A. quelques aspects de la détection des graisses étrangères dans la matière grasse butyrique. **Le Lait**. v. 51, n. 11/12, p. 611-622. 1971.
- 5 - HINSHAW JR, J. V. Modern inlets for capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography Science**. v. 25, n. 2, p. 49-55. 1987.
- 6 - JUÁREZ, M. & MARTINEZ-CASTRO, I. Criterios analíticos para la detección de grasas extrañas en la grasa de leche. **Alimentaria**. v. 109, p. 61-64, 81-86. 1980.
- 7 - LARUELLE, L.; VAN DIJCK, M; DAENENS, P. Fatty-acid composition of Teichert-Meissl and Polenske fractions in butterfat. **Journal of Dairy Research**. v. 43, p. 137-140. 1976.
- 8 - LIPP, M. Review of methods for the analysis of triglycerides in milk fat: application for studies of milk quality and adulteration. **Food Chemistry**. v. 54, p. 213-221. 1995.
- 9 - PARODI, P.W. Methods for determining the authenticity of modified milkfats. **The Australian Journal of Dairy Technology**. n. 2, p. 12-17. 1972.

- 10 - PRECHT, D. Control of milk fat purity by gas chromatography triglyceride analysis. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**. v. 43, n. 3, p. 219-242. 1991.
- 11 - PRECHT, D. Detection of foreign fat in milk Fat. **Z Lebensmittel Untersuchung und Forschung**. v.194, p. 1-8. 1992.
- 12 - SATO, T; KAWANO, S.; IWAMOTO, M. Detection of foreign fat adulteration of milk fat by near infrared spectroscopic method. **Journal of Dairy Science**. v. 73, p. 3408-3413. 1990.
- 13 - TIMMS, R.E. Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats. **Journal of Dairy Research**. v. 47, p. 295-303. 1980.

Capítulo 1

Estudo da Composição da Gordura do Leite e sua Adulteração

Capítulo 1 – Estudo da Composição da Gordura do Leite e sua Adulteração

Leite

O leite humano, de cabra, búfala, ovelha e vaca têm sido fonte de alimento desde os tempos pré-históricos. Portanto, seu valor nutricional foi reconhecido há milhares de anos (Jensen, 1991).

O leite é definido por Harding (1990) como sendo um fluido biológico de composição variada, em que a gordura, a proteína, a lactose e mesmo a água variam de animal para animal e de rebanho para rebanho. Há muitos fatores que podem afetar a composição do leite, tais como raça, época do ano, alimentação, estágio de lactação e diferenças climáticas e geográficas.

O leite é um fluido excepcionalmente complexo contendo muitos sistemas biológicos. Consiste de uma emulsão de gordura em água, 85,5 a 88,7% de água e 2,4 a 5,5% de gordura, estabilizada por uma dispersão coloidal de proteína, de cerca de 3,25%, em solução de sais de cerca de 0,18%, na forma de citrato, formiato, acetato, lactato e oxalato. Possui também vitaminas A, E, C, B₁, B₂, B₁₂, ácido fólico, ácido pantotênico, e ácido nicotínico; carboidratos, dos quais o mais abundante é a lactose (4,6%), e em menor quantidade encontram-se a glicose e a galactose. As principais proteínas são a caseína (correspondendo a 80% das proteínas do leite), a lactoglobulina e a lactoalbumina, e vários outros tipos de proteína, como enzimas (peroxidase, catalase, fosfatase, lipase), anticorpos e hormônios, e outros componentes, como pigmentos (carotenos, xantofilas, riboflavina), células (principalmente leucócitos), CO₂, O₂, N₂ e minerais (0,65%), principalmente cálcio, potássio, sódio, zinco, ferro, fósforo, magnésio e cobre (Goff, 2000).

As partículas de gordura e proteína do leite são responsáveis pela sua cor, consistência e opalescência. A cor também é resultado da dispersão da luz em

proteínas, gordura, fosfato e citrato de cálcio. A homogeneização do leite aumenta a coloração branca, pois as partículas fragmentadas refletem mais a luz, por isso o leite desengordurado possui aparência azulada (Riedel, 1987).

A importância da gordura do leite como parte de toda a dieta é mais diversa e relevante para a saúde humana do que se suspeitava anteriormente, pois é uma significativa fonte de ácido butírico na dieta, promovendo energia para as células intestinais e diferenciação das células mutantes. Pesquisas futuras prometem conhecer a fundo como a gordura do leite é fisiologicamente produzida, como pode ser modificada (antes e depois do estágio de lactação), e de que maneira beneficia os consumidores (German, 1999).

Gordura do leite

O leite contém cerca de 3,5 g de gordura em 100 g, cuja composição segundo Banks (1991), apresenta cerca de 98% de triacilgliceróis e os 2% residuais são compostos por ácidos graxos livres, monoacilgliceróis e diacilgliceróis, resultantes da síntese incompleta ou quebra dos triacilgliceróis, esteróis (principalmente colesterol) e fosfolípidios. A gordura é secretada na forma de glóbulos, possuindo tamanho médio de 4 μm . Os glóbulos são estabilizados pela presença sobre sua superfície de uma membrana composta em grande parte por fosfolípidios.

Segundo Geeraert & Sandra (1985) a elucidação da composição de triacilgliceróis da gordura do leite é difícil. Eles analisaram a gordura de leite hidrogenada a fim de simplificar o seu perfil, e apesar disto, os triacilgliceróis saturados de número baixo de carbonos (T28 a T46) ainda mostraram um perfil complexo.

Os triacilgliceróis individuais identificados por cromatografia gasosa (CG) em coluna polar por Geeraert & Sandra (1985) e por Gresti et al. (1993), pela técnica cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-CG), de acordo com a série homóloga podem ser vistos na tabela 1.

Tabela 1 – Composição de triacilgliceróis individuais de gordura de leite..

Série Homóloga	Triacilgliceróis Individuais	
	Geeraert & Sandra (1985)	Gresti (1993)
T24	-	-
T26	-	-
T30	CCC, BuCyS	BuCP
T32	CCLa, BuCS	BuLaP
T34	CLaLa, BuLaS	BuMP
T36	LaLaLa, BuMS	CoMP, BuMS, BuPP, BuMO
T38	LaLaM, BuPS	CoMS, CoPP, BuPS, CoMO, BuPO
T40	LaMM, BuSS	CyPP, CMP, CoPS, BuSS, CoPO, BuSO, BuOO
T42	MMM, LaMP, LaLaS, CPP, CyPS, CoSS	CPP, LaMP, CMO, CoSO, CoOO
T44	MMP, LaPP, LaMS, CPS, CySS	MMP, CPO
T46	MPP, MMS, LaPS, CSS	MPP, LaPO, MMO, COO
T48	PPP, MPS, LaSS	MPS, MPO, LaOO
T50	PPS, MSS	MSO, PPO, MOO, PPoO
T52	PSS	PSO, POO, POLn
T54	SSS	SSO, SOO, OOO

Bu – ácido butírico (C4:0), Co – ácido capríco ou hexanóico (C6:0), Cy – ácido caprílico ou octanóico (C8:0), C – ácido cáprico ou decanóico (C10:0), La – ácido láurico ou dodecanóico (C12:0), M – ácido mirístico ou tetradecanóico (C14:0), P – ácido palmítico ou hexadecanóico (C16:0), Po – ácido palmitoleico ou cis 9 hexadecenóico (C16:1); S – ácido esteárico ou octadecanóico (C18:0), O – ácido oléico ou cis 9 octadecenóico (C18:1), Ln – ácido linoleico ou cis,cis 9,12 octadecadienóico (C18:2). Fonte Geeraert & Sandra (1985) e Gresti (1993).

Gresti et al (1993) identificaram 223 triacilgliceróis distintos de número de átomos de carbono par na gordura do leite, contabilizando 80% do total de triacilgliceróis. Os três mais abundantes (todas as percentagens são expressas como moles/100 moles) foram: butirolpalmitoiloleiacilglicerol (4,2%),

butiroildipalmitoilglicerol (3,2%) e butiroilmiristoilpalmitoilglicerol (3,1%). Vinte e dois triacilgliceróis continham no mínimo dois dos quatro mais abundantes ácidos graxos de cadeia longa (C14:0, C16:0, C18:0 e C18:1). Estes autores relacionaram que a gordura do leite possui 13 ácidos graxos saturados em quantidade maior que 1%, constituindo um total de 95 mol/100mol, e são os de cadeia curta; C4:0 e C6:0; os de cadeia média, C8:0, C10:0 e C12:0; os de cadeia longa, C14:0, C15:0, C16:0 e C18:0; e os ácidos graxos insaturados de cadeia longa, C14:1, C16:1, C18:1 e C18:2. O restante consiste de ácidos graxos de menor proporção, principalmente ácidos graxos de número ímpar de átomos de carbono. De acordo com o número teórico de combinações para a formação de triacilgliceróis é possível, com base nos 13 ácidos graxos mais abundantes, serem encontrados na gordura do leite no mínimo 455 triacilgliceróis, sem considerar os possíveis isômeros.

Lercker et al. (1992) relataram que a gordura do leite dentre aquelas de produtos naturais é seguramente a mais característica, por sua complexidade e singularidade, visto que possui 150 ácidos graxos distintos, possibilitando a existência de um variado e enorme número de triacilgliceróis.

Os ácidos graxos que compõem os triacilgliceróis do leite foram descritos por Alm (1981), como sendo 60 a 70% saturados, 25 a 35% monoinsaturados e cerca de 4% polinsaturados.

Barron et al. (1990) calcularam um total maior do que 1300 triacilgliceróis, baseados somente nos ácidos graxos que estão presentes na gordura do leite em proporção maior que 1%. Os autores identificaram aproximadamente 38% de espécies moleculares contendo ácidos graxos de cadeia curta (C4, C6), aproximadamente 82% de ácidos graxos de cadeia média (C8,-C14) e aproximadamente 91% de ácidos graxos de cadeia longa. Em relação ao grau de insaturação, as moléculas tri-insaturadas contabilizaram aproximadamente 43% do total de espécies identificadas, moléculas monoinsaturadas aproximadamente 31%, moléculas di-insaturadas aproximadamente 12% e moléculas polinsaturadas aproximadamente 14%.

A composição de triacilgliceróis é geralmente definida em função das espécies e quantidade de ácidos graxos presentes. Os lipídios do leite possuem cerca de 10 ácidos graxos (ver tabela 2) que estão em maior quantidades, que possibilitariam um total teórico de 1000 moléculas de triacilglicerol. Na realidade, a gordura de leite possui um número muito maior, quase 400 ácidos graxos. Com este total, o valor máximo teórico de espécies de triacilgliceróis se elevaria para 64 milhões (Jensen, 1991). Parodi (citado por Jensen, 1991), desenvolveu um programa de computador para calcular a quantidade de triacilgliceróis individuais, baseado nesta hipótese. Os resultados foram comparados a resultados obtidos por cromatografia gasosa e obtiveram excelente concordância. Somente 43 triacilgliceróis estão presentes em concentração maior que 0,5 mol/100mol, indicando que a maioria dos triacilgliceróis está presente em quantidade traço.

Tabela 2 - Composição em ácidos graxos da gordura do leite

Ácido graxo	Triacilglicerol (mol/100mol)	Ácido graxo	Triacilglicerol (mol/100mol)
C4:0	11,8	C16:0	23,9
C6:0	4,6	C16:1	2,6
C8:0	1,9	C17:0	0,8
C10:0	3,7	C18:0	7,0
C12:0	3,9	C18:1	24,0
C14:0	11,2	C18:2	2,5
C15:0	2,1	C18:3	traço

Fonte: Jensen (1991)

Variação da composição da gordura

A variação da composição da gordura do leite foi descrita por vários pesquisadores.

Juarez & Martinez-Castro (1980) relataram que os componentes da gordura do leite não são quantitativamente constantes. Eles variam dentro de certos

limites, em função de circunstâncias, tais como a alimentação, estágio de lactação, raça e características ambientais, como, por exemplo, a conhecida diferença entre a manteiga de inverno e a de verão. Esta variabilidade possibilita a obtenção de manteiga mais branda, quando se oferecem aos animais gorduras polinsaturadas micro-encapsuladas.

Sutton (1989) também afirmou que a gordura é o constituinte do leite mais sujeito à variação, e que o fator nutricional é capaz de provocar rápidas mudanças, citando que os fatores dietéticos importantes são: a quantidade de fibra, relação forragem:concentrado, a composição de carboidratos do concentrado, lipídeos, ingestão e frequência em que o animal é alimentado. A explicação está fundamentada nas complexas transformações que ocorrem no rúmen, alterações influenciadas pelos hormônios no corpo e as restrições fisiológicas e bioquímicas resultantes da via de sólidos do leite que são sintetizados e secretados no úbere. Dos principais constituintes do leite, a concentração da gordura pode ser alterada acima de uma larga faixa de cerca de três unidades percentuais por meios nutricionais, a proteína sobre uma faixa muito menor, aproximadamente 1/5, e a lactose quase não se altera.

De acordo com Sutton (1989), da alimentação do gado provêm os nutrientes que são os precursores, direta ou indiretamente, dos principais sólidos do leite. Deste modo, dando-se a uma vaca uma dieta diversificada obter-se-á na produção maior volume de leite. Em geral, há um proporcional aumento nas quantidades de gordura, proteína e lactose que são aproximadamente as mesmas referentes ao aumento no volume de leite, mudando pouco a composição. Todavia, não há uma relação simples entre os constituintes da ração e os produtos individuais do leite, tal que o aumento da quantidade de um constituinte em particular na ração resulte num aumento da secreção de um constituinte similar no leite. Por exemplo, aumentando-se a concentração da proteína na dieta, mas mantendo-se constante a quantidade de energia, o resultado é de pouco ou nenhum efeito na concentração da proteína do leite, e adicionando-se gorduras na dieta pode-se efetivamente diminuir a concentração da gordura do leite.

É pela manipulação da ração, quantidade, composição e perfil do alimento que ocorrem as maiores mudanças, uma vez que consumido o alimento, a quantidade de controle externo possível é limitada. Algum controle do perfil de fermentação do rúmen e menos certamente da absorção intestinal é possível pelo uso de aditivos não nutricionais, por exemplo, tampões e antibióticos. Os hormônios desempenham um papel vital no controle de muitos aspectos da síntese do leite, mas não tem sido demonstrado terem eles um papel amplo na composição do leite frente aos efeitos nutricionais. Uma clara exceção é a associação da diminuição da gordura do leite causada por dietas com baixa quantidade de alimentos ricos em substâncias não digeríveis com elevada concentração de insulina no plasma. Apesar do efeito dos hormônios exógenos no aumento da produção do leite, seu uso, na manipulação da composição do leite tem de ser demonstrado para ter aplicações práticas (Sutton, 1989).

Lercker et al. (1992) mostraram que o conteúdo de gordura de leite é particularmente sensível ao momento da ordenha, ao clima devido à mudança das estações do ano, agindo na curva de lactação, principalmente devido à concentração de gordura do leite durante o inverno e verão. Também o fator alimentar incide particularmente sobre a gordura do leite, pois a insuficiência do feno ou palha na dieta tende a reduzir o conteúdo de gordura. No caso de hiperalimentação há aumento na produção de leite, estritamente em relação à energia total produzida, tendo como consequência a diminuição na qualidade, pela redução do teor de proteína e gordura.

Batelli & Pellegrino relataram em publicação de 1994, que a composição da gordura do leite é altamente variável, dependendo principalmente da alimentação do animal, condições de saúde e lactação. Valores mais extremos são obtidos quando o animal está sob particular condição de alimentação, como, por exemplo, quando são oferecidas rações contendo soja e sais de cálcio.

Palmquist & Beaulieu (1993) pesquisaram alguns fatores que interferem na composição da gordura, como fator animal, compreendendo o fator genético e o estágio de lactação; o fator alimentar, incluindo ingestão de grãos, quantidade e

composição da gordura da dieta, ingestão de proteínas e ingestão de rações energéticas. Correlações genéticas com o percentual de gordura do leite foram consistentemente positivas para a proporção de ácidos graxos de cadeia curta e consistentemente negativa para ácidos graxos de cadeia longa. Concluíram que o fator mais importante na variabilidade da gordura do leite é a quantidade e a composição da gordura na dieta, do que outros componentes desta, e que as diferenças sazonais e regionais podem ser medidas, mas estas têm como causa, diferenças locais e sazonais de suplementos da ração.

Hurley (1997) mostrou que os fatores que afetam a composição do leite são: a raça do mamífero, pois nas raças Jersey e Guernsey a concentração de gordura é maior, e menor na Holstein; o estágio de lactação e durante a ordenha. Na ordenha o teor de gordura é mais baixo no início e gradualmente vai aumentando o percentual à medida que o leite é removido, sendo a última porção ordenhada a que possui o maior teor de gordura. O autor afirmou que a gordura é o componente de maior variação. Maior atenção na composição do leite tem sido focada na concentração de gordura, pois é a mais influenciada pela dieta, que pode ser mudada numa faixa larga dos três maiores componentes sólidos e foi o primeiro constituinte a ser largamente usado como base para variação do preço do leite.

Muuse et al. (1986) relataram diferenças na composição da gordura de leite de inverno e verão. Demonstraram que os ácidos graxos de cadeia curta e média até o C14 são sintetizados na glândula mamária através do acetato e ácido-3-hidroxi-butírico. O ácido palmítico origina-se não só do acetato, mas também dos triacilgliceróis do plasma, e os ácidos graxos C18 são originados quase que inteiramente de fontes da dieta, enquanto somente pequena porção é sintetizada pela glândula mamária. Os autores disseram que há uma correlação positiva entre os ácidos graxos acima do C4:0 até o C16:0, sendo a importância da correlação inversamente proporcional à magnitude da diferença do comprimento da cadeia, isto é, os ácidos graxos C12, C14 e C16, possuem forte correlação positiva entre si, bem como os C18:0 e C18:1. Da mesma forma, verifica-se que , existe correlação negativa entre os grupos de ácidos graxos C12, C14 e C16 e o grupo

C18:0 e C18:1. O grupo de ácidos graxos C4, C6, C8 e C10 mostram somente uma fraca correlação com os dois grupos mencionados.

Banks (1991) descreveu que a proporção de ácidos graxos depende da raça, idade e estágio de lactação do animal, mas a maior fonte de variação é a dieta do animal, mostrando que os ácidos graxos que sofrem maior variação percentual são: C4:0 (2,5-4,2%), C6:0 (1,5-2,4%), C8:0 (0,8-1,5%), C10:0 (2,5-3,4%), C12:0 (2,8-4,0%), C14:0 (8,0-14,0%), C16:0 (23,0-48,0%), C18:0 (5,0-20,0%), C18:1 (17,0-42,0%), C18:2 (1,5-20,0%) e C18:3 (0,5-15,0%). Banks et al. (1990) mostraram que, em circunstâncias normais, os valores encontrados na gordura do leite para o C18:1 e C18:2, são próximos aos valores mínimos citados acima. Os valores altos para o C18:1 e C18:2 refletem o fato de que a dieta dos animais continha óleo vegetal protegido contra a ação ruminal.

Palmquist & Beaulieu (1992) mostraram que existe diferença na gordura do leite entre as raças do animal, estabelecendo que os ácidos graxos C6 até C14, como percentagem do total de ácidos graxos do leite eram maiores de 8 a 42% em vacas Jersey do que em Holstein, sendo esta diferença independente da dieta.

Alonso (1993) afirmou que a gordura do leite exibe grande variabilidade, principalmente em função da alimentação e estágio de lactação, incluindo presença de ácidos graxos desde o C2 ao C26, de número de carbonos pares e ímpares, de cadeias retas ou ramificadas, número de duplas ligações de zero a seis e isômeros trans.

Foi observado por Jenkins (2000), que a oleoamida resiste à biohidrogenação ruminal e eleva a concentração de ácido oleico quando se alimenta vaca Holstein no período de lactação. O autor desenvolveu uma pesquisa mostrando que vacas Jersey respondem similarmente, quando alimentadas com dieta composta de uma mistura de ração com 47% de silagem de milho e 53% de concentrado, suplementada com óleo de canola, uma fonte comercial de oleoamida, ou oleoamida sintética. Os resultados mostraram aumento da concentração de ácido oleico no leite, redução do ácido palmítico e aumento do ácido esteárico. Consistentemente com o estudo anterior, as vacas Jersey quando

alimentadas com oleoamidas resistem a biohidrogenação ruminal e mostram um aumento na concentração de ácido oleico no leite, mas com diminuição da ingestão de ração e produção do volume de leite.

Precht, em seus trabalhos de 1991 e 1992, mostrou que a gordura do leite exibe grande variabilidade em sua composição, principalmente em função dos períodos de alimentação, como, por exemplo, a ração da época do inverno e do verão, diferentes estágios de lactação, ou em condições não usuais de alimentação, como alimentação insuficiente ou com sais de cálcio, rações gordurosas como sementes de algodão, soja ou uva. Precht (1991), mostrou, ainda, que durante o período em que os animais se alimentaram com semente de algodão e soja, as quantidades dos triacilgliceróis C40 e C48 foram respectivamente 11,2% e 7,2% e quando foram alimentados com semente de uva, o teor de C40 foi de 11,5%, ambos acima da faixa de variação dos triacilgliceróis, que era para o C40 de 8,60-10,42% e para o C48 de 7,91-10,65%.

Hinrichs et al. (1992) estudaram a gordura do leite do inverno e verão, e concluíram que, com a alimentação dos animais no estábulo durante o inverno, há aumento nos triacilgliceróis de cadeia curta e média e diminuição nos triacilgliceróis C50, C52 e C54, enquanto que a proporção de triacilgliceróis com número de carbonos de C38 a C40 permanece constante. Os autores afirmam que mais triacilgliceróis de cadeia curta e média e poucos insaturados de cadeia longa são encontrados na gordura de leite do inverno. O uso de forragem que é rica em gordura com alta proporção de ácidos graxos poli-insaturados C18 força o metabolismo *de novo síntese* de ácidos graxos para um segundo plano. Do mesmo modo que o ponto de fusão e a viscosidade são afetados pela concentração de ácidos graxos saturados de cadeia curta e longa, e ácidos graxos insaturados, a incorporação de ácidos graxos insaturados da gordura da forragem é acompanhada pela diminuição no *de novo síntese* de ácidos graxos saturados de cadeia curta. Isto causa a redução dos triacilgliceróis de peso molecular mais baixo e aumento nos de peso molecular mais alto na gordura de verão, diferentemente da de inverno.

Bornaz et al. (1992) relataram diferenças sazonais e regionais, mostrando que os triacilgliceróis Palmítico-Oleico-Oleico, Esteárico-Oleico-Linoleico, Mirístico-Oleico-Oleico, Caprótico-Láurico-Oleico, Caprílico-Mirístico-Oleico, Caprótico-Palmítico-Oleico, Butírico-Esteárico-Oleico, Butírico-Palmítico-Oleico, Caprótico-Mirístico-Oleico e Caprótico-Palmítico-Láurico, são os que apresentaram maior variação entre o inverno e verão.

Foi verificado que a alimentação da vaca com soja, algodão e sais de cálcio de ácido de cadeia longa induziu à variação da composição de ácidos graxos do leite, de tal modo, que levou a manteiga genuína a não poder ser distinguida daquela que foi adicionada de gordura animal estranha. Estudos realizados na Itália e em outros países em 1993, mostraram que há evidências da influência da alimentação, em razão da variação dos componentes de sua gordura sobre a composição dos ácidos graxos do leite, resultando, portanto do abandono das relações entre os ácidos graxos como meio de revelação da adulteração (Contarini & Batelli, 1993).

Métodos de análise de gordura do leite

Hilditch (1956) foi o primeiro pesquisador que estudou a composição da gordura do leite e estabeleceu grosseiramente um balanço de 26 categorias de acilgliceróis.

A composição da gordura pode ser determinada por métodos de separação qualitativos e determinação quantitativa de seus vários componentes. Pode-se citar, entre os métodos qualitativos, a separação através de cromatografia em camada delgada (CCD) e de coluna preparativa. A cromatografia em camada delgada pode ser usada como técnica semiquantitativa. Estas duas técnicas têm sido usadas extensivamente como técnica preparativa para cromatografia gasosa e líquida, com o objetivo de fracionar a gordura e a CCD para determinação de adulteração.

Hendrickx & Huyghebaert (1971) e Iverson & Sheppard (1989) demonstraram a presença anormal de monoacilgliceróis na gordura do leite, utilizando CCD. Blank & Privett (1964) usaram CCD e como adsorvente nitrato de prata-ácido salicílico para separar triacilgliceróis de cadeia longa e curta, esteróis e lipídeos polares. Ulberth & Henning (1994) usaram Ag-CCD para pré-separação de ésteres metílicos de ácidos graxos. Lund (1988) separou frações de triacilgliceróis de acordo com o grau de insaturação por AgNO_3 -CCD.

O fracionamento da gordura de leite por coluna cromatográfica foi utilizado como técnica preparativa por Lercker et al. (1992) e Laakso & Kallio (1993).

Vários métodos de análise da gordura do leite por cromatografia gasosa podem ser descritos, como a quantificação da gordura de leite e mistura de gorduras baseada na determinação de ácido butírico (C4) que está presente exclusivamente no leite (Molkentin & Precht, 1997 e 1998); a quantificação dos ácidos graxos dos triacilgliceróis, realizada através da hidrólise alcalina (Fox et al., 1988; Laakso & Kallio, 1993; Carelli & Cert, 1993; Matter, L., 1992; e Molkentin & Precht, 1997), ou enzimática usando lipase (Phillips et al., 1972); e a determinação dos triacilgliceróis integrais (Kalo et al., 1986; Hinshaw Jr., 1987; Precht, 1992; e Molkentin & Precht, 1994). O método enzimático não resulta em hidrólise total, sendo usado também quando o interesse é a formação de mono e diacilgliceróis.

Na cromatografia gasosa pode ser empregado como detector o de ionização de chama (Contarini & Battelli, 1993; Molkentin & Precht, 1997) ou detector de massa (Rěsanka, 1991). A cromatografia gasosa usando fluido supercrítico foi empregada por Lee et al. (1991), na análise de mono e diacilgliceróis, com detector de ionização de chama e Kallio et al. (1989) com detector de espectrometria de massa (EM), na análise de triacilgliceróis de gordura de leite.

A análise de triacilgliceróis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) usando coluna carregada com íons prata foi realizado por Christie (1994) e Laakso & Kallio (1993).

Wojtusik et al. (1989), Lyapkov & Melamed (1990) e Sewell (1992) utilizaram CLAE com os detectores de ionização de chama, "evaporative light scatter" (ELSD), infravermelho, ultravioleta e índice de refração. CLAE com "postcolumn reaction" (PCRD) foi descrita por Wojtusik et al. (1989) e Lyapkov & Melamed (1990).

Outros métodos cromatográficos podem ser citados, como a técnica combinada de CLAE-CG, usados por Maniogui et al. (1991) e Gresti et al. (1993) e CLAE-EM e EM-EM descrita por Laakso & Kallio (1993).

Outros métodos não cromatográficos são citados por Lipp (1995), como:

Índices físico-químicos - índice de Reichert-Meissl e Polensk, ambos titrimétricos, que determinam ácidos graxos solúveis e insolúveis em água; índice de iodo e índice semimicrobutírico - Calorimetria diferencial de varredura - Espectroscopia no infravermelho (Sato et al., 1990) - Quantidade e propriedade dos insaponificáveis, como esteróis, hidrocarbonetos, álcoois alifáticos, tocoferol, e tocotrienol - análise de mono e diacilgliceróis - medidas isotópicas de $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ - detecção gravimétrica de cristais de triacilgliceróis - di-esterol-éter e cetocompostos.

Métodos cromatográficos

A análise de triacilgliceróis por cromatografia gasosa tem se tornado rotineira nas últimas décadas, apesar destes compostos apresentarem os maiores pontos de ebulição. De acordo com Grob Jr. (1979) estes compostos até então só eram separados por coluna empacotada, porém a partir da evolução de colunas capilares, que foram introduzidas em 1963, estas passaram a oferecer alta eficiência de separação e maior velocidade na análise de complexas misturas de acilgliceróis com larga faixa de massa molecular.

A introdução de colunas capilares de sílica fundida e o progresso na tecnologia de imobilização da fase estacionária ampliaram a possibilidade de análise de triacilgliceróis e outras substâncias naturais com baixa volatilidade, o

que não pode ser obtido com colunas empacotadas (Mareš & Husek, 1985). A alta estabilidade da fase estacionária de silicone imobilizado sobre coluna de sílica fundida inerte permite a eluição de triacilgliceróis de peso molecular maior do que 950 (Matter et al., 1989).

Timms (1980), Young (1984) e Precht (1991) analisaram triacilgliceróis em gordura de leite e chocolate em coluna empacotada estabilizada para alta temperatura.

A análise por cromatografia gasosa de triacilgliceróis em coluna capilar de sílica fundida utilizando alta temperatura, com injeção "on-column" foi avaliada por Grob Jr. (1979) que comparou este tipo de injeção com o convencional "split" e "splitless", mostrando que a injeção "on column" fornece maior reprodutibilidade.

Marš & Husek (1985), pesquisando os efeitos da técnica de injeção afirmou que o uso de injeção "on column" aliada a uma coluna de boa qualidade produziu valores de fator de resposta independente da quantidade injetada de triacilglicerol e do fluxo de gás de arraste, para triacilgliceróis com número de carbono de 30 a 54.

Mayer & Lorbeer (1997) testaram a qualidade de colunas capilares de sílica fundida com uma mistura de triacilgliceróis em alta temperatura e assinalaram que o uso de "on column" previne a discriminação por diferença de massa molecular, e além disso, o comprimento e diâmetro da coluna, espessura do filme e fluxo do gás de arraste influenciam a temperatura de eluição dos componentes e conseqüentemente o grau de degradação.

Kalo et al. (1986) avaliaram a precisão e exatidão da técnica de injeção e reportaram que com "on column" e coluna de sílica fundida de 0,32 mm de diâmetro interno e 0,1µm de espessura de filme de SE-54, consegue-se fator de resposta para triacilgliceróis de médio peso molecular mais baixo que para os triacilgliceróis C30 e C54.

Řesanka & Marš (1991) analisaram vários tipos de óleos e sementes e concluíram que para analisar qualitativa e quantitativa triacilgliceróis individuais de óleos e gorduras, somente é possível, por intermédio da combinação das técnicas

cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa e espectroscopia de massa por ionização química.

A análise por cromatografia gasosa capilar de triacilgliceróis de óleos e gorduras foi realizada por Geeraert & Sandra (1985 e 1987) usando alta temperatura, injetor "cold on-column" e fase estacionária fenilmetilsilicone. Sob estas condições os triacilgliceróis são separados de acordo com o comprimento da cadeia e para cada número de átomos de carbono a eluição é feita de acordo com seu grau de insaturação.

A injeção a quente foi utilizada por Antoniosi Filho et al., (1993) em coluna polar de 25mx0,25mmx0,1µm OV17 (50%fenil50%metilpolisiloxano), na análise de triacilgliceróis de óleos vegetais e Precht (1991) na análise de gordura de leite em coluna apolar.

A injeção com programação de temperatura foi descrita pela primeira vez por Vogt et al. (1979) e desenvolvida por Poy et al. (1981), Schomburg et al. (1983) e Hinshaw Jr. (1987). Na injeção em "split" com programação de temperatura, usada por Hinshaw Jr. & Seferovic (1986); Lund (1988); Alonso (1993); Lin & Lam (1994); Molkentin & Precht (1994) e Ulberth & Gaberning (1997), a amostra é introduzida em um insensor empacotado do injetor sob condições de temperatura ambiental. A temperatura do injetor é aumentada depois de completa transferência da amostra, vaporizando seletivamente os componentes da amostra que passam para a entrada da coluna. A seringa não é aquecida e a amostra é vaporizada de maneira relativa e gradual. Muitos dos efeitos associados com amostragem em modo "split" e temperatura isotérmica são reduzidos ou eliminados (Janssen, 1998).

A técnica de injeção afeta profundamente a cromatografia de triacilgliceróis. Injeção "on column" é recomendada pois fornece precisão e exatidão quando comparada a injeção "split" ou "splitless" a quente. Perdas significantes ocorrem com injeção a quente devido à presença na amostra de moléculas com alto peso molecular dentro da agulha da seringa durante a injeção, ocorrendo discriminação de massa, ou incompleta vaporização ou degradação térmica. Na injeção com

programação de temperatura com “split/splitless” a temperatura é mantida relativamente baixa, durante a injeção (próximo ao ponto de ebulição do solvente). O injetor é então rapidamente aquecido por um fluxo de ar vaporizando a amostra que é direcionada pelo fluxo do gás de arraste para a injeção em “split” ou “splitless”. Este tipo de injetor difere significativamente de “on column” pela adição da etapa de vaporização. Neste tipo de injeção não há acúmulo de resíduos na entrada da coluna (Hinshaw Jr., 1986).

Adulteração da gordura do leite

Atualmente os consumidores têm demonstrado interesse no aspecto da qualidade, segurança, nutrição e rotulagem de alimentos. Por esta razão, a indústria láctea preocupa-se com o problema acarretado por industriais, que visando vantagens econômicas retiram parte da gordura substituindo-a por outra de menor preço, sem o devido esclarecimento no rótulo.

De acordo com Younes & Soliman (1986) o conhecimento da composição da gordura do leite, de outras gorduras animais e de óleos vegetais pode ser útil no estudo da adulteração. Os autores mostraram que o ácido oleico ocorre predominantemente em muitas gorduras em uma concentração na faixa de 15 a 60% e o ácido esteárico em alta concentração (25% ou mais do total de ácidos graxos) no depósito adiposo de alguns animais. No leite de mamíferos a composição da gordura é qualitativa e quantitativamente muito variada tornando-se um problema.

Os primeiros testes para determinar a adulteração foram realizados através de testes químicos como Reichert-Meissl e Polenske (Laruelle et al., 1976), que determinam os ácidos graxos solúveis e insolúveis em água.

Métodos para a determinação de adulteração por cromatografia gasosa através da relação entre os ácidos graxos foram desenvolvidos por Younes & Soliman (1986); Duthie et al. (1988); Fox et al. (1988) e Iverson & Sheppard (1989).

O mais conhecido e antigo método de detecção de gordura vegetal na gordura do leite é o dos acetatos de esterol. O acetato de colesterol é específico de gorduras de origem animal e a maior parte dos acetatos de esterol ou fitosterol, β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e brasicasterol são específicos das gorduras de origem vegetal. Os óleos vegetais contêm 0,04-0,9% de esteróis e a gordura do leite contém cerca de 0,3% de colesterol. A gordura do leite apresenta a maior parte dos esteróis em forma livre, enquanto as outras gorduras de substituição encontram-se em forma esterificada. O colesterol é o esterol predominante na fração insaponificável da gordura do leite autêntica. Outros esteróis estão presentes, porém em quantidades de traços (Juarez & Martinez-Castro, 1980).

Métodos por cromatografia gasosa capilar para a determinação de adulteração através da análise de esteróis foram realizados por Hendrickx & Huyghebaert (1971); Mariani et al. (1994) e Nota et al. (1995).

Segundo Parodi (1972) a combinação dos métodos de determinação dos ácidos graxos dos triacilgliceróis, análise de esteróis, perfil de distribuição dos triacilgliceróis, o valor do ponto de amolecimento e análise no infravermelho de insaturações *trans* podem caracterizar estes produtos e distingui-los de gordura de leite adulterada. Neste trabalho, determinando os triacilgliceróis, esteróis e ácidos graxos da gordura de leite por cromatografia gasosa, pensou tratar-se de produto adulterado, pois os valores de ácidos graxos insaturados e do C54 estavam altos. O autor subestimou a variação da composição da gordura do leite e este fato conduziu a resultados errôneos, apesar desta técnica contribuir para a determinação da adulteração de gordura de origem vegetal e animal.

Timms (1980) analisou a composição de gorduras de leite da Austrália por cromatografia gasosa e através do emprego da análise de regressão linear nestes resultados obteve uma fórmula para a determinação da autenticidade da gordura numa faixa de confiança de 99%, baseada em somente três triacilgliceróis C40, C42 e C44.

Pesquisadores como Timms (1980), Lercker et al. (1992) e Contarini & Batelli (1997) utilizaram o perfil de triacilgliceróis e relações entre eles para determinar a adulteração.

O estudo de Precht & Heine, iniciou-se em 1986 com a análise da composição de triacilgliceróis de um número representativo de amostras da gordura de leite por cromatografia gasosa. Estes resultados foram estatisticamente analisados e através de regressão linear obteve-se uma equação, onde empregando-se a composição de triacilgliceróis da gordura, obtém-se a soma dos triacilgliceróis com os respectivos fatores. Esta gordura de leite será considerada adulterada se esta soma estiver fora da faixa de confiança de 99%. Precht em 1991 e 1992 descreveu o método por cromatografia gasosa de análise de triacilgliceróis, para determinar a autenticidade da gordura do leite pelo estudo do seu perfil, levando-se em conta a variabilidade deste perfil em relação à raça, ração, sazonalidade, regionalidade e lactação. A partir destes dados definiu uma equação geral e outras específicas para cada grupo de adulterantes, como óleos de soja, girassol, oliva, semente de algodão, linhaça, gérmen de trigo, gérmen de milho, algodão e peixe; óleo de coco e semente de palma; óleo de palma e sebo; e toucinho.

Diversos pesquisadores utilizaram a fórmula proposta por Precht (1992). Contarini & Battelli (1993) analisaram produtos lácteos e conseguiram determinar a adulteração na faixa de 5 a 10% com coluna empacotada, porém com coluna capilar obtiveram melhor resultado na ordem de 5%. Batelli & Pellegrino (1994) analisando diversos tipos de queijo mostraram que a fórmula se aplica a estes produtos com exceção daqueles que possuem alto valor de lipólise. Renterghem (1997) confirmou a validade da fórmula de Precht, quando empregou o resultado da análise de 125 amostras de manteiga da Bélgica. Collomb et al. (1998), na análise de 90 amostras de manteiga de várias regiões da Suíça, concluíram que as fórmulas propostas por Precht são aplicadas aos produtos suíços.

Contari & Battelli (1997), usaram o método publicado na Gazeta Oficial da Comunidade Européia do dia 01 de março de 1995, que reporta no seu item III o

método para revelação de gordura estranha na gordura de leite através de cromatografia gasosa de seus triacilgliceróis.

Outros métodos de avaliação de adulteração podem ser descritos como a espectroscopia na região do infravermelho realizada por Sato et al. (1990) em manteiga e leite e a depressão do ponto de congelamento realizada por Harding (1990) para determinar adição de água ao leite.

Os adulterantes mais comumente citados na literatura são: óleo de soja puro, óleo de soja parcialmente hidrogenado e óleo de coco (Fox et al., 1988).

Hendrickx & Huyghebaert (1971) citaram as gorduras de substituição, compreendendo aquelas que foram modificadas para imitar da melhor maneira possível a gordura butírica. Assim são consideradas gorduras naturais ou misturas de gorduras naturais, gorduras interestificadas, óleo de coco ou palmiste (tendo em vista se obter quantidade suficiente de ácidos graxos de cadeia média) e de triacilgliceróis como a tributirina (visando aumentar a quantidade de ácidos graxos de cadeia curta). Em alguns casos usa-se também a tricaprina a fim de se normalizar a relação C12:0/C10:0 e gordura de origem vegetal como óleo de soja e girassol e gordura de origem animal.

Foi relacionado por Parodi (1972) como adulterantes os óleos de soja, oliva, algodão, coco, palma, parte comestível do gérmen de trigo, óleo de gérmen de trigo, palma e gordura animal como sebo e toucinho.

Younes & Soliman (1986) e Soliman & Younes (1986) citaram sebo e óleo hidrogenado, principalmente óleo de algodão.

Uma mistura de 60% de margarina de óleo de milho hidrogenado e 40% de creme de manteiga doce foi descrita por Duthie et al. (1988). Sato et al. (1990) mencionam como adulterantes, a margarina e o leite de soja.

Collomb & Spahni (1991) fazem referência a vários tipos de adulterantes de gordura de leite para consumo humano e animal. Entre os adulterantes da gordura de leite para consumo humano citam as gorduras de substituição, compreendendo as margarinas, bebidas de soja e as gorduras sintéticas; os produtos de imitação

compreendendo as misturas de manteiga e gorduras vegetais; misturas com gorduras tecnologicamente modificadas, como gorduras vegetais submetidas à hidrogenação e transesterificação.

Referências Bibliográficas

1. ALM, L. Effect of fermentation on milk fat of swedish fermented milk products. **Journal Of Dairy Science**. v. 65, p. 521-530. 1981.
2. ALONSO, L. Capillary gas chromatography of some triglycerides in cheese using programmed-temperature injection. **Chromatographia**. v. 35, n. 9, p. 649-652. 1993.
3. ANTONIOSI FILHO, N. R.; CARRILHO, E.; LANÇAS, F. M. Fast quantitative analysis of soybean oil in olive oil by high-temperature capillary gas chromatography. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 70, n. 10, p. 1051-1053. 1993.
4. BANKS, W.; CLAPPERTON, J. L.; GIRDLER, A. K. Effect of dietary unsaturated fatty acids in various forms on the *novo synthesis* of fatty acids in bovine mammary gland. **Journal of Dairy Research**. v. 57, p. 179-185. 1990.
5. BANKS, W. Milk fat. **Journal of the Society of Dairy Technology**. v. 442, p. 31-32. 1991.
6. BARRON, L. J. R.; HIERRO, M. T. G.; SANTA-MARIA, G. HPLC and GLC analysis of the triglyceride composition of bovine, ovine and caprine milk fat. **Journal of Dairy Research**. v. 57, p. 517-526. 1990.
7. BATELLI, G. & PELLEGRINO, L. Detection of non-dairy fat in cheese by gas chromatography of triglycerides. **Italian Journal of Food Science**. n. 4, p. 407-419. 1994.
8. BLANK, M. & PRIVETT, O. S. Structure of milk fat triglycerides. **Journal of Dairy Science**. v. 47, p. 481-489. 1964.

9. BORNAZ, S.; NOVAK, G.; PARMENTIER, M. Seasonal and regional variation in composition of french butterfat. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 69, n. 11, p. 1131-1135. 1992.
10. CARELLI, A. A. & CERT, A. Comparative study of the determination of triacylglycerol in vegetable oils using chromatographic techniques. **Journal of Chromatography**. v. 630, p.213-222. 1993.
11. CHRISTIE, W. W. Silver ion and chiral chromatography in the lipids triacylglycerols. **Progress Lipid Research**. v. 33, n. 1/2, p. 9. 1994.
12. COLLOMB, M. & SPAHNI, M. Adulteration des produits laitiers. revue des critères analytiques de détection de graisses végétales et animales dans la graisse de beurre. **Travaux de Chimie Alimentaire et d'Hygiene**. v. 82, p. 615-662. 1991.
13. COLLOMBO, M.; SPAHNI, M.; BUEHLER, T. Analysis of Triglycerides. II. Validation of a Modification of a Multilinear Regression Method for the Determination of Foreign Fats in milk fat. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**. v. 89, n. 1, p. 75-83. 1998.
14. CONTARINI, G & BATTELLI, G. Valutazione della genuinità del burro mediante analisi di trigliceridi ed acidi grassi. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**. v. 70, n. 10, p. 491-499. 1993.
15. CONTARINI, G & BATTELLI, G. Applicazione del metodo ufficiale della ue per la valutazione della genuinità del grasso di latte: esperienze e suggerimenti. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**. v. 74, n. 11, p. 527-532. 1997.
16. DUTHIE, A. H.; FOX, J.R.; CAVALIER, J. P.; WULFF, S. Modification of the Vermont test for monitoring fat adulteration of dairy products. **Journal of Dairy Science**. v. 71, p. 1764-1768. 1988.

17. FOX, J. R.; DUTHIE, A. H.; WULFF, S. Precision and sensitive of a test for vegetable fat adulteration of milk fat. **Journal of Dairy Science**. v. 71, p. 574-578. 1988.
18. GEERAERT, E. & SANDRA, P. Capillary GC triglycerides in fats and oils using a high temperature phenylmethylsilicone stationary phase, Part I. **Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications**. v. 8, n. 8, p. 415-422. 1985.
19. GEERAERT, E. & SANDRA, P. Capillary GC triglycerides in fats and oils using a high temperature phenylmethylsilicone phase. Part II. The analysis of chocolate fats. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 64, n. 1, p. 100-105. 1987.
20. GERMAN, B. The science of milk fat. dairy beat table. California Dairy Research Foundation. 1999. Disponível em: <http://www.cdrrf.org/dbeaat7.html>. Acesso em: 23/04/00.
21. GOFF, H. D. Dairy science and technology. Education series. University of Guelph. Disponível em: <http://www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/home.html>. Acesso em: 22/04/00.
22. GRETI, J.; BUGAUT, M.; BEZARD, J. Composition of molecular species of triacylglycerols in bovine milk fat. **Journal of Dairy Science**. v. 76, p. 1850-1869. 1993.
23. GROB JR., K. Evaluation of injection techniques for triglycerides in capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography**. v. 178, p. 387-392. 1979.
24. HARDING, F. Milk adulteration – freezing point depression. **Journal of the Society of Dairy Technology**. v. 3, n. 3, p. 61. 1990.
25. HENDRICKX, H. & HUYGHEBAERT, A. Quelques aspects de la détection des graisses étrangères dans la matière grasse butyrique. **Le Lait**. v. 51, n. 11/12, p. 611-622. 1971.

26. HILDITCH, T. P. **The chemical constitution of natural fats**. 3 rd. Chapman and Hall Ltd. London. England. 1956.
27. HINRICHS, J.; HEINEMANN, U.; KESSLER, H. G. Differences in the composition of tryglycerides in summer and winter milk fat. **Milchwissenschaft**. v. 47, n. 8, p. 495-498. 1992.
28. HINSHAW JR., J. V. & SEFEROVIC, W. Analysis of triglyceride by capillary gas chromatography with programmed-temperature injection. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**. v. 9, n. 12, p. 731-736. 1986.
29. HINSHAW JR., J. V. Modern inlets for capillary gas chromatography. **Journal of Chromatographic Science**. v. 25, n. 2, p. 49-55. 1987.
30. HURLEY, W. L. Milk composition. Disponível em: <http://www.classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/milkcomp.html>. Acesso em: 07/11/97.
31. IVERSON, J. L. & SHEPPARD, A. J. Detection of adulteration in cow, goat, and sheep cheeses utilizing gas-liquid chromatography fatty acid data. **Journal of Dairy Science**. v. 72, p. 1707-1712. 1989.
32. JANSSEN, H. Samples introduction techniques for capillary gas chromatography. Disponível em: <http://www.gerstelus.com/gerweb/GCinjPrimer.pdf>. 1998. Acesso em: 24/04/2000.
33. JENKINS, T. C. Feeding oleamide to lactating jersey cows. 1 effects on lactation performance and milk fat composition. **Journal of Dairy Science**. v. 83, p. 332-337. 2000.
34. JENSEN, R. G.; FERRIS, A. N.; LAMMI-KEEFE, C. J. Symposium: milk fat-composition, function and potential for change. the composition of milk fat. **Journal of Dairy Science**. v. 74, n. 9, p. 3228-3243. 1991.

35. JUÁREZ, M. & MARTINEZ-CASTRO, I. Criterios analíticos para la detection de grasas extrañas en la grasa de leche. **Alimentaria**. v. 109, p. 61-64,81-86. 1980.
36. KALLIO, H.; LAAKSO, P.; HUOPALAHTI, R.; LINKO, R. R. Analysis of butter fat triacylglycerols by supercritical fluid chromatography/electron impact mass spectrometry. **Analytical Chemistry**. v. 61, n. 7, p. 698-700. 1989.
37. KALO, P.; VAARA, K.; ANTILA, M. Quantitative determination of triacylglycerols separated on capillary columns according to acyl carbon number and level of unsaturation. **Journal of Chromatography**. v. 368, p. 145-151. 1986.
38. LAAKSO, P. & KALLIO, H. Triacylglycerols of winter butterfat containing configurational isomers of monoenoic fatty acyl residues. i. disaturated monoenoic triacylglycerols. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 70, n. 12, p. 1161-1171. 1993.
39. LARUELLE, L.; VAN DIJCK, M; DAENENS, P. Fatty-acid composition of Reichert-Meissl and Polenske fractions in butterfat. **Journal of Dairy Research**. v. 43, p. 137-140. 1976.
40. LEE, T. W.; HASTILOW, C.; SMITH, K. Simple method for derivatization of monoglycerides and diglycerides. **Journal of Association Analytical Chemical**. v. 71, n. 4, p. 785-788. 1991.
41. LERCKER, G.; FREGA, N.; BOCCI, F.; BERTACCO, G. Il Grasso del latte, l'esame gas cromatografico dei triacilgliceroli nell'accertamento della genuinità del burro. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**. v. 43, n. 2, p. 95-110. 1992.
42. LIN, S. W. & LAM, N. W. Analysis of lipids in palm oil by on-column capillary gas-liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science**. v. 32, n. 5, p. 185-189- 1994.

43. LIPP, M. Review of methods for the analysis of triglycerides in milk fat: application for studies of milk quality and adulteration. **Food Chemistry**. v. 54, p. 213-221. 1995.
44. LUND, P. Analysis of butterfat triglycerides by capillary gas chromatography. **Milchwissenschaft**. v. 43, n. 3, p. 159-161. 1988.
45. LYAPKOV, B. G. & MELAMED, D. B. Chromatographic methods for analysis of mixtures of individual triacylglycerols. **Biochemistry**. v. 45, n. 3, p. 306. 1990.
46. MANIOGUI, C.; GRETI, J.; BUGAUT, M.; GAUTHIER, S.; BEZARD, J. Determination of bovine butterfat triacylglycerols by reversed-phase liquid chromatography and gas chromatography. **Journal of Chromatography**. v. 543, p. 81-103. 1991.
47. MARĚS, P. & HUŠEK, P. Quantitative capillary gas-liquid chromatography of triglycerides on a fused-silica columns with a chemically bonded stationary phase. **Journal of Chromatography**. v. 350, p.87-103. 1985.
48. MARIANI, C.; VENTURINI, S.; FEDELI, E.; CONTARINI, G. Detection of refined animal and vegetable fats in adulteration of pure milkfat. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 71, n. 12, p. 1381-1384. 1994.
49. MATTER, L.; SCHENKER, D.; HUSMANN, H.; SCHOMBURG, G. Characterization of animal fats via the GC pattern of fame mixtures obtained by transesterification of the triglycerides. **Chromatographia**. v. 27, n. 1/2, p. 31-36. 1989.
50. MATTER, L. Determination of the animal of origin of dairy products and raw cooked meats by gc analysis of the fatty acid methyl esters (fame) obtained by transesterification. **Journal of High resolution Chromatography and Chromatography Communications**. v. 15, n. 8, p. 514-516. 1992.

51. MAYER, B. X. & LORBEER, E. Triacylglycerol mixture for testing capillary columns for high-temperature gas chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 758, p. 235-242. 1997.
52. MOLKENTIN, J. & PRECHT, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. **Chromatographia**. v. 39, n.5/6, p. 265-270. 1994.
53. MOLKENTIN, J. & PRECHT, D. Representative determination of the butyric acid content in european milk fats. **Milchwissenschaft**. v. 52, n. 2, p. 82-85. 1997.
54. MOLKENTIN, J. & PRECHT, D. Comparison of gas chromatographic methods for analysis of butyric acid in milk fat and fats containing milk fat. **Z Lebensmittel Untersuchung und Forschung A**. v. 206, p. 213-216. 1998.
55. MUUSE, B. G.; WERDMULLER, G. A.; GEERT, J. P.; KNEGT, J. Fatty Acid Profile of Dutch Butterfat. **Netherlands Milk Dairy Journal**. v. 40, p. 189-201. 1986.
56. NOTA, G.; NAVIGLIO, D.; ROMANO, R.; LUONGO, D.; DI MATTEO, M.; IMPROTA, C. Determinazione rapida dei grassi vegetali nel burro. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**. v. 72, n. 2, p. 73-75. 1995.
57. PALMIQUIST, D. L. & BEAULIEU, A. D. Differences between jersey and holstein cows in milk fat composition. **Journal of Dairy Science**. v. 75, n. 1, p. 292. 1992.
58. PALMIQUIST, D. L. & BEAULIEU, A. D. Feed and animal factors influencing milk fat composition. **Journal of Dairy Science**. v. 76, p. 1753-771. 1993.
59. PARODI, P. W. Methods for determining the authenticity of modified milk fats. **The Australian Journal of Dairy Technology**. n. 2, p. 12-17. 1972.
60. PHILLIPS, F. C.; ERDHAL, W. L.; SCHIMIDT, J. A.; PRIVETT, O. S. Quantitative analysis of triglycerides species of vegetable oils by high

performance liquid chromatography via a flame ionization detector. **Lipids**. v. 19, n. 11, p. 88-887. 1972.

61. POY, F.; VISANI, S.; TERROSI, F. Automatic injection in high-resolution gas chromatography: a programmed temperature vaporizer as a general purpose injection system. **Journal of Chromatography**. v. 217, p. 81-90. 1981.
62. PRECHT, D. & HEINE, K. 1986. Nachweis von modifiziertem milchfett mit der triglyceridanalyse. 2. fremdfettnachweis im milchfett mit hilfe von triglyceridkombinationen. **Milchwissenschaft**. v. 41, n. 7, p. 406- 410. 1986.
63. PRECHT, D. Control of milk fat by gas chromatographyc triglyceride analysis. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**. v. 43, p. 219-242. 1991.
64. PRECHT, D. Detection of foreign fat in Milk fat. **Z. Lebensmittel Untersuchung und Forschun**. v. 194, p. 1-8. 1992.
65. RENTERGHEM, R, Van, The triglyceride composition of belgian butter in view of EU controls on milk fat purity. **Milchwissenschaft**. v, 52, n. 2, p. 79-82, 1997.
66. RĚSANKA, T & MARĚS, P. Determination of plant triacylglycerols using capillary gas chromatography, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal of Chromatography**. v. 542, p. 145-159. 1991.
67. RIEDEL, G. **Controle Sanitário dos Alimentos**. São Paulo: Editora Loyola. 445 p. 1987.
68. SATO, T; KAWANO, S.; IWAMOTO, M. Detection of foreign fat adulteration of milk fat by near infrared spectroscopic method. **Journal of Dairy Science**. v. 73, p. 3408-3413. 1990.
69. SCHOMBURG, G.; HUSMANN, H.; BEHLAU, H.; SCHULTZ, F. Cold sample injection with either the split or splitless mode of temperature-

- programmed sample transfer. Design and testing of a new electrically heated construction for universal application of different modes of sampling. **Journal of Chromatography**. v. 279, p. 251-258. 1983.
70. SEWELL, P. A. High performance liquid chromatography. In **Lipid Analysis**. Ed. R. Hamilton. IRL Press. Oxford, UK. 1992.
71. SOLIMAN, M. A. & YOUNES, N. A. Adulterated butterfat fatty acid composition of triglycerides and 2-monoglycerides. **Journal Of American Oil Chemists' Society**. v. 63, n. 2, p. 248-250. 1986.
72. SUTTON, J. D. Altering milk composition by feeding. **Journal of Dairy Science**. v. 72, p. 2801-2814. 1989.
73. TIMMS, R. E. Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats. **Journal of Dairy Research**. v. 47, p. 295-303. 1980.
74. ULBERTH, F. & HENNINGER, M. Quantitation of *trans* fatty acids in milk fat spectroscopic and chromatographic methods. **Journal of Dairy Research**. v. 61, p. 517-527. 1994.
75. ULBERTH, F. & GABERNING, R. Quantitative aspects of triglyceride analysis by gas-liquid chromatography using a short metal capillary column. **Journal of Chromatography**. v. 773, p. 233-237. 1997.
76. VOGT, W.; JACOB, K.; OHNESORGE, A. B.; OBWEXER, H. W. **Journal of Chromatography**. v. 186, p. 197. 1979.
77. WOJTUSIK, M. J.; BROWN, P. R.; TURCOTTE, J. G. Separation and detection of triacylglycerols by high-performance liquid chromatography. **Chemical Review**. v. 89, p. 397. 1989.
78. YOUNES, N. A. & SOLIMAN, M. M. A. Adulteration of butterfat with other sources of fat. **Grasas y Aceites**. v. 37, n. 4, p. 200-203. 1986.
79. YOUNG, C. C. The interpretation of GLC triglyceride data for the determination of cocoa butter equivalents in chocolate: a new approach. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 61, n. 3, p. 576-581. 1984.

Capítulo 2

Análise de Triacilgliceróis por Cromatografia Gasosa usando Injeção com Programação de Temperatura

Capítulo 2 - Análise de Triacilgliceróis por Cromatografia Gasosa usando Injeção com Temperatura Programada

1 – Resumo

A análise de compostos de alto ponto de ebulição constitui um desafio quando se tem como objetivo analisá-los sem o artifício da derivação. As condições da técnica de injeção com temperatura programada foram avaliadas usando-se padrões de triacilgliceróis saturados com número de átomos de carbono de C30, C36, C42, C48 e C54. A amostra líquida foi introduzida no injetor em temperatura relativamente baixa e então vaporizada por um programa de aquecimento rápido. A saída do “split” foi fechada até que todos os componentes da amostra tenham sido vaporizados. Esta técnica de injeção mostrou ser altamente dependente da temperatura e modo de injeção. Embora, a quantidade dos triacilgliceróis em gordura seja alta, não foi obtida boa recuperação, de acordo com o fator de resposta, quando se trabalhou em “split”. Após vários testes obteve-se um método otimizado, com boa reprodutibilidade e resultados comparáveis com os encontrados na literatura. As condições estabelecidas foram temperatura inicial no injetor de 100°C, sendo aumentada para 380°C, na razão de 200°C/min, programação da coluna de 210 a 250°C a 20°C/min e de 250 a 360°C a 4°C/min. e detector a 400°C.

2 – Summary

Analysis of high boiling compounds represents a challenge when one intends to analyse them without derivation technique. Conditions for the technique of programmed temperature injection were evaluated using standard saturated triacylglycerols with carbon numbers of C30, C36, C42, C48 and C54. A liquid

sample was introduced into the injector at a relatively low temperature and then vaporised by a rapid heating program. The split exit was closed until all the sample components have vaporised. This injection technique was shown to be highly dependent on temperature and injection mode. Although the amount of triacylglycerols in fat is high, good recuperation was not obtained, in accordance with the response factor, when working on split. After several tests, an optimised method with good reproducibility and results comparable to those found in the literature was obtained. The established conditions were as follows: initial injector temperature of 100°C, and being increased to 380°C at a rate of 200°C/min, column program being from 210 to 250°C at 20°C/min and from 250 to 360°C at 4°C/min and detector at 400°C.

3 – Introdução

A análise por cromatografia gasosa começa com a introdução da amostra dentro da coluna, com ou sem a etapa de preparação da amostra. Muitos problemas práticos na técnica de injeção surgiram com o desenvolvimento da cromatografia gasosa capilar, e inúmeros modos de injeção têm sido desenvolvidos para tentar superar estes problemas (Janssen, 1998).

Segundo Poy (1982) a técnica de vaporização com temperatura programada possui largo campo de aplicação. O princípio básico desta técnica é introduzir a amostra líquida, a baixa temperatura, dentro do insersor da coluna capilar que está localizado antes da entrada da coluna usando uma seringa normal, e então, a temperatura do insersor é aumentada rapidamente, sendo os componentes da amostra vaporizados sucessivamente conforme as suas respectivas volatilidade. Os vapores da amostra são transferidos pelo gás de arraste para a coluna capilar, onde a separação se iniciará, dependendo da programação de temperatura do forno. A transferência dos vapores para a coluna pode ser efetuada por três diferentes caminhos, de acordo com os seguintes

modos de introdução: injeção em “splitless” a frio (introdução total da amostra), injeção com “split” do solvente a frio (eliminação do solvente), injeção em “split” com o vaporizador a quente ou frio.

De acordo com o conceito desta técnica, o insersor de pequeno diâmetro é usado com o objetivo de minimizar a discriminação de massa e o volume de purga. O tempo de residência do analito no insersor é muito curto, conseguindo-se deste modo que o componente seja transportado em temperatura mais baixa, diminuindo assim conseqüências danosas a compostos lábeis (Engewald et al., 1999).

O sistema de injeção em cromatografia gasosa capilar deve preencher dois requisitos (Janssen, 1998): a quantidade injetada não deve sobrecarregar a coluna e a largura da banda inicial da amostra injetada deve ser pequena a fim de não provocar alargamento dos picos de seus componentes durante a separação cromatográfica. A falha nestes requisitos acarreta redução na capacidade de resolução da coluna.

Uma boa técnica de injeção deve satisfazer os seguintes requisitos: permitir que se consiga uma ótima eficiência na separação dos compostos na coluna, permitir que seja injetada pequena e representativa quantidade de amostra com exatidão e repetibilidade; a composição da amostra não deve ser mudada; não deve haver discriminação baseada em diferenças no ponto de ebulição, polaridade, concentração ou instabilidade térmica/catalítica e aplicabilidade em análise de traços e amostras não diluídas (Schomburg et al., 1984).

Segundo Janssen (1998), foi Vogt que em 1979 descreveu pela primeira vez a introdução de amostra com programação de temperatura. Originalmente, Vogt desenvolveu a técnica como um método para a introdução de grandes volumes de amostra (acima de 250µl) em coluna capilar por cromatografia gasosa. Vogt introduziu a amostra dentro do insersor a uma razão controlada. A temperatura do insersor foi escolhida levemente abaixo do ponto de ebulição do

solvente. O solvente de baixo ponto de ebulição foi continuamente evaporado e descarregado através da saída do “split”. Baseado nesta idéia Poy et al.(1981), desenvolveram o injetor com vaporização programada de temperatura (PTV). Neste tipo de injeção a amostra é introduzida em um insersor a uma temperatura inicialmente baixa, e muitas das desvantagens da técnica de injeção a quente podem ser superadas. Por causa destas vantagens, a injeção PTV é agora considerada a técnica de injeção mais universal.

Poy et al. (1981), mostraram que o injetor com programação de temperatura era uma ferramenta ideal para introduzir amostras sem discriminação e evitar perdas dentro do cromatógrafo gasoso de alta resolução equipado com coluna capilar. As vantagens sobre outras técnicas de injeção incluem o uso de seringas padrão, independente de qualquer tipo e diâmetro de coluna capilar. O PTV não requer cuidados no manuseio da extremidade da entrada da coluna capilar e a pré-coluna é facilmente removível e recolocada. Um amostrador de líquidos automático pode ser usado, assim como a escolha do modo de injeção (“split”, “splitless” e “splitless” a quente).

Esta técnica é indicada para compostos sensíveis e de alto ponto de ebulição, onde os efeitos indesejáveis da injeção a quente são não superados apesar da otimização. Decomposição catalítica e fracionamento da amostra devido à agulha quente da seringa ou rearranjo térmico, e divisão não linear pela formação de gotas e aerosol, super aquecimento da amostra, ou aumento da pressão podem ocorrer de tal maneira que não poderão ser solucionados pelo ajuste de condições de amostragem. Em tais casos são utilizadas a injeção “split-splitless” com programação de temperatura (Hinshaw Jr., 1987).

Em análise quantitativa deve-se observar todas as etapas, com o objetivo de se minimizar os erros. Na etapa de preparação de amostra deve-se atentar para que não haja perdas e contaminação. No processo de separação dos componentes da amostra no cromatógrafo deve-se considerar erros como: discriminação, degradação térmica, etc. A resposta do detector deve ser linear em

relação à quantidade de amostra injetada. As medidas obtidas do detector, após integração são relacionadas à concentração de uma dada substância, através do método de determinação do fator de resposta. Esta medida corrige a concentração de uma dada substância conhecida com a quantidade observada (Collins et al., 1997).

Usando injetor com programação de temperatura Nota et al. (1995), desenvolveram um simples e rápido método para avaliar a presença de margarina em manteiga. Pesquisadores como Hinshaw Jr. & Seferovic (1986), Alonso (1993), Molkentin. & Precht. (1994), Lozada et al. (1995) e Van Lieshaut et al. (1995), também utilizaram esta técnica para análise de gordura de leite.

Señoráns et al. (1996), analisaram pela técnica conjugada cromatografia líquida–cromatografia gasosa os esteróis livres em óleos comestíveis, usando como interface do sistema um injetor com programação de temperatura.

Banfi & Bergna (1999) utilizaram injetor “split/splitless” com programação de temperatura, que permite injeção em temperaturas relativamente baixas, conseguindo assim resultados com exatidão e reprodutibilidade, provando que este tipo de injetor é uma eficiente ferramenta para avaliação de ácidos graxos, óleos essenciais e pesticidas em análise de alimentos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a injeção com programação de temperatura na análise de triacilgliceróis integrais.

4 - Material e Métodos

4.1 - Material

Cromatógrafo gasoso marca Varian 3400, equipado com coluna capilar de sílica fundida de 30m de comprimento por 0,32mm de diâmetro interno e

espessura de filme de 0,1 μm . Injetor Varian 7865 com programação de temperatura. Detector de ionização de chama.

Fase estacionária - 5% fenil 95% metilsilicone DB5HT (J&W), com temperatura limite de uso de 400°C.

Fase móvel – hidrogênio com velocidade linear de 2,1 cm/minuto.

Gases do detector - hidrogênio com fluxo de 30 mL/minuto, nitrogênio com fluxo de 30 mL/minuto, e ar sintético com fluxo de 300 mL/minuto.

Processamento dos dados - realizado por MS-DOS_6 – “Star Chromatography Workstation”.

Solução - padrão - 5 triacilgliceróis saturados C30 (tricaprilina - Sigma), C36 (trilaurina - Sigma), C42 (trimiristina - Sigma), C48 (tripalmitina - Sigma) e C54 (triestearina - Sigma), dissolvidos em hexano (Li Chrosolv - Meck) em concentrações semelhantes.

Volume injetado – 1 μl da solução padrão

4.2 - Métodos

4.2.1 - Testes preliminares

Para a otimização da injeção com programação de temperatura foram avaliados e testados vários métodos, em que empregaram-se várias condições no injetor, como: modo de injeção, diferentes tempos de isoterma, temperatura inicial e final e gradientes.

As condições de programação do injetor variaram da temperatura inicial de 60, 66, 70, 85, 90, 120 e 150°C, utilizando-se isoterma de 3 e 15 segundos e sem isoterma, até a temperatura final de 365, 370, 380 e 390°C, com rampas de subida de temperatura de 70, 100, 110, 120, 150, 200 e 250°C/minuto.

Na abertura da válvula para modo de injeção "split" ou "splitless" foram utilizadas várias condições, como: válvula aberta, durante 3 minutos, ou todo o tempo de análise (modo "split"), válvula fechada por 18, 30, 45, 51, 57, 66, 84, 96, 108, 120, 126; 138, 150, 165; 171; 180 segundos e "split" por 30 segundos, de 31 até 150 segundos "splitless" e após este tempo até o final da corrida "split".

4.3 – Determinação do fator de resposta

Para determinação do fator de resposta, uma solução de padrões foi preparada e injetada no cromatógrafo. A quantificação foi realizada por normalização interna, com obtenção da percentagem relativa de cada fração de triacilglicerol. O volume injetado foi de 1 µl da solução padrão.

5 – Resultados

5.1 – Problemas ocorridos nas condições cromatográficas testadas

Nas várias condições testadas observaram-se os seguintes problemas nos resultados:

Cromatograma apresentou picos pequenos

A injeção em "split" não mostrou ser adequada para estes tipos de compostos (alto ponto de ebulição) e condições do cromatógrafo, pois a não vaporização imediata da amostra no injetor resultou na perda de grande parte da amostra ainda em estado líquido pela saída do "split", mesmo quando se usa baixa razão de "split", em torno 1:25. O mesmo problema ocorrendo quando se usou modo "splitless" em período de tempo curto (18 segundos). Pode-se observar este problema na figura 1.

Subida exagerada da linha de base, no início e fim da corrida

Em temperatura baixa do injetor (60°C) e em todos os gradientes de temperatura usados ocorreu subida da linha de base no início da corrida, devido ao fato da programação do injetor não permitir uma subida balística da temperatura, proporcionando longo tempo para que o injetor alcançasse sua temperatura máxima, o que é sugerido nos trabalhos de Hinshaw Jr. & Seferovic (1986) e Alonso (1993). O exemplo desta ocorrência é mostrado na figura 2.

Grande discriminação do pico C54

A forte discriminação mostrada pelo triacilglicerol triestearina (C54) pode ser atribuída à retenção seletiva de solutos menos voláteis no injetor ou no começo da coluna causando, acumulação de resíduos não voláteis; decomposição do soluto com perda do triacilglicerol (C54) por degradação térmica. Conseqüentemente uma destas supostas ocorrências, seria capaz de concorrer para uma forte discriminação, efeito este atribuível a triacilglicerol de alto ponto de ebulição.

A discriminação do pico C54 também pode ser atribuída a uma das desvantagens do uso de injeção no modo “split”, que se refere ao fato de não se conseguir completa transferência de componente de alto ponto de ebulição, quando a válvula de saída do “split” é aberta (Hinshaw Jr. & Seferovic, 1986). O exemplo desta ocorrência é mostrado na figura 3.

Erro na programação de temperatura do injetor com variação na razão de subida da temperatura, mostrado pelo diagnóstico dos resultados da corrida

Quando se utilizou um gradiente de 250°C/minuto, ocorreu variação na variação na temperatura de subida do injetor, durante o período de 0,98 do minuto, mostrado pelo diagnóstico do resultado da corrida. Apesar do manual do cromatógrafo não definir um limite e o programa do computador aceitar temperaturas maiores de razão de elevação da temperatura, conclui-se que o injetor estava limitado ao uso de temperatura até 200°C.

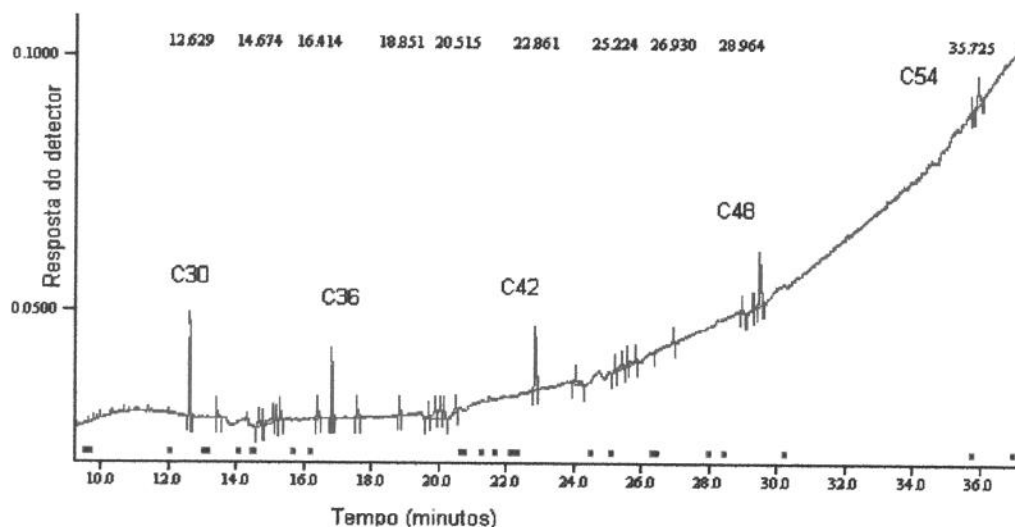


Figura 1 – Condições cromatográfica em que os picos apresentaram baixa resposta do detector

Injetor a 60°C (isoterma de 15 segundos) a 380°C, na razão de 100 e 150°C/min, modo "split" ou "splitless" por 30, 50 e 75 seg.

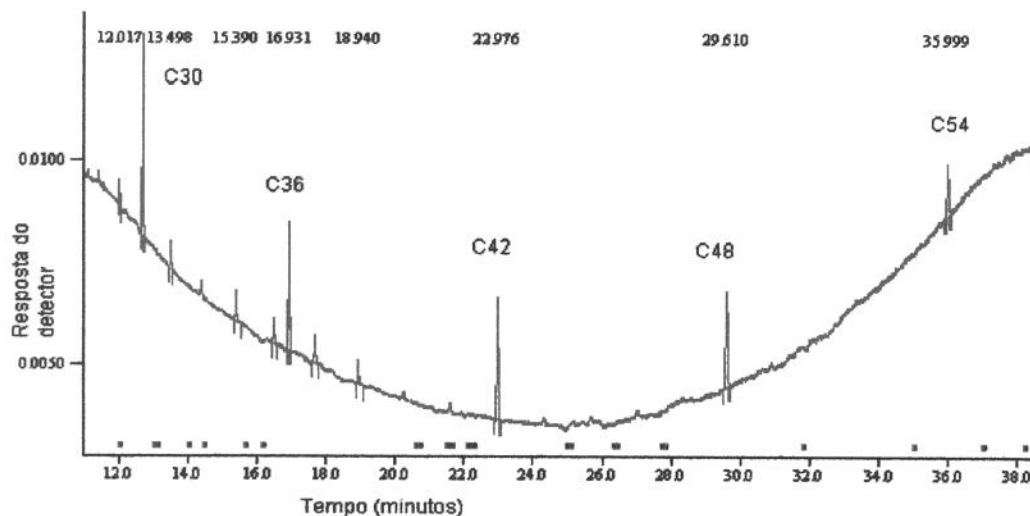


Figura 2 – Condições cromatográficas em que ocorreram subida da linha de base no início e fim da corrida

Injeção a 60- 370°C e 60-380°C, com gradientes de 70, 100, 150 e 200°C/min. Modo "splitless" por 30, 45, 51 segundos e 3 minutos.

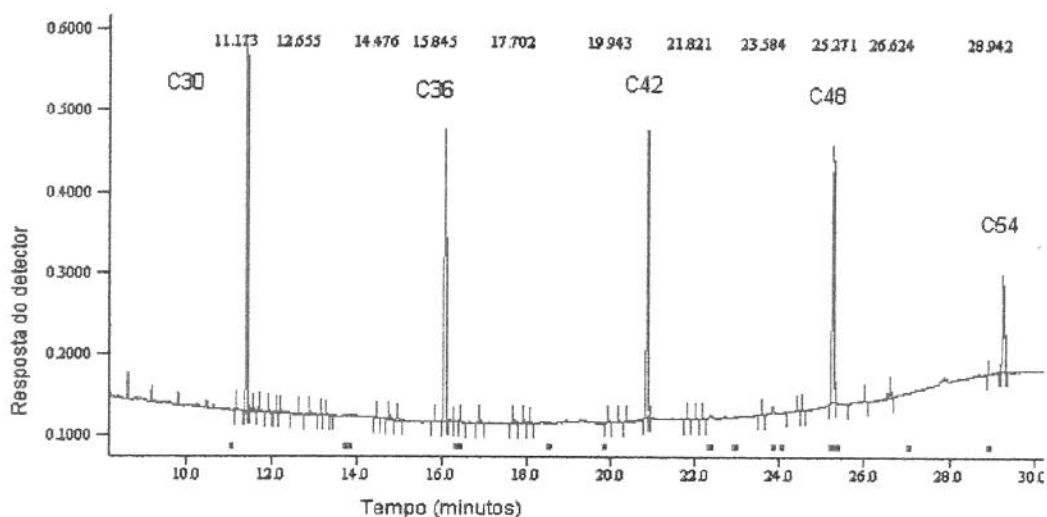


Figura 3 – Condições cromatográficas em que ocorreram discriminação dos picos, principalmente do C54.

Injetor 60-380°C e 100-380°C, em gradiente de 150 e 200°C/min. Modo “splitless” por 126, 138, 150 e 180 segundos,

5.2 - Melhores condições cromatográficas testadas

Após a análise dos dados obtidos optou-se por otimizar a condição cromatográfica, que apresentou a melhor recuperação do pico C54, a com fator de resposta de 1,18. Com injeção em “splitless” de 2 minutos fixou-se a temperatura inicial do injetor em 100°C, pois a diminuição da temperatura até 85°C ou o aumento até 120°C não melhorou os fatores de resposta. O tempo de resfriamento e nova estabilização do aparelho tornam-se longos à medida que a diferença entre a temperatura inicial do injetor e coluna são muito grandes. A fixação de isoterma de 15 segundos do injetor mostrou ser de grande importância na recuperação dos triacilgliceróis de peso molecular médio. A temperatura inicial da coluna foi fixada em 210°C, com isoterma de 1 minuto, sendo a finalidade da isoterma diminuir o efeito da falha do cromatógrafo de não possuir um mecanismo de elevação da temperatura do injetor de forma balística, como proposto por Alonso (1993), cuja temperatura inicial da coluna foi de 280°C, com isoterma de 1 minuto, e

temperatura inicial do injetor de 50°C, sendo aumentada em 15 segundos para 250°C.

A condição cromatográfica otimizada apresentou melhor fator de resposta, nas seguintes condições estabelecidas:

- válvula do injetor fechada por 2 minutos,
- temperatura inicial do injetor de 100°C, com isoterma de 15 segundos,
- razão de gradiente do injetor de 200°C/min até a temperatura final de 380°C,
- temperatura inicial da coluna de 210 com isoterma de 1 minuto
- razão de gradiente da coluna de 20°C/min até a temperatura de 250°C e razão de 4°C/min de 250°C até a temperatura final de 360°C.
- fatores de resposta em relação ao C42 foram 1,08 para o C30; 0,98 para o C36; 1,00 para o C42; 0,98 para o C48 e 1,18 para o C54.

Os triacilgliceróis que se apresentam mais próximos a 1,0 são os que possuem peso molecular médio e os que apresentaram maior discriminação são os de valores extremos. Os resultados estão em concordância com os fatores de resposta determinados por Alonso (1993) que usou injeção com programação de temperatura, Carelli & Cert (1993) injetor a quente (360°C), Lund (1988) e Kalo et al. (1986) com injetor "on column", que podem ser observados na tabela 1.

Segundo Poy (1982) bons resultados podem ser obtidos usando-se injeção no modo "splitless" com vaporização da amostra com programação de temperatura de forma balística ou programada. A programação balística não foi testada por ser esta uma limitação do cromatógrafo. Pela análise dos dados obtidos pode-se concluir que uma programação balística eliminaria a discriminação sofrida pela triestearina, o que pode ser constatado por trabalhos mais recentes que utilizam programação balística, com temperatura inicial do injetor mais baixa, visto que a temperatura inicial indicada é próxima ao ponto de

ebulição do solvente, e temperatura inicial da coluna maior que 200°C (Alonso, 1993; Hinshaw Jr. & Seferovic, 1986 e Molkentin & Precht, 1994).

Tabela 1 – Comparação dos fatores de resposta encontrados com os da literatura.

Triacilglicerol	Alonso	Carelli & Cert	Lund	Kalo et al.	Encontrados
C24	1,07		1,03		
C30	1,02		0,98	1,23	1,08
C36	0,98		0,97	1,00	0,98
C42	0,99	1,08±0,06	0,95	0,94	1,00
C48	1,04	1,05±0,09	0,98	0,94	0,98
C48:1	-	1,02±0,06	-	-	-
C54	1,12	-	1,15	1,21	1,18
C54:1	-	1,0	-	-	-
C54:2		0,89±0,05	-	-	-
C54:3	-	-	1,14	-	-
POO	-	0,99±0,06	-	-	-
POP	-	1,02±0,06	-	-	-

Fonte: Alonso (1993), Carelli & Cert (1993), Lund (1988), Kalo et al. (1986).

6 - Conclusão

A injeção com programação de temperatura e em “splitless” mostrou ser uma técnica adequada para ser utilizada em compostos com alta temperatura de

ebulição e com larga faixa de ponto de ebulição, conseguindo-se deste modo superar os efeitos negativos da injeção a quente, como a decomposição catalítica e o fracionamento da amostra devido ao calor na seringa.

A temperatura máxima de 380°C usada no injetor mostrou-se eficiente na eluição do padrão mais pesado, a triestearina (C54), mas a temperatura de 365°C não foi suficiente para a sua eluição.

A temperatura final do injetor de 390°C testada não mostrou ser mais eficiente na recuperação dos triacilgliceróis mais pesados, apresentando a mesma eficiência da temperatura de 380°C, que foi a escolhida por não estar tão próxima da temperatura limite do injetor.

A condição cromatográfica que resultou na obtenção de fator de resposta próximo a 1,0 em relação ao injetor com programação de temperatura, foi injeção em “splitless” por 2 minutos, temperatura inicial de 100°C, com isoterma de 15 segundos, até 380°C num gradiente de 200°C/minuto.

7 - Referências Bibliográficas

1. ALONSO, L. Capillary gas chromatography of some triglycerides in cheese using programmed-temperature injection. **Chromatographia**. v. 35, n. 9, p. 649-652. 1993.
2. BANFI, S. & BERGNA, M. Programmable temperature vaporizer (PTV) applied to the triglyceride analysis of milk fat. **High Resolution Chromatography**. v. 22, n. 2, p. 93-96. 1999.
3. CARELLI, A. A. & CERT, A. Comparative study of the determination of triacylglycerol in vegetable oils using chromatographic techniques. **Journal of Chromatography**. v. 630, p. 213-222. 1993.

4. COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a Métodos Cromatográficos**. Editora da Unicamp.Campinas. S.P. 270 p. 1997.
5. ENGEWALD, W.; TESKE, J.; EFER, J. Programmed temperature vaporizers-based large volume injection in capillary gas chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 842, n. 1/2, p. 143-161. 1999.
6. HINSHAW JR., J. V. & SEFEROVIC, W. Analysis of triglyceride by capillary gas chromatography with programmed-temperature injection. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**. v. 9, n. 12, p. 731-736. 1986.
7. HINSHAW JR., J. V. Modern inlets for capillary gas chromatography. **Journal of Chromatographic Science**. v. 25, n. 2, p. 49-55. 1987.
8. JANSSEN, H. Samples introduction techniques for capillary gas chromatography. Disponível em: <http://www.gerstelus.com/gerweb/GCinjPrimer.pdf>. 1998. Acesso em: 24/02/2000.
9. KALO, P.; VAARA, K.; ANTILA, M. Quantitative determination triacylglycerols separated on capillary columns according to acyl carbon number and level of unsaturation. **Journal of Chromatography**. v. 368, p. 145-151. 1986.
10. LOZADA, L.; DE LA FUENTE, M. A.; FONTECHA, J.; JUÁREZ, M. Considerations of the quantitative aspects of the determination of milkfat triglycerides with split PTV and on-column injection. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**. v. 18, p. 771-775. 1995.
11. LUND, P. Analysis of butterfat triglycerides by capillary gas chromatography. **Milchwissenschaft**. v 43, n. 3, p. 159-161. 1988.

12. MOKKENTIN, J. & PRECHT, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. **Chromatographia**. v. 39, n. 5/6, p. 265-270. 1994.
13. NOTA, G.; NAVIGLIO, D.; ROMANO, R.; LUONGO, D.; DI MATTEO, M.; IMPROTA, C. Determinazione rapida dei grassi vegetali nel burro. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**. v. 72, n. 2, p. 73-75. 1995.
14. POY, F.; VISANI, S.; TERROSI, F. Automatic injection in high-resolution gas chromatography: a programmed temperature vaporizer as a general purpose injection system. **Journal of Chromatography**. v. 217, p. 81-90. 1981.
15. POY, F. A new temperature programmed injection techniques for capillary GC: split mode with cold introduction and temperature programmed vaporization. **Chromatographia**. v. 16, p. 345-348. 1982.
16. SENORÁNS, F. J.; TABERA, J.; HERRAIZ, M. Rapid separation of free sterols in edible oils by on-line coupled reversed phase liquid chromatography. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. v. 44, p. 3189-3192. 1996.
17. SCHOMBURG, G.; HÄUSIG, U.; HUSMANN, H.; BEHLAU, H. Sampling onto capillary columns. Difficulties with various types of samples. A simple accessory to split injectors for avoidance of discrimination. **Chromatographia**. v. 19, p. 29-36. 1984.
18. VAN LIESHOUT, H. P. M.; JANSEN, H. G.; CRAMERS, C. A. Improvements in high-temperature PTV injection for HT-CGC. **American Laboratory**. v. 27, p. 40-44. 1995.

Capítulo 3

Determinação de Triacilgliceróis por Cromatografia Gasosa a Alta Temperatura

Capítulo 3 - Determinação de Triacilgliceróis por Cromatografia Gasosa a Alta Temperatura

1 – Resumo

O efeito da técnica de injeção, peso molecular da substância e programação de temperatura do injetor e coluna sobre os valores do fator de correção do peso ou fator de resposta foram estudados por um modelo de amostra que consistiu-se de quantidades semelhantes de triacilgliceróis saturados de 30 a 54 átomos de carbono. Para este estudo foi realizada a determinação dos triacilgliceróis por cromatografia gasosa usando alta temperatura, em coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária apolar de 5% fenilmetilsilicone de 30m de comprimento, com alta estabilidade térmica, que separa os triacilgliceróis de acordo com o número de átomos de carbono de seu acil grupo. A amostra líquida foi introduzida no injetor com programação de temperatura em temperatura relativamente baixa e então vaporizada por um programa de aquecimento rápido. A saída do “split” foi fechada até que todos os componentes da amostra tivessem sido vaporizados. Após a análise das condições testadas, obteve-se como condição que apresentou melhor separação e recuperação de padrões, a injeção em “splitless” por 2 minutos na temperatura inicial de 100°C, com isoterma de 15 segundos, até 380°C, com gradiente de 200°C/min, coluna de 210-250°C, a 20°C/min e de 250-360°C a 4°C/min e detector a 400°C. Este método otimizado apresentou boa reprodutibilidade, obtendo-se somente alguma discriminação, dentre os cinco (5) triacilgliceróis estudados, para a triesterina (C54), os resultados obtidos encontram-se em concordância com os citados na literatura.

2 – Summary

The effect of injection technique, substance's molecular weight, and injector and column temperature programming on weight correction factor values or response factor were studied using a sample model consisting of similar amounts of saturated triacylglycerols from 30 to 54 carbon atoms. For this study, determination of triacylglycerols was carried out by high temperature gas chromatography in a 5% phenylmethylsilicone apolar 30 m length capillary column, in stationary phase and with high thermal stability separating triacylglycerols in accordance with the carbon number of their acyl group. A liquid sample was introduced into the programmed temperature injector at a relatively low temperature and then vaporized by a rapid heating program. Split exit remains closed until all sample components have vaporized. After analysis of the tested conditions, the injection in splitless for 2 minutes at initial temperature of 100°C with isotherm of 15 seconds, up to 380°C, with gradient of 200°C/min, column of 210-250°C at 20°C/min and 250-360°C at 4°C/min and detector at 400°C showed to be the best separation and pattern recovery. This optimized method exhibited good reproducibility, wherein among the five triacylglycerols studied, only for triesterin (C54) some discrimination occurred, however, and the obtained results are in agreement with the ones in the literature.

3 – Introdução

Os principais requisitos para uma ótima análise qualitativa e quantitativa de misturas complexas podem ser resumidos como: adequada eficiência na separação; isto é, perfil do pico simétrico e fino; alta repetibilidade e reprodutibilidade nas medidas de tempo de retenção; alta precisão e exatidão na quantificação das medidas de área do pico, isto é, nenhuma discriminação de componentes por volatilidade, polaridade e concentração e mínima decomposição

térmica e catalítica de componentes sensíveis da amostra (Schomburg et al., 1977).

Schomburg et al em 1978, descreveram vários problemas relacionados com a análise por cromatografia gás-líquido em colunas capilares quando são usadas altas temperaturas. Ele afirma que a aplicação de cromatografia gasosa em misturas de compostos de alto peso molecular pode ser melhorada por vários meios, que não só a elevação da temperatura da coluna. Um destes é o uso de pequena quantidade de fase estacionária líquida, responsável pelo tempo de eluição, e longo comprimento da coluna. Em razão da alta permeabilidade da coluna capilar, colunas longas podem ser usadas mesmo com mais altos valores de razão de fluxo, o que é indicado para altas temperaturas de trabalho. O hidrogênio deve ser usado como gás de arraste, em razão de sua baixa viscosidade, o que acarreta eficiência de separação máxima. A fluxos mais altos a altura equivalente de um prato teórico é consideravelmente mais baixa quando se usa hidrogênio do que com nitrogênio ou argônio ou mesmo hélio, por razão de ser mais alta a constante de difusão do soluto na fase gasosa. Fase estacionária de baixa polaridade deve ser usada, por mostrar baixa interação intermolecular com o soluto. Em geral, as fases estacionárias polares não são eficientes para trabalhos em alta temperatura.

Em 1975 era conhecido que o fator de correção de peso (fw), definido como a razão do peso de um dado componente de uma amostra e a área relativa do pico correspondente é dependente, acima de um limite variável, do peso da amostra analisada. Isto é muito importante especialmente na análise de amostras contendo frações de triacilgliceróis de alto peso molecular. Assim, uma amostra pode ser corretamente analisada somente quando um número de parâmetros é cuidadosamente controlado e a dependência de uma calibração não linear é usada. Marès & Husek (1985) em aplicação analítica de determinação de lipídios, discute o uso da região não linear da curva de calibração e considera que a perda de substâncias durante a análise sob condições constantes é estável e

suficientemente reprodutível, relatando que a exatidão em análise quantitativa de todos os componentes da amostra por cromatografia gasosa requerem o conhecimento de todos os fatores que afetam a sua recuperação. Eles mostraram ainda, a dependência do fator de resposta não só com as condições analíticas, como: técnica de injeção, programa de temperatura, qualidade da coluna e fluxo de gás de arraste, e também com a quantidade e peso molecular da substância injetada.

Kalo, P. et al (1986), determinaram os fatores de resposta normalizados para o C36, em mistura de triacilgliceróis saturados de C30, C36, C42, C48 e C54, em duas colunas de 10m cada de fase estacionária imobilizada de SE-54, diâmetros internos de 0,2 mm e de 0,32 mm. A coluna de 0,2 mm mostrou maior resolução e a de 0,32 mm maior repetibilidade. Os fatores de resposta encontrados na coluna de 0,2 mm foram: C30 de 1,03; C36 de 1,00; C42 de 0,98; C48 de 0,95 e C54 de 1,09. Na coluna de 0,32 mm os fatores de resposta encontrados foram: C30 de 1,23; C36 de 1,00; C42 de 0,94; C48 de 0,94 e C54 de 1,21.

Segundo Lund (1988), a análise de triacilgliceróis deve ser realizada em colunas apolares de sílica fundida devido sua alta estabilidade térmica. Determinou-se a linearidade e o fator de resposta relativa ao C27 para os triacilgliceróis C24, C30, C36, C42, C48, C54 e C54:3, em coluna de sílica fundida coberta com CPSil 5CB (10 m x 0,32 mm), fluxo de hélio de 2,4 mL/min, e injetor "on-column", conseguindo linearidade entre 10 e 40 ng de triacilgliceróis, e fatores de resposta entre 0,95 e 1,15 respectivamente para o C42 e para o C54.

Alonso (1993) determinou o fator de resposta em relação ao C27, para uma mistura padrões de triacilgliceróis C24, C30, C36, C42, C48, C54 de grau de pureza maior que 99%. Os fatores de resposta para triacilgliceróis saturados de massa molecular média relativa apresentaram valor mais próximo de 1,0 do que aqueles com alto e baixo número de átomos de carbono. O menor fator de resposta foi para o C36 de 0,98 e o maior para o C54 (1,12). Também neste artigo Alonso determinou triacilgliceróis em queijo, usando coluna de sílica fundida de

TAP-CB com filme de 0,10 μm , temperatura inicial de 280°C até 350°C na razão de 3°C/min e injetor com programação de temperatura, cuja temperatura inicial foi de 50°C, sendo aumentado para 250°C em 15 segundos.

Carelli & Cert (1993), determinaram triacilgliceróis em óleos vegetais, usando detector de ionização de chama a 365°C e injetor "split" a 360°C (razão 1:30). A separação foi realizada numa coluna estabilizada para alta temperatura de sílica fundida revestida de alumínio (25 m x 0,25 mm), de fase estacionária metil-65%fenilsilicone de 0,1 μm . As condições de operação da coluna foram temperatura inicial de 350°C, então aumentada a 0,5°C/min para 360°C usando gás de arraste hélio a 130 kPa.

Segundo Ulberth & Gaberning (1997), o uso de colunas capilares de sílica fundida de alta inércia minimiza as perdas no processo cromatográfico, devido às perdas irreversíveis por adsorção dos analitos, principalmente os saturados. Usando coluna capilar de metal de 5 m x 0,53 coberta com HT-SimDist CB de 0,17 μm de filme, com programação da coluna de 80-190°C, a 50°C/min e de 190 a 350°C a 6°C/min, e injetor "cold on-column", obtiveram os fatores de resposta para uma mistura padrão de triacilgliceróis saturados de C24, C30, C36, C42, C48 e C54, normalizados para o C42, com menor fator de resposta de 0,96 para o C54 e maior de 1,14 para o C24.

A qualidade de colunas capilares foi pesquisada por Mayer & Lorbeer (1997) com uma mistura de triacilgliceróis a alta temperatura. Propriedades essenciais da coluna capilar, tais como a força de separação, seletividade, degradação catalítica, adsorção e sangramento foram determinados a altas temperaturas, mostrando que triacilgliceróis saturados eluem depois dos insaturados em colunas apolares, enquanto que em colunas de fase polar média há uma troca na ordem de eluição. Quanto a resolução demonstraram que é melhor conseguida em colunas apolares, a degradação catalítica é mais pronunciada em triacilgliceróis insaturados, o sangramento das colunas com

diferentes fases estacionárias apresentou semelhança e que a temperatura de eluição dos triacilgliceróis diminui com o aumento da polaridade da fase estacionária.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver método por cromatografia gasosa para análise de triacilgliceróis, utilizando injetor com programação de temperatura e coluna capilar estabilizada para alta temperatura.

4 - Material e Métodos

4.1 - Material

Cromatógrafo gasoso marca Varian 3400, equipado com coluna capilar de 30m de comprimento por 0,32mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,1 μ m. Injetor Varian 7865 com programação de temperatura. Detector de ionização de chama.

Fase estacionária - sílica fundida coberta com 5% fenil 95% metilsilicone DB5HT (J&W), resistente a alta temperatura.

Fase móvel – hidrogênio com velocidade linear de 2,1 cm/minuto.

Gases do detector - hidrogênio com fluxo de 30 mL/min, nitrogênio com fluxo de 30 mL/min e ar sintético com fluxo de 300mL/min.

Processamento dos dados - realizado por MS-DOS_6 – “Star Chromatography Workstation”.

Solução - padrão - 5 triacilgliceróis saturados C30 (tricaprilina - Sigma), C36 (trilaurina - Sigma), C42 (trimiristina - Sigma), C48 (tripalmitina - Sigma) e C54 (triestearina - Sigma), dissolvidos em hexano (Li Chrosolv - Merck) em concentrações semelhantes.

Volume injetado – 1 µl da solução padrão.

4.2 - Métodos

4.2.1 - Testes preliminares

Foram empregadas várias condições de isoterma e gradientes para o injetor e coluna.

As condições de programação do injetor variaram da temperatura inicial 60, 66, 70, 85, 90, 120 e 150°C, utilizando-se isoterma de 3 e 15 segundos e sem isoterma, até a temperatura final de 365, 370, 380 e 390°C, com rampas de subida da temperatura de 70, 100, 110, 120, 150, 200 e 250°C/minuto.

Na abertura da válvula para modo de injeção "split" ou "splitless" foram utilizadas várias condições, como: válvula aberta, durante 3 minutos, ou todo o tempo de análise (modo "split"), válvula fechada (modo "splitless") por 18, 30, 45, 51, 57, 66, 84, 96, 108, 120, 126; 138, 150, 165; 171; 180 segundos e "split" por 30 segundos, de 31 até 150 segundos "splitless" e após este tempo até o final da corrida "split".

As programações testadas na coluna variaram na primeira rampa de 80 a 250, 80 a 280, 100 a 250, 120 a 250, 130 a 250, 150 a 250, 180 a 250, 200 a 250, 210 a 250, 220 a 250 em gradientes que variaram de 10, 20, 25 e 30°C/minuto. A segunda faixa de temperatura da coluna variou de 250 a 350°C, 250 a 360°C, 280 a 360°C, nos gradientes de temperatura de 3, 4 e 5°C/minuto, ou numa só rampa de temperatura inicial de 66 e final de 360°C na razão de 20°C/min.

As temperaturas usadas no detector foram 380 e 400°C.

4.2.2 - Condições cromatográficas estabelecidas

Injetor com programação de temperatura

Temperatura inicial – 100°C com isoterma de 15 segundos, em seguida a temperatura foi elevada para 380°C, na razão de 200°C/min.

A injeção foi realizada no modo “splitless” pelo período de 2 minutos.

Coluna

Temperatura inicial da coluna de 210°C, com isoterma de 1 minuto, e de 210 a 250°C na razão de 20°C/min, isoterma de 1 minuto e posterior aumento para 360°C na razão de 4°C/min.

Detector

A temperatura utilizada no detector foi de 400°C.

Fase móvel

O gás de arraste usado foi o hidrogênio, com velocidade linear de 2,1 cm/minuto.

4.3 – Determinação do fator de resposta

Para determinação do fator de resposta, uma solução de padrões de 5 triacilgliceróis saturados foi preparada e 1 µl foi injetada no cromatógrafo. A quantificação foi realizada por normalização interna, com obtenção da percentagem relativa de cada fração de triacilglicerol.

5 - Resultados

A separação de triacilgliceróis tem evoluído com o emprego de colunas capilares longas, como a que foi utilizada de 30 m, apesar de demandar maior tempo de análise. A utilização de fase estacionária apolar com maior estabilidade térmica permitiu a separação e recuperação adequada dos triacilgliceróis pouco voláteis.

Grande discriminação dos triacilgliceróis foi observada quando a temperatura inicial do injetor foi de 60 e 66°C associada a uma rampa de subida de 70 e 100°C/min, apresentando fatores de resposta bastante altos, como por exemplo, para o C36 de 1,57; C42 de 1,36; C48 de 1,51 e C54 de 2,02, todos em relação ao C30. A fixação da temperatura final do injetor em 370°C, não diminuiu a discriminação apresentada no pico C54.

O emprego da programação do injetor de 60°C, com isoterma de 15 segundos, até 380°C, na razão de 120°C e 250°C/min, acarretou erros na temperatura, isto é, o injetor não apresentou estabilidade da temperatura durante respectivamente 183,6 e 57,6 segundos, conforme mostrado no diagnóstico dos resultados do programa do computador.

Em condições em que a temperatura inicial da coluna foi de 66 e 80°C e o gradiente de temperatura do injetor alto, ocorreu subida da linha de base no início e fim da corrida. A diminuição do gradiente do injetor não apresentou melhora neste efeito.

O uso da condição em que a válvula permaneceu aberta durante todo o tempo de análise, em modo "split" no injetor, usando as seguintes programações na coluna na primeira rampa de 80 a 250°C (20 e 30°C/min), 80 a 280°C (20 e 30°C/min), e segunda rampa de 250 a 360 e 280 a 360, com temperatura final da coluna a 360°C, usando os gradientes de 3, 4 e 5°C/min, ocorreu uma baixa resposta do detector para os todos os padrões de triacilgliceróis.

A programação da coluna com primeira rampa de 80 a 250°C, em gradiente de 20°C/min e uma segunda rampa de temperatura de 250 a 360°C, em gradiente de 5°C/min, mostrou fator de resposta para o C54 de 2,24, enquanto os demais picos obtiveram um fator de resposta menor que 1,0.

Segundo Marš & Hušek (1985), a diferença na temperatura de eluição dos triacilgliceróis diminui com o aumento do peso molecular, assim como, sob condições analíticas constantes a eficiência na separação do homólogo mais baixo para o mais alto, sendo o fator de resposta para triacilgliceróis na faixa de C30 a C54, independentes da quantidade analisada e do fluxo de gás de arraste.

A discriminação mostrada pelo triacilglicerol triestearina (C54) nos vários métodos testados pode ser atribuída à retenção seletiva de solutos menos voláteis no injetor ou no começo da coluna, causando acumulação de resíduos não voláteis e/ou decomposição do soluto com perda do triacilglicerol (C54) por degradação térmica. Conseqüentemente, uma destas supostas ocorrências seria capaz de concorrer para uma discriminação, efeito este atribuível a triacilglicerol de alto ponto de ebulição (Hinshaw, J & Seferovic, 1986).

Após a análise dos dados obtidos optou-se otimizar o método que apresentou a melhor recuperação do pico C54.

Fixou-se a temperatura inicial do injetor em 100°C, pois a fixação de temperatura inicial de 90 e 95°C, acarretava um tempo muito longo de resfriamento e nova estabilização do aparelho, visto ser a diferença entre a temperatura inicial do injetor e coluna muito grande. A fixação de isoterma de 15 segundos na temperatura inicial do injetor mostrou ser de grande importância na recuperação dos triacilgliceróis de peso molecular médio.

A temperatura inicial da coluna foi fixada em 210°C, com isoterma de 1 minuto, a fim de proporcionar um intervalo de tempo necessário para a que a temperatura do injetor alcançasse a temperatura da coluna, diminuindo assim a

falha do cromatógrafo de não possuir um mecanismo de elevação da temperatura do injetor de forma balística, como proposto por Alonso (1993), que usou temperatura inicial da coluna de 280°C, com isoterma de 1 minuto, e temperatura inicial do injetor de 50°C, sendo aumentada em 15 segundos para 250°C. Com o uso de temperatura inicial da coluna mais alta, pode ser conseguida uma diminuição no tempo de análise.

Com as condições cromatográficas estabelecidas, segundo item 4.2.2 foi realizado o cálculo do fator de resposta dos triacilgliceróis saturados de massa molecular média, que são mostrados na tabela 1. O cromatograma da mistura de padrões é mostrado na Figura 1.

Tabela 1 – Fator de resposta relativo de triacilgliceróis

Triacilglicerol	Fator de Resposta
C30 - tricaprilina	1,08
C36 - trilaurina	0,98
C42 - trimiristina	1,00
C48 - tripalmitina	0,98
C54 - triestearina	1,18

Observando-se a tabela 1, pode-se notar que os triacilgliceróis que se apresentam mais próximos a 1,0 são os que possuem peso molecular médio e os que apresentaram maior discriminações são os de valores extremos. Os resultados estão em concordância com os fatores de resposta determinados por Alonso (1993), Carelli & Cert (1993), Lund (1988) e Kalo et al.(1986).

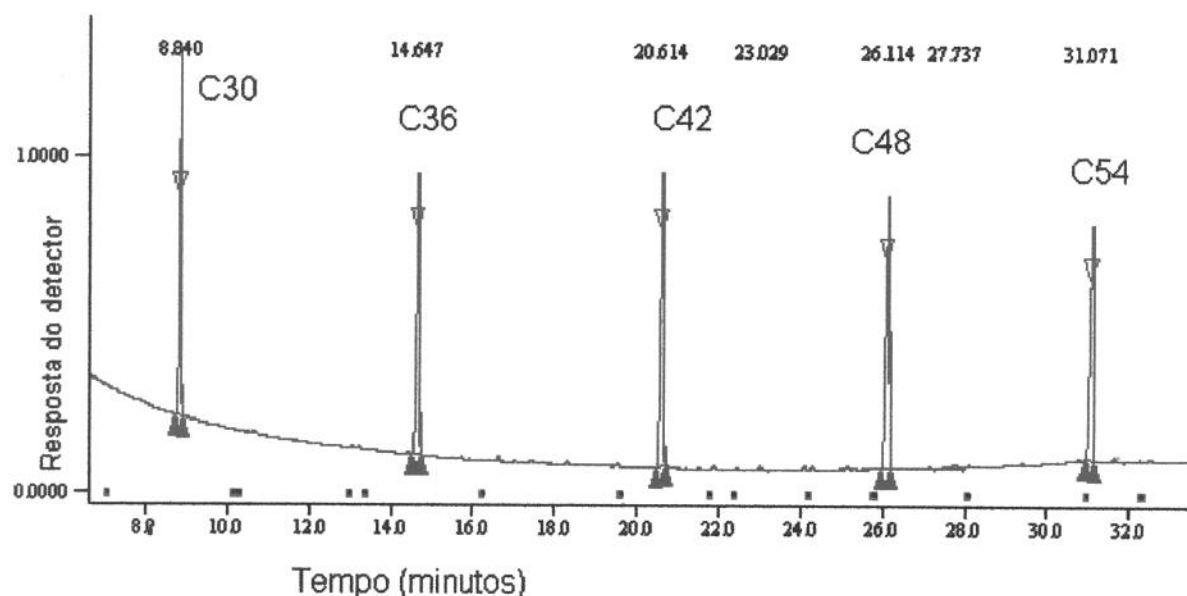


Figura 1 – Cromatograma de padrões de triacilgliceróis saturados

Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-100-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção "splitless"-2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min

6 - Conclusão

O uso de programação de temperatura no injetor e coluna longa de sílica fundida coberta com fase estacionária de 95% metilfenilsilicone, de alta estabilidade térmica, é uma técnica útil para análise de misturas de triacilgliceróis de alto ponto de ebulição

A utilização da temperatura inicial da coluna a, 210 °C, com duas rampas de aquecimento, possibilitaram a obtenção de valores de resposta próximos a 1,0 para todos os padrões de triacilgliceróis, inclusive para o C54 (fator de resposta = 1,18), além de diminuir sensivelmente o tempo total de análise.

A condição cromatográfica que resultou na obtenção de fator de resposta próximo a 1,0 foi de injetor com injeção em "splitless" por 2 minutos, temperatura inicial de 100°C, com isoterma de 15 segundos, até 380°C em gradiente de 200°C/min; coluna a 210 até 250°C a 20°C/min e de 250 até 360°C a 4°C/min; detector a 400°C.

7 - Referências Bibliográficas

- 1 - ALONSO, L. Capillary gas chromatography of some triglycerides in cheese using programmed-temperature injection. **Chromatographia**. v. 35, n. 9, p. 649-652. 1993.
- 2 - CARELLI, A. A. & CERT, A. Comparative study of the determination of triacylglycerol in vegetable oils using chromatographic techniques. **Journal of Chromatography**. v. 630, p.213-222. 1993.
- 3 - HINSHAW JR., J. V. & SEFEROVIC, W. Analysis of triglycerides by capillary gas chromatography with programmed temperature injection. **Journal of High resolution Chromatography & Chromatography Communications**. v. 9, n. 12, p. 731-736. 1986.
- 4 - KALO, P.; VAARA, K.; ANTILA, M. Quantitative determination triacylglycerols separated on capillary columns according to acyl carbon number and level of unsaturation. **Journal of Chromatography**. v. 368, p.145-151. 1986.
- 5 - LUND, P. Analysis of butterfat triglycerides by capillary gas chromatography. **Milchwissenschaft**. v. 43, n. 3, p. 159-161. 1988.
- 6 - MARĚS, P. & HUŠEK, P. Quantitative capillary gas-liquid chromatography of triglycerides on a fused-silica columns with a chemically bonded stationary phase. **Journal of Chromatography**. v. 350, p.87-103. 1985.

- 7 - MAYER, B. X. & LORBEER, E. Triacylglycerol Mixture for Testing Capillary Columns for High-Temperature Gas Chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 758, p. 235-242. 1997.
- 8 - SCHOMBURG, G.; BEHLAU, H.; DIELMANN, R.; WEEKE, F.; HUSMANN, H. Sampling Techniques in Capillary Gas Chromatography. **Journal of Chromatography**. v. 142, p. 87-102. 1977.
- 9 - SCHOMBURG, G ; DIELMANN, R.; BORWITZKY, H.; HUSMANN, H. Capillary Columns Gas Chromatography of Compounds of Low Volatility. Temperature Stability Liquids on Various Glass Surfaces. **Journal of Chromatography**. v. 167, p. 337-354. 1978.
- 10 - ULBERTH, F. & GABERNING, R Quantitative Aspects of Triglyceride Analysis by Gas-Liquid Chromatography using a Short Metal Capillary Column. **Journal of Chromatography**. v. 773, p.233-237. 1997.

Capítulo 4

Composição de Triacilgliceróis em Óleos Vegetais

Capítulo 4 - Composição de Triacilgliceróis em Óleos Vegetais

1 – Resumo

A análise de óleos comerciais de soja, milho e girassol foi realizada através da determinação da composição de triacilgliceróis por cromatografia gasosa a alta temperatura. Os triacilgliceróis dos óleos vegetais, após separação em fase sólida, foram injetados em coluna capilar de fase estacionária de 95% metilfenilsilicone, usando a programação de 210 a 250°C, a 20°C/minuto e de 250 a 360°C a 4°C/minuto. A injeção foi em “splitless” em injetor com programação de temperatura, programado de 100 (isoterma de 15 segundos) a 380°C, na razão de 200°C/minuto. Foram identificados e quantificados os triacilgliceróis C36, C38, C48, C50, C52, C54 e C56. As análises estatísticas de variância e teste de Tukey mostraram que existem diferenças significativas entre os óleos de soja e milho e entre milho e girassol, relativamente aos triacilgliceróis C50, C52 e C54, e entre os óleos de soja e girassol, aos triacilgliceróis C38, C50, C52 e C54.

2 – Summary

Analysis of commercial soybean, corn and sunflower oils was effectuated by determining their triacylglycerols compositions by high temperature gas chromatography. After separation in solid phase, triacylglycerols of vegetal oils were injected into a 95% methylphenyl silicone capillary column with of a stationary phase using a programme of 210 to 250°C, at 20°C/minute followed by 4°C/minute from 250 to 360°C. A splitless injection in injector with a temperature program of 100 (isotherm of 15 seconds) at 380°C at a rate of 200°C/minute was used. C36, C38, C48, C50, C52, C54 and C56 triacylglycerols were identified and quantified. Statistical analysis of variance and Tukey's test showed the existence of significant

differences between the soybean and corn oils, and corn and sunflower oils, with respect to C50, C52 and C54 triacylglycerols; and between soybean and sunflower oils relative to C38, C50, C52 e C54 triacylglycerols.

3 – Introdução

A composição de uma gordura é determinada pela distribuição de ácidos graxos na molécula de triacilglicerol. A composição química de uma gordura e suas propriedades físicas está intimamente ligada. Assim, a análise dos gliceróis pode proporcionar informação sobre as propriedades físicas, tais como o comportamento do ponto de fusão e cristalização (Juniens, 1968).

As distribuições dos triacilgliceróis de alguns óleos vegetais foram descritas por Holman (1972) e podem ser vistas na tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos triacilgliceróis em óleos vegetais (%).

Número de Carbonos	Soja	Girassol	Milho
46	-	-	Traços
48	1,6	0,1	Traços
50	3,3	2,0	3,3
52	27,0	17,5	30,2
54	68,1	81,4	66,5
56	-	-	1,0
58	-	-	0,1

Fonte – Holman (1972).

A caracterização de triacilgliceróis de produtos de origem vegetal ou animal pode ser realizada pela determinação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos de seus triacilgliceróis depois da conversão por simples procedimento de

transesterificação e quantificação teórica (Matter et al., 1989), análise de triacilgliceróis integrais, triacilgliceróis hidrogenados (Traitler & Prévôt, 1981), triacilgliceróis que sofreram tratamento com ozônio (Geraert & De Schepper, 1982) e triacilgliceróis tratados com bromo (Geraert & De Schepper, 1983), usando cromatografia líquida de alta resolução, cromatografia gasosa e cromatografia com fluido super crítico.

A determinação dos triacilgliceróis usando cromatografia líquida de alta performance em fase reversa e quantificação com detector de índice de refração, que separa os triacilgliceróis de acordo com o número equivalente de átomos de carbono (ECN) e de acordo com as frações moleculares distintas que diferem principalmente pelo grau de insaturação, foi realizada por Peterson et al. (1981), Geeraert & De Schepper (1983), Cortesi et al. (1990) e Carelli & Cert (1993). Phillips et al. (1984), também utilizaram a mesma técnica, porém com coluna Zorbax e detector de ionização de chama (FID). Laakso & Kallio (1993) usou HPLC com coluna impregnada com prata e detector "light scattering".

Geeraert & Sandra (1984), analisaram óleo de soja por cromatografia gasosa usando coluna apolar de 17m x 0,32mm coberta com 0,16µm de polímero metilfenilsilicone. A temperatura do forno foi programada para 340°C, com 24 segundos de isoterma, depois para 350°C numa razão de 2°C/minuto, usando hidrogênio como gás de arraste e o injetor "on-column". O cromatograma conseguido apresentou três partes, nomeadas de regiões CN50, CN52 e CN54, observando ainda que mesmo sob condições ótimas, não se consegue obter estrutura fina por tratar-se de produto altamente insaturado.

Geeraert & Sandra (1985), analisaram vários óleos vegetais usando cromatografia gasosa capilar. Comparando a performance de colunas polares e apolares, verificou que em colunas polares consegue-se separações de acordo com número de ácidos graxos na molécula do triacilglicerol, porém a análise requer um tempo longo. Em fase apolar o tempo de análise é rápido, e os triacilgliceróis são separados pelo comprimento da cadeia e pressão de vapor. É conseguida a separação de acordo com o número de insaturações do ácido graxo

devido à remarcável diferença da pressão de vapor entre a pressão de vapor de ácidos graxos saturados e insaturados. A pressão de vapor entre os diferentes ácidos graxos insaturados é muito pequena e não é possível a separação entre eles.

Řezanka (1991) analisou qualitativa e quantitativamente triacilgliceróis de óleos e gorduras de plantas, por meio de cromatografia gasosa capilar com coluna polarizável (CGC), cromatografia líquida de alta performance com fase reversa C₁₈ (CLAE-FR) e espectrometria de massa por ionização química de desorção (ES-ICD). As técnicas CLAE-FR ou CGC foram eficientes na análise qualitativa de espécies moleculares de triacilgliceróis através de seu número de carbono equivalente e comprimento de cadeia equivalente. Óleos com poucos números de dupla ligação podem ser determinados sem nenhum problema por meio de CGC, CLAE-FR e ES-ICD. A determinação por meio de CGC e CLAE-FR não é eficiente com óleos que apresentem uma distribuição complexa de comprimento de cadeia e alto índice de insaturação.

Precht (1992) usou duas colunas de vidro de 80cm x 3mm de diâmetro interno para determinação de triacilgliceróis em óleos vegetais, empacotadas com OV-1 sobre Chromapak Q de 100/120 mesh. As colunas foram pré-tratadas por silanização, usando dimetilclorosilano seguida de lavagem com tolueno e metanol. Na condição de operação de rotina usou FID e injetor a 370°C, com programação do forno de 210°C por 1 minuto, e então aumentado para 360°C a 6°C/minuto. A coluna permaneceu então a 355°C por 5 minutos. O gás de arraste usado foi nitrogênio num fluxo de 75mL/minuto. Precht afirma que a injeção a quente produz melhores resultados quantitativos para os triacilgliceróis de alto ponto de ebulição.

Lin & Lam (1994) desenvolveram um método para análise de lipídios em óleos usando cromatografia gasosa capilar e injetor "on-column". Usaram para isto derivação dos triacilgliceróis com N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e trimetictlorosilano (TMS), conseguindo uma técnica rápida e quantitativa para separação de uma larga faixa de lipídios.

A análise por cromatografia gasosa capilar de óleos vegetais foi realizada por Hinshaw Jr. & Seferovic (1986), qualitativamente e quantitativamente usando coluna revestida com 65% metilfenil silicone e injeção com temperatura programada, conseguindo uma análise rápida quando foi usada elevada temperatura inicial na coluna e temperatura fria no injetor. Antoniosi Filho et al (1993) usaram a mesma coluna, para analisar adulteração de óleo de oliva com óleo de soja, usando, porém injeção a quente, não conseguindo boa resolução de triacilgliceróis de baixa concentração.

O objetivo deste trabalho foi determinar o perfil qualitativo e quantitativo de triacilgliceróis em óleos vegetais comerciais e comparar as diferenças entre eles.

4 - Material e Métodos

4.1 - Material

Foram adquiridos no comércio de Campinas amostras de óleos de marcas diferentes, sendo 4 de óleo de sojas, 3 de óleo de milho e 3 de óleo de girassol e 3 lotes diferentes para cada marca dos respectivos óleos. Somente um lote no óleo de soja da marca C foi analisado, pois o mesmo não foi mais encontrado no mercado. A injeção de cada amostra foi realizada em triplicata.

4.2 – Separação dos triacilgliceróis

A separação dos componentes da gordura foi realizada por extração em fase sólida, de acordo com Lercker et al. (1992).

Numa coluna de vidro adicionou-se 500mg de sílica 60 (Merck) e em seguida cerca de 1,0 cm de sulfato de sódio. O acondicionamento da coluna foi realizada através da passagem pela coluna de 3 mL de hexano. Cerca de 0,02g de gordura foi dissolvida em hexano e carregada no topo da coluna. Os triacilgliceróis foram eluídos por adição de 3 mL de hexano, seguida de 3mL de solução hexano:éter

etílico (8:2). A solução eluída da coluna foi levada à secura em banho-maria e diluída em 10 mL de hexano com grau de pureza cromatográfica. Uma amostra de 1,0 µL foi injetada no cromatógrafo.

4.3. Método cromatográfico

4.3.1 – Equipamento

Cromatógrafo gasoso marca Varian 3400, equipado com coluna capilar de sílica fundida de 30m de comprimento por 0,32 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,1 µm. Injetor Varian 7865 com programação de temperatura. Detector de ionização de chama.

Processamento dos dados realizado por MS-DOS_6 – “Star Chromatography Workstation”.

4.3.2 - Condições cromatográficas

Injetor com programação de temperatura - Temperatura inicial – 100°C com isoterma de 15 segundos, em seguida a temperatura foi elevada para 380°C, na razão de 200°C/minuto.

A injeção foi realizada no modo “splitless” pelo período de 2 minutos. No período em “split” a razão foi de 1:25.

Coluna – Fase estacionária - 5% fenil 95% metilsilicone DB5HT (J&W), com temperatura limite de uso de 400°C.

Temperatura inicial da coluna de 210°C, com isoterma de 1 minuto, logo depois a temperatura foi aumentada para 250°C na razão de 20°C/minuto, isoterma de 1 minuto e posterior aumento para 360°C na razão de 4°C/minuto.

Detector – A temperatura usada foi de 400°C.

Gases - hidrogênio com fluxo de 30 mL/minuto, nitrogênio com fluxo de 30 mL/minuto, e ar sintético com fluxo de 300 mL/minuto.

Fase Móvel - Hidrogênio foi usado como gás de arraste com velocidade linear de 2,1 cm/minuto.

4.3.3 – Análise qualitativa e quantitativa.

A identificação foi realizada através dos procedimentos:

- Comparação dos tempos de retenção dos componentes da amostra (t_r) e do tempo de retenção corrigido (t_r') de padrões.
- Técnica de co-eluição (spiking) de padrões junto com amostra.

A quantificação foi realizada por normalização interna, com obtenção da porcentagem relativa de cada fração de triacilgliceróis.

- Para determinação do fator de resposta, uma solução de padrões de 5 triacilgliceróis saturados C30 (tricaprilina - Sigma), C36 (trilaurina - Sigma), C42 (trimiristina - Sigma), C48 (tripalmitina - Sigma) e C54 (triestearina - Sigma) de concentrações semelhantes foi preparada e injetada no cromatógrafo, nas mesmas condições cromatográficas de análise das amostras de óleo.

4.4 – Análise estatística

Nos resultados da análise foram realizadas comparações múltiplas usando a técnica de análise de variância ANOVA e teste de Tukey, em um nível de significância de 5%. A variação dos dados foi calculada em função do erro relativo ao máximo.

5. Resultados

A composição dos óleos vegetais estudados estão apresentadas nas tabelas 2, 3 e 4.

Observando-se a tabela 2, verifica-se que os principais triacilgliceróis do óleo de soja são: C38, C50, C52, C54 e C56, sendo o C54 o que apresenta maior

quantidade. Eles podem ser encontrados numa faixa que varia para o C38 de 0,26-3,47%, o C50 de 3,55-7,3%, o C52 de 31,09-40,7%, o C54 de 48,5-63,8% e o C56 de 0,37-1,43%, sendo que os triacilgliceróis C36 e C48, não foram eluídos em quantidade suficiente no lote 1 das marcas A, B e C, e assim não foram integrados. No óleo de girassol (tabela 3) o C54 também está em maior quantidade e destacam-se os triacilgliceróis C38, que apresentou uma concentração de 0,25-4,5%; o C50 de 1,35-2,6%; o C52 de 18,5-24,8%, o C54 de 69,1-78,7% e o C56 de 0,43-1,37%, sendo que os triacilgliceróis C36 e C48, não foram eluídos em quantidade suficiente no lote 1 de todas as marcas analisadas, e assim não foram integrados. Os resultados do óleo de milho (tabela 4) mostram que o C54 está em maior concentração e podemos destacar os triacilgliceróis C36 que apresentaram uma concentração de 0,11-0,98%, o C38 de 0,27-2,5%; o C48 de 0,46-1,04%; o C50 de 4,6-7,3%; o C52 de 32,9-41,0%; o C54 de 47,5-59,9% e o C56 de 0,55-1,46%.

Pode-se observar nas tabelas 2, 3 e 4, que a variação da concentração do triacilglicerol C38 nos lotes de óleo de soja foi de 92,5%, nos de óleo de girassol de 94,4% e nos de óleo de milho de 89,2%. A variação da concentração do triacilglicerol C50 nos lotes de óleo de soja foi de 51,4%, nos de óleo de girassol de 48,1% e nos de óleo de milho de 37,0%. A variação da concentração do triacilglicerol C52 nos lotes de óleo de soja foi de 23,6%, nos de óleo de girassol de 25,4% e nos de óleo de milho de 19,8%. A variação da concentração do triacilglicerol C54 nos lotes de óleo de soja foi de 24,0%, nos de óleo de girassol de 12,2% e nos de óleo de milho de 20,7%.

Resultados semelhantes foram reportados por Precht (1992), que determinou no óleo de soja concentração menor que 0,2% nos triacilgliceróis C26 a C48, com exceção do C32 que não foi identificado, e 3,11% de C50, 25,24% de C52 e 71,03 de C54.

Tabela 2 – Composição percentual de triacilgliceróis do óleo de soja comercial.

Marca	Triacilglicerol						
	C36	C38	C48	C50	C52	C54	C56
	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp
A lote 1	0±0	0,55±0,04	0±0	3,62±0,06	31,09±0,02	63,3±0,1	1,43±0,05
A lote 2	1,00±0,05	4,0±0,1	0,20±0,01	5,2±0,2	36,7±0,9	52,2±1,1	0,46±0,02
A lote 3	1,24±0,02	3,47±0,07	0,27±0,03	5,9±0,5	37±1	51,4±1,6	0,47±0,01
B lote 1	0±0	0,26±0,01	0±0	3,55±0,02	31,2±0,2	63,8±0,2	1,18±0,01
B lote 2	0,17±0,01	0,52±0,03	0,18±0,02	5,6±0,4	38,0±0,9	55,0±1,2	0,59±0,03
B lote 3	0,8±0,2	2,3±0,1	0,25±0,06	6,83±0,06	40,7±0,4	48,74±0,07	0,37±0,04
C lote1	0±0	0,28±0	0±0	3,95±0,08	32,1±0,4	62,3±0,5	1,40±0,01
D lote 1	0,86±0,02	2,17±0,08	0,33±0,02	7,3±0,5	40,4±1,2	48,5±1,5	0,45±0,01
D lote 2	0,7±0,2	2,1±0,2	0,25±0,04	6,9±0,4	40,0±0,6	49,8±1,3	0,44±0,01
D lote 3	0,70±0,01	1,70±0,05	0,32±0,02	6,57±0,07	39,2±0,2	51,1±0,2	0,48±0,01

M±dp = Média entre 3 injeções ± desvio padrão

Os resultados encontrados para o óleo de girassol podem ser comparáveis aos descritos por Precht (1992) e Carelli & Cert (1993) que foram respectivamente de 1,98% e 0,25% de C50, 17,06% e 21,06% de C52 e 77,28 e 78,64 de C54.

Tabela 3 – Composição percentual de triacilgliceróis do óleo de girassol comercial.

Marca	Triacilglicerol						
Lote	C36	C38	C48	C50	C52	C54	C56
	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp
A lote 1	0±0	0,25±0,02	0±0	1,6±0,1	19,0±0,3	77,7±0,3	1,37±0,02
A lote 2	0,37±0,01	2,0±0,2	0,18±0,01	2,4±0,2	24,2±0,3	70,4±0,4	0,43±0,0
A lote 3	0,35±0,03	1,82±0,05	0,17±0,02	2,6±0,2	24,8±0,7	69,6±0,9	0,58±0,04
B lote 1	0±0	0,58±0,03	0±0	1,5±0,1	18,9±0,5	78,0±0,6	1,02±0,02
B lote 2	0,52±0,04	2,9±0,3	0,14±0,01	2,1±0,01	23,0±0,4	70,8±0,8	0,63±0,01
B lote 3	0,63±0,02	2,8±0,3	0,30±0,01	2,27±0,08	23,26±0,04	70,2±0,5	0,52±0,02
C lote1	0±0	0,38±0,02	0,11±0,01	1,35±0,05	18,5±0,6	78,7±0,7	1,01±0,03
C lote 2	0,10±0,01	0,74±0,05	0,14±0,01	2,0±0,1	23,8±0,6	72,7±0,8	0,54±0,02
D lote 3	0,69±0,04	4,5±0,4	0,15±0,02	2,1±0,2	23,0±0,9	69,1±1,4	0,46±0,02

M±dp = Média entre 3 injeções ± desvio padrão

Os resultados encontrados para o óleo de milho mostram discordância com os citados por Geeraert & Sandra (1985) que determinou cerca de 3,56% de C50, 31,17% de C52 e 65,27% de C54.

Tabela 4 – Composição percentual de triacilgliceróis do óleo de milho comercial.

Marca	Triacilglicerol						
Lote	C36	C38	C48	C50	C52	C54	C56
	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp
A lote 1	0,20±0,01	0,27±0,01	0,55±0,03	4,73±0,04	33,4±0,1	59,40±0,09	1,41±0,03
A lote 2	0,71±0,08	1,7±0,3	0,80±0,05	6,5±0,3	38,7±0,6	51,1±1,2	0,58±0,03
A lote 3	0,82±0,05	2,0±0,3	1,04±0,06	7,3±0,3	40,8±0,5	47,5±1,0	0,55±0,02
B lote 1	0,10±0,01	0,48±0,03	0,53±0,06	4,6±0,1	32,9±0,3	59,9±0,5	1,44±0,02
B lote 2	0,34±0,01	0,8±0,1	0,93±0,02	7,1±0,2	41,0±0,5	49,2±0,7	0,60±0,03
B lote 3	0,21±0,02	0,63±0,01	0,73±0,01	6,6±0,5	40,1±1,4	51,0±1,9	0,70±0,06
C lote1	0,11±,01	0,28±0,02	0,46±0,03	4,95±0,03	34,11±0,09	58,6±0,2	1,46±0,07
C lote 2	0,98±0,06	2,5±0,3	0,60±0,03	5,9±0,2	39,5±0,6	49,8±1,1	0,68±0,02
D lote 3	0,86±0,03	2,2±0,2	0,68±0,02	6,4±0,2	40,2±0,5	49,0±0,7	0,74±0,02

M±dp = Média entre 3 injeções ± desvio padrão.

Os perfil cromatográfico dos triacilgliceróis dos óleos de soja, milho e girassol obtidos, que constam das figuras 1, 2 e 3, estão em concordância com os apresentados no trabalho de Precht (1991). Pode-se observar que diferentemente da coluna empacotada, na coluna capilar há uma separação dentro de cada triacilglicerol separado de acordo com o seu peso molecular. Esta separação é atribuída por Geeraert & Sandra (1985), a diferença de pressão de vapor entre triacilgliceróis que possuem ácidos graxos saturados e insaturados.

Análise estatística de variância ANOVA, dos resultados apresentados, mostrou que existe diferença significativa entre os triacilgliceróis dos óleos de soja,

milho e girassol. A análise dos resultados através do teste de Tukey, mostra quais os triacilgliceróis de cada óleo são significativamente diferentes. Estas diferenças entre os triacilgliceróis C38, C50, C52 e C54, podem ser observadas na tabela 5.

Os triacilgliceróis C36 e C48 não foram considerados na análise estatística, porque só foram quantificados nos lotes 2 e 3 e o C56 por apresentar concentração baixa em todos os lotes, menor que 1,4.

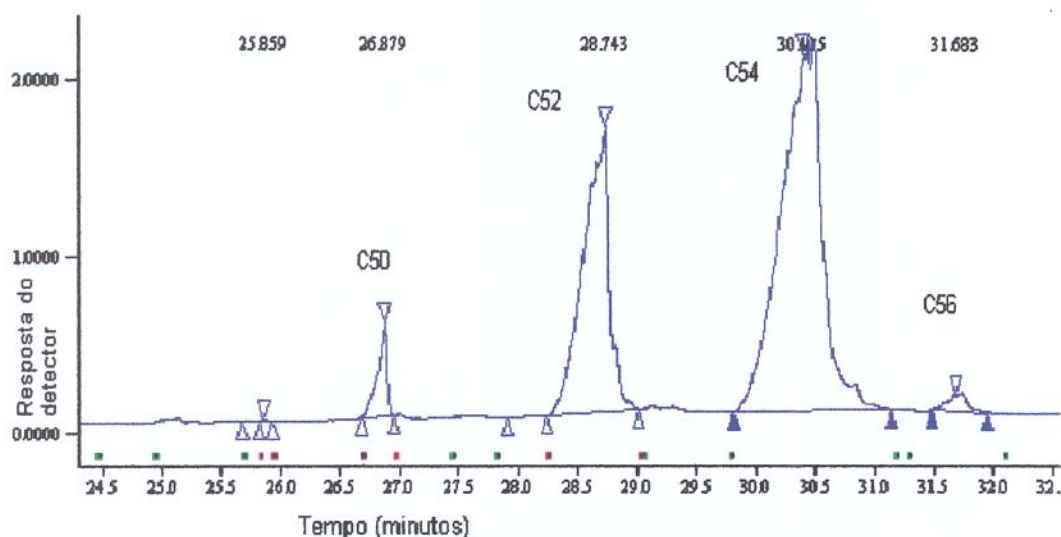


Figura 1 – Perfil de triacilgliceróis de óleo de soja comercial.

Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm) - 210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-100-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção "splitless"-2 min. Velocidade linear de H₂ – 2,1 cm/min.

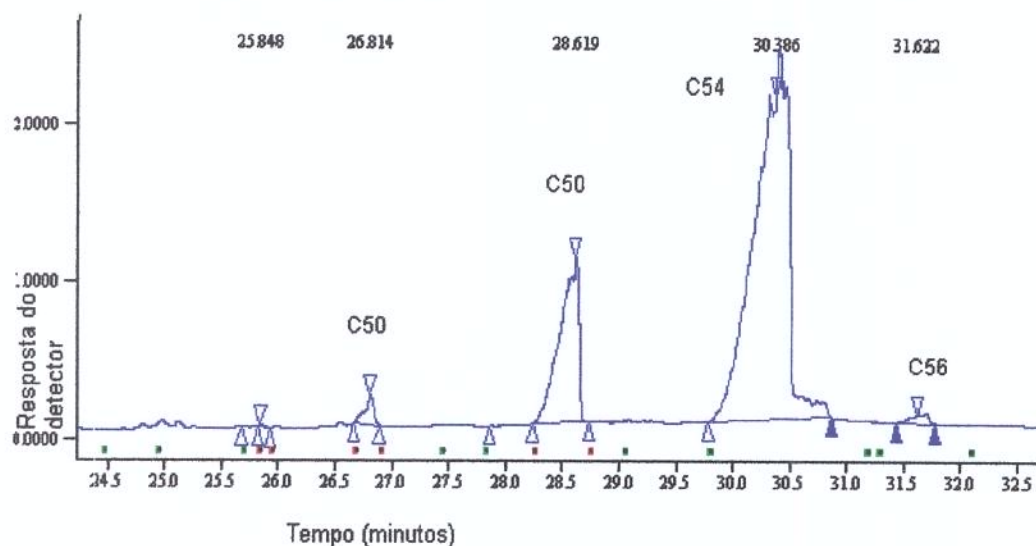


Figura 2 – Perfil de triacilgliceróis de óleo de girassol comercial.

Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm) - 210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-100-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção "splitless"-2 min. Velocidade linear de H₂-2,1cm/min.

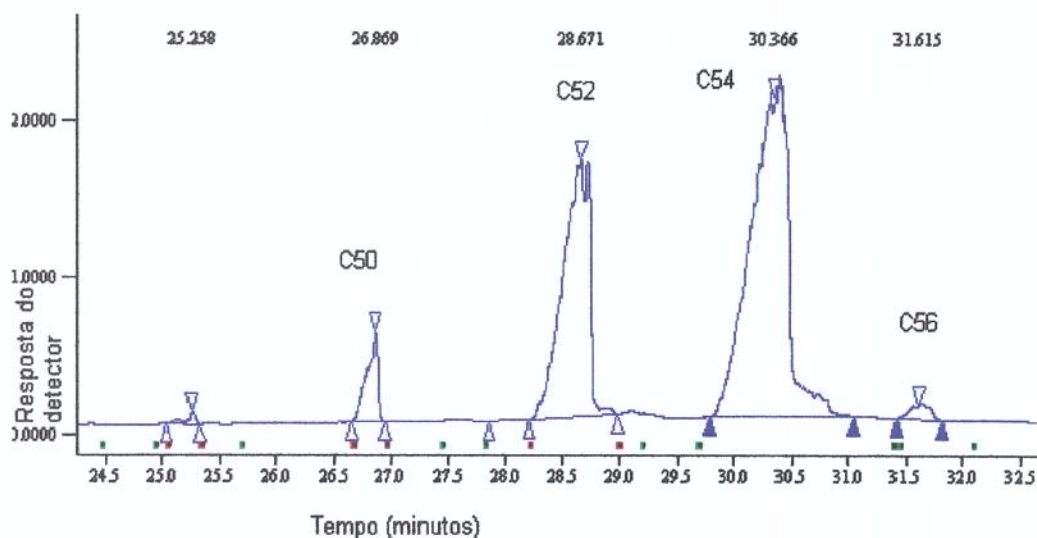


Figura 3 – Perfil de triacilgliceróis de óleo de milho comercial.

Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm) - 210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-100-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção "splitless"-2 min. Velocidade linear de H₂-2,1cm/min.

Tabela 5 – Triacilgliceróis que diferem entre cada par de óleos, de acordo com o Teste de Tukey

Óleo	Soja	Milho	Girassol
Girassol	C38, C50, C52, C54	C50, C52, C54	-
Milho	C50, C52, C54	-	-
Soja	-	-	-

6 – Conclusão

As composições dos triacilgliceróis dos óleos de soja e girassol não são constantes, pois somente nos primeiros lotes dos óleos de soja e girassol, A, B e C, não foram detectados os triacilgliceróis C36 e C48.

Os quatro triacilgliceróis mais importantes na composição dos três óleos, soja, milho e girassol, apresentaram grande variação entre os lotes analisados. Esta variação ficou em torno de 90% para o C38 nos três óleos, entre 37 e 50% para o C50, entre 20 e 27% para o C52 e entre 12 e 24% para o C54.

A análise de variância e teste de Tukey mostrou que os triacilgliceróis C50, C52 e C54 são significativamente diferentes nos três óleos estudados e podem ser usados para caracterizá-los.

7 - Referências Bibliográficas

- 1 - ANTONIOSI FILHO, N. R.; CARRILHO, E.; LANÇAS, F. M. Fast quantitative analysis of soybean oil in olive oil by high-temperature capillary gas chromatography. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 70, n. 10, p. 1051-1053. 1993.
- 2 - CARELLI, A. A. & CERT, A. Comparative study of the determination of triacilglycerols in vegetable oils using chromatographic techniques. **Journal of Chromatography**. v. 630, p. 213-222. 1993.
- 3 - CORTESI, N.; ROVELLINI, P.; FEDELI, E. I trigliceridi degli oli naturali. Nota 1. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**. v. 67, n. 2. 1990.
- 4 - GERAERT, E. & DE SCHEPPER, D. Structure elucidation of triglycerides by chromatographic techniques. Part 1: Capillary GC of ozonized triglycerides. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**. v. 5, n. 2, p. 80-84. 1982.
- 5 - GEERAERT, E. & DE SCHEPPER, D, Structure elucidation of triglycerides by chromayographic techniques. Part 2: RP HPLC of triglycerides and brominated triglycerides. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**. v. 6, n. 3, p. 123-132. 1983.
- 6 - GEERAERT, E. & SANDRA, P. On the potencial of cgc in triglyceride analysis. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**. v. 7, n. 7, p. 431-432. 1984.
- 7 - GEERAERT, E. & SANDRA, P. Capillary GC triglycerides in fats and oils using a high temperature phenylmethylsilicone stationary phase, part I. **Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications**. v. 8, n. 8, p. 415-422. 1985.
- 8 - HINSHAW, JR., J. V. & SEFEROVIC, W. Analysis of triglycerides by capillary gas chromatography with programmed-temperature injection. **Journal of**

High Resolution Chromatography and Chromatography Communications. v. 9, n. 12, p. 731-736. 1986.

- 9 - HOLMAN, R. T. **Progress in the chemistry of fats and other lipids.** Pergamos Press. v. 12. 1972.
- 10 - JUNIENS, G. Analysis of glycerides and composition of natural oils and fats. in: **Analysis and characterization of oils, fats and fat products.** Boekenoogen, H. A. v. 2. Interscience Publishers. 1968.
- 11 - LAAKSO, P. & KALLIO, H. Triacylglycerols of winter butterfat containing configurational isomers of monoenoic fatty acyl residues. i. disaturated monoenoic triacylglycerols. **Journal of American Oil Chemists' Society.** v. 70. n. 12, p. 1161-1171. 1993.
- 12 - LECKER, G.; FREGA, N.; BOCCI, F.; BERTACCO, G. Il grasso del latte, l'esame gas cromatografico dei triacilgliceroli nell'accertamento della genuinità del burro. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia.** v. 43, n. 2, p. 95-110. 1992.
- 13 - LIN, S. W. & LAM, N. W. Analysis of lipids in palm oil by on-column capillary gas-liquid chromatography. **Journal of Chromatographic Science.** v. 32, n. 5, p. 185-189. 1994.
- 14 - MATTER, L.; SCHENKER, D.; HUSMANN, H.; SCHOMBURG, G. Characterization of animal fats via the gc pattern of fame mixtures obtained by transesterification of the triglycerides. **Chromatographia.** v. 27, n. 1/2, p. 31-36. 1989.
- 15 - PETERSSON, B.; PODLAHA, O.; TOREGÅD. HPLC Separation of natural oil triglycerides into fractions with the same carbon number and numbers of double bonds. **Journal of American Oil Chemists' Society.** n. 11, p. 1005-1009. 1981.
- 16 - PHILLIPS, F. C.; ERDHAL, W. L.; SCHIMIT, J. A; PRIVETT, O. S. Quantitative analysis of triglycerides species of vegetable oils by high performance

liquid chromatography via a flame ionization detector. **Lipids**. v. 19, n. 11, p. 880-887. 1984.

- 17 - PRECHT, D. Control of milk fat by gas chromatographic triglyceride analysis. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**. v. 43, p. 219-242. 1991.
- 18 - PRECHT, D. Detection of foreign fat in milk fat. **Z Lebensmittel Untersuchung und Forschun.** .v. 194, p. 1-8. 1992.
- 19 - RĚSANKA, T. Determination of plant triacylglycerols using capillary gas chromatography, high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. **Journal Of Chromatography**. v. 542, p. 145-159. 1991.
- 20 - TRAITLER, H. & PRÉVÔT, A. Gas chromatographic separation of triglycerides according to their degree of unsaturation on glass capillary columns. **Journal of High Resolution Chromatography and Chromatography Communications**. v. 4, n. 3, p. 109-114. 1981.

Capítulo 5

Determinação de Triacilgliceróis na Gordura do Leite por Cromatografia Gasosa a Alta Temperatura

Capítulo 5 - Determinação de Triacilgliceróis na Gordura do Leite por Cromatografia Gasosa a Alta Temperatura

1 - Resumo

A determinação da composição de triacilgliceróis na gordura do leite de vaca é importante, por ser ela influenciada principalmente por fatores associados aos animais (genéticos e estágio de lactação), variações na alimentação e efeitos sazonais e regionais. Considerando estas variações, foi possível caracterizar a gordura e verificar onde ocorreram diferenças significativas na sua composição, destacando-se quais os triacilgliceróis mais suscetíveis à variação. A técnica utilizada foi a cromatografia gasosa utilizando alta temperatura, injetor com programação de temperatura, coluna de sílica fundida de 95% metilfenilsilicone, usando como fase móvel o hidrogênio e detector de ionização de chama. Empregando-se a análise de variância e o Teste de Tukey foi possível verificar quais as principais diferenças ocorridas na composição da gordura do leite. A análise de variância mostrou que entre as raças Jersey, Holandesa, Girolanda e Mestiça, existe diferença significativa ao nível de 95%, entre todos os triacilgliceróis estudados, do C26 ao C54. A variável estação de ano mostrou que existe diferença significativa ($p < 0,05$) entre os períodos, verão, inverno e outono, nos triacilgliceróis C26, C28, C30, C32, C34, C36, C46, C48, C50 e C54. A variável localização do animal, se no pasto ou estábulo e pasto, mostrou existir diferença significativa ($p < 0,05$) nos triacilgliceróis C26, C28, C30, C32, C34, C36, C42, C44, C46, C50, C52 e C54. A variável alimentação oferecida aos animais durante o período compreendeu quinze dietas que mostraram diferenças significativas nos quinze triacilgliceróis estudados.

2 – Summary

Determination of triacylglycerol composition in cow's milk fat is important, since it is influenced by factors associated with the animals (genetic and stage of lactation), variations in the feed and seasonal and regional effects. Considering these variations, it was possible to characterize the fat and determine where significant differences in the composition occurred, and thus highlighting which triacylglycerols were most susceptible to variation. The technique used was high temperature gas chromatography, an injector with a programmable temperature, a fused silica column of 95% methylphenylsilicone, a mobile phase of hydrogen and a flame ionization detector. Using the analysis of variance and Tukey's Test, it was possible to verify the main differences occurring in the milk fat composition. The analysis of variance showed that between the breeds Jersey, Dutch, "Girolanda" and Half Breed, there was significant difference at the level of 95% for all triacylglycerols studied, from C26 to C54. For the variable season of the year, a significant difference ($p < 0,05$) was shown between summer, winter and autumn seasons for C26, C28, C30, C32, C34, C36, C46, C48, C50 and C54 triacylglycerols. The animal's localization variable, if in the pasture or stable, showed the existence of a significant difference ($p < 0,05$) for C26, C28, C30, C32, C34, C36, C42, C44, C46, C50, C52 and C54 triacylglycerols. The variable related to the feed given to the animal for a period of fifteen diets exhibited significant differences in the fifteen studied triacylglycerols.

3 – Introdução

As gorduras e óleos têm sido caracterizados amplamente através da determinação de seus ácidos graxos (Barron et al., 1990; Maniogui et al., 1991 e Gresti et al., 1993). Estes compostos que possuem relativa volatilidade são indicados para análise por cromatografia gasosa, pois apresentam um perfil de

cromatograma para diferentes gorduras. A análise de ácidos graxos em gordura de leite tem tido como meta a sua identificação.

A análise da gordura de leite através de seus triacilgliceróis em coluna empacotada foi inicialmente descrita por Huebner (1961), tendo a partir de então, se tornado um método rotineiro.

Traitler & Prévôt (1981) mostraram que a hidrogenação dos triacilgliceróis e posterior análise através de coluna capilar apolar de comprimento médio (4, 5, 8 e 10 m) e espessura de filme de 0,15 μ m, torna possível a separação dos triacilgliceróis com mesmo número de átomos de carbono diferindo somente com uma dupla ligação.

Geeraert & De Schepper (1982), afirmam que a determinação da estrutura dos triacilgliceróis é mais facilmente conseguida depois de tratamento com ozônio e posterior análise por cromatografia gasosa capilar.

Segundo Geeraert & Sandra (1985) que separaram triacilgliceróis de leite usando coluna polar de 25mx0,25mm coberta com 0,12 μ m metilfenilsilicone, detector de ionização de chama e injetor "cold on-column", demonstraram que a elucidação da estrutura é muito difícil, sendo necessária a hidrogenação da gordura do leite. O objetivo da hidrogenação dos triacilgliceróis foi simplificar o seu perfil. Os triacilgliceróis saturados de baixo número de carbonos (T28 a T46) ainda mostraram perfis complexos. Eles resultam das diferenças de polaridade devido às combinações de diferentes comprimentos de cadeia.

Lund (1988) conseguiu alta resolução na determinação de triacilgliceróis em gordura de leite usando coluna de sílica fundida de 10mx0,32mm encoberta com CPSIL 5CB. As amostras foram introduzidas na coluna através do sistema de injeção "on-column", na temperatura de 90°C e então a temperatura do forno foi aumentada para 250°C a uma razão de 30°C/minuto e depois para 320°C a uma

razão de 4°C/minuto, estando o detector a temperatura de 350°C. O gás de arraste usado foi o hélio com fluxo de 2,4 mL por minuto.

Precht (1992) usou duas colunas de vidro de 80cmx3mm de diâmetro interno empacotadas com OV-1 sobre Chromapak Q de 100/120 mesh. As colunas foram pré-tratadas por silanização, usando dimetilclorosilano seguido de lavagem com tolueno e metanol. Na condição de operação de rotina usou detector de ionização de chama e injetor em isoterma a 370°C, com programação do forno de 210°C por 1 minuto, e aumentado para 360°C a 6°C/minuto. A coluna permaneceu a 355°C por 5 minutos. O gás de arraste usado foi nitrogênio em um fluxo de 75mL/minuto. Ele afirma que a injeção a quente produz melhores resultados quantitativos para os triacilgliceróis de alto ponto de ebulição.

Alonso (1993) desenvolveu um método rápido para análise de triacilgliceróis em queijo usando coluna capilar com um vaporizador com programação de temperatura, que definiu possuir reprodutibilidade e coeficiente de variação para o total de triacilgliceróis de 2,50%. A coluna usada foi de sílica fundida de 25mx0,25mm coberta com TAP-CB com espessura de filme de 0,10µm. A temperatura inicial da coluna foi de 280°C, com isoterma de 1 minuto, depois a temperatura foi aumentada para 350°C a uma razão de 3°C/ minuto. A temperatura inicial do injetor foi de 50°C e aumentada para 250°C em 15 segundos. O gás de arraste foi hélio a pressão de 17 psi.

Segundo Molquentin & Precht (1994), análise de triacilgliceróis da gordura do leite é um instrumento versátil na investigação da qualidade da gordura. Estes pesquisadores compararam os resultados obtidos por duas colunas, uma empacotada e outra capilar. Na coluna empacotada de 50cmx2mm, empacotada com 3% OV-1 sobre Chromapak Q de 100/120 mesh, os triacilgliceróis foram injetados a quente a 370°C no modo "splitless", usando detector de ionização de chama a temperatura de 370°C. O gás de arraste foi o nitrogênio com fluxo de 40mL/minuto. A programação da temperatura da coluna foi de 210°C, com 1 minuto de isoterma e depois elevação da temperatura para 350°C, na razão de

6°C/minuto, seguido de isoterma de 5 minutos. Na coluna capilar de 5mx0,5mm de tubo metálico coberta com 0,15µm de metilpolisiloxano desativado, usaram nitrogênio como gás de arraste com fluxo de 3mL/minuto, injeção “on-column” e injeção com programação de temperatura no modo “split” e “splitless”. As condições da coluna na injeção “on-column” foram de 80°C com isoterma de 0,5 minutos, de 50 a 190°C a 50°C/minuto e de 190 a 350°C na razão de 10°C/minuto. As condições da injeção em programação de temperatura no modo “splitless” foram de 70°C a 370°C na razão de subida de 600°C/minuto, com a programação da coluna de 70 a 190°C a 34°C/minuto e de 190 a 350°C na razão de 6°C/minuto, detector a 370°C e fluxo de gás de arraste, nitrogênio, a 3 mL/minuto. No modo “split” a coluna foi programada para iniciar em 190°C até 350°C na razão de 6°C/minuto. O injetor e detector a 370°C. Fluxo de nitrogênio como gás de arraste a 30 mL/minuto.

Lee & Hastilow (1999) desenvolveram método para análise de triacilgliceróis, usando cromatografia gasosa a alta temperatura. Os triacilgliceróis foram hidrogenados até completa saturação, a priori, para análise. Foi usada uma temperatura acima de 375°C na coluna capilar DB-5HT (30mx0,32mm e espessura do filme de 0,1µm), detector de ionização de chama e hélio como gás de arraste. Os triacilgliceróis foram separados e quantificados baseado em seu número de carbono equivalente e total de carbonos da cadeia lateral do grupo acil, obtendo-se resultados comparáveis aos encontrados em literatura.

Penton (2000) descreveu um método para análise de triacilgliceróis em alimentos utilizando cromatografia gasosa à alta temperatura. A coluna usada foi 50:50 metilfenilsilicone, com programação de 130-250°C a 20°C/minuto e de 250 a 360°C, a 10°C/minuto, injetor a 360°C, detector de ionização de chama a 360°C tendo como gás de arraste o hidrogênio. Os resultados mostraram que esta técnica é adequada para quantificar compostos de identidade conhecida que estejam em alta concentração, bem como identificar o perfil de produtos naturais.

O objetivo deste trabalho foi determinar a composição de triacilgliceróis da gordura do leite e sua variação em relação a época do ano, raça do animal, composição da ração e localização do animal.

4 - Material e Métodos

4.1 – Amostragem

Amostras de leite foram coletadas duas vezes ao mês, no início do verão até o final do período do inverno (dezembro de 1997 a setembro de 1998), resultando em 6 lotes ou coletas no período do verão, 5 no outono e 7 no inverno. A definição do período de coleta baseou-se no trabalho de Precht (1992), que caracterizou a gordura do leite durante todas as estações do ano, porém como em nosso país não possuímos estações do ano suficientemente definidas, foi escolhido o período de 9 meses, visto que não há diferenças de temperatura significativas entre a primavera e o outono.

Foram escolhidas 4 raças de animal: Mestiça, Holandesa, Jersey e Girolanda, disponibilizadas pelos produtores da Cooperativa dos Produtores de Leite da Região de Campinas, denominados respectivamente de produtor A, B, C e D.

Durante o período de coleta das amostras de leite foram monitoradas algumas variáveis, sobre os animais, que de acordo com a literatura são importantes na variação da composição da gordura do leite, tais como: alimentação oferecida; localização do animal (pasto ou estábulo) e época do ano em que foi realizada a coleta, isto é, verão, outono e inverno. A monitoração das variáveis foi realizada através de um formulário simples, fornecido à Cooperativa, que foi preenchido no período da coleta e que pode ser visto no anexo 1.

4.2 – Preparação da amostra

4.2.1 – Extração da gordura

A extração da gordura do leite foi realizada através do método Rose-Gottlieb, indicado para produtos lácteos, de acordo com Método 905.02, item 33.2.25 da Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1997).

O método Rose-Gottlieb é usado principalmente em produtos lácteos e envolve a precipitação e solubilização da proteína por etanol e amônia respectivamente, e subsequente extração da gordura com uma mistura de éter etílico e éter de petróleo.

4.2.2 – Separação dos triacilgliceróis

A separação da gordura foi realizada por extração em fase sólida, de acordo com Lercker et al. (1992).

Numa coluna de vidro adicionou-se 500 mg de sílica 60 (Merck) e em seguida cerca de 1,0 cm de sulfato de sódio. O acondicionamento da coluna foi realizado através da passagem pela coluna de 3 mL de hexano. Cerca de 0,02g de gordura foi dissolvida em hexano e carregada no topo da coluna. Os triacilgliceróis foram eluídos por adição de 3 mL de hexano, seguida de 3mL de solução hexano:éter etílico (8:2). A solução eluída da coluna foi levada à secura em banho-maria (50-60°C) e diluída em 10 mL de hexano com grau de pureza cromatográfica. Foi injetado no cromatógrafo 1,0 µL da amostra. As injeções de cada amostra foram realizadas em triplicata.

4.2.3 - Condições cromatográficas

Equipamento

Cromatógrafo gasoso marca Varian 3400 com detector tipo ADCB de ionização de chama, injetor com programação de temperatura Varian 7865 e processamento dos dados foi realizado por “Star Chromatography Workstation”.

Injetor com programação de temperatura

Temperatura inicial – 100°C com isoterma de 15 segundos, em seguida a temperatura foi elevada para 380°C, numa razão de 200°C/minuto.

A injeção foi realizada no modo “splitless” pelo período de 2 minutos. O período de análise em “split” foi realizado com razão de 1:25.

Coluna

Coluna de sílica fundida de 30m de comprimento por 0,32mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,1µm de fase estacionária 5%fenil-95% metilsilicone – DB5HT(J&W).

Temperatura inicial de 210°C, com isoterma de 1 minuto, com aumento para 250°C na razão de 20°C/minuto, isoterma de 1 minuto e posterior aumento para 360°C na razão de 4°C/minuto.

Detector

Detector a temperatura de 400°C.

Gases: hidrogênio, num fluxo de 30 mL/minuto, ar sintético, com fluxo de 300 mL/minuto e nitrogênio a 30 mL/minuto.

Fase móvel

O gás de arraste usado foi o hidrogênio com velocidade linear de 2,1 cm/minuto.

4.2.4 – Análise qualitativa e quantitativa

A identificação foi realizada através dos procedimentos:

- Comparação dos tempos de retenção dos componentes da amostra (t_r) e do tempo de retenção corrigido (t_r') de amostras e padrões.
- Cálculo para os demais picos, os quais não havia disponibilidade de padrões, do índice de retenção de Kovats.
- Técnica de co-eluição ("spiking") de padrões.

A quantificação foi realizada por normalização interna, com obtenção da porcentagem relativa de cada fração de triacilgliceróis. A reprodutibilidade dos resultados das análises quantitativas foi expressa em termos de desvio padrão e coeficiente de variação calculados a partir de uma série de três injeções consecutivas.

4.2.5 – Análise estatística

Para análise dos dados obtidos nas 19 coletas realizadas com as quatro raças escolhidas foram realizadas comparações múltiplas usando a técnica da análise da variância (ANOVA) e o teste de Tukey, em um nível de significância de 5%. A variação foi calculada baseado no erro relativo ao máximo.

A análise de variância foi empregada para analisar medidas que dependem de várias espécies de fatores que operam simultaneamente e decidir que espécie de efeito é importante e estimá-lo. Cada efeito foi analisado separadamente durante todo o período de coleta. Os efeitos comparados foram:

Localização do animal: entre estábulo e estábulo e pasto;

Raça do animal: Mestiça, Holandesa, Jersey e Girolanda;

Estações do ano em que a coleta foi realizada: verão, outono e inverno;

Dietas oferecidas aos animais durante o período: (1) soja, milho, sais, melaço e aveia; (2) soja, milho, sais e cevada; (3) milho, sais, ração A e ração B; (4) soja, sais, cevada e ração B; (5) soja, milho, sais, melaço, aveia e ração C; (6) soja, milho, sais, melaço, cevada, aveia e ração C; (7) soja, milho, sais, melaço, cevada e polpa cítrica; (8) soja, milho, sais e aveia; (9) soja, milho, sais, aveia e nutrientes vitamínicos; (10) milho, sais e aveia; (11) milho, sais, cevada, ração D, ração E e ração F; (12) soja, milho, sais, cevada e aveia; (13) soja, milho, sais, bagaço de cana e silagem; (14) soja, milho, sais, cevada, ração D, ração E e ração F; (15) soja, milho, sais, cevada, bagaço de cana e bagaço de laranja.

5 – Resultados

Composição de Triacilgliceróis da Gordura do Leite

A análise da gordura do leite em coluna capilar resultou nos dados mostrados nas tabelas 1 a 4, que apresentam a concentração em percentagem de cada triacilglicerol nos quatro produtores pesquisados. As figuras 1 a 4, apresentam os cromatogramas típicos, obtidos em coluna capilar, referentes aos triacilgliceróis da gordura do leite dos Produtores A, B, C e D, correspondendo respectivamente às raças Mestiça, Holandesa, Jersey e Girolanda.

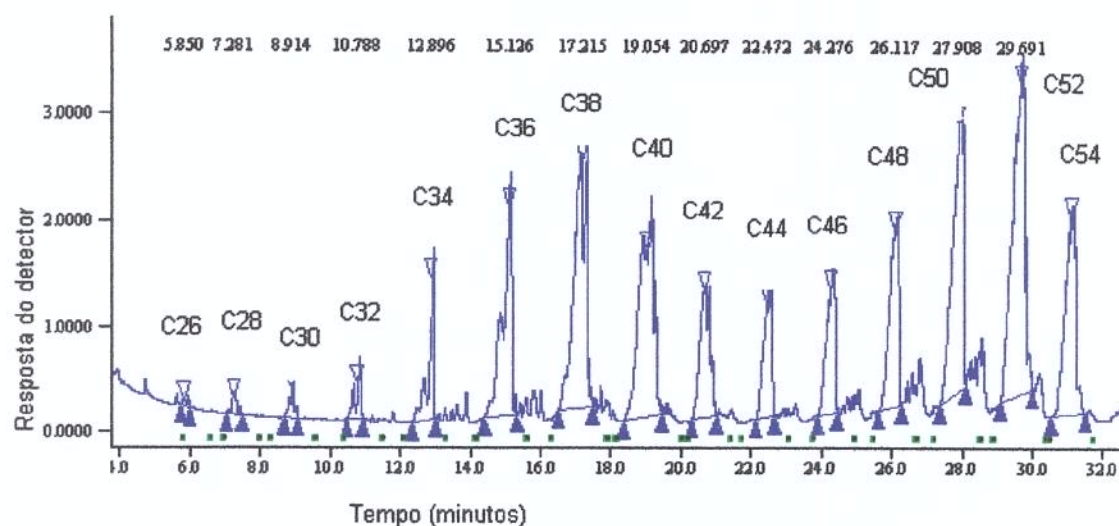


Figura 1 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite de vaca Mestiça, Produtor A. Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-100-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção “splitless”-2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min.

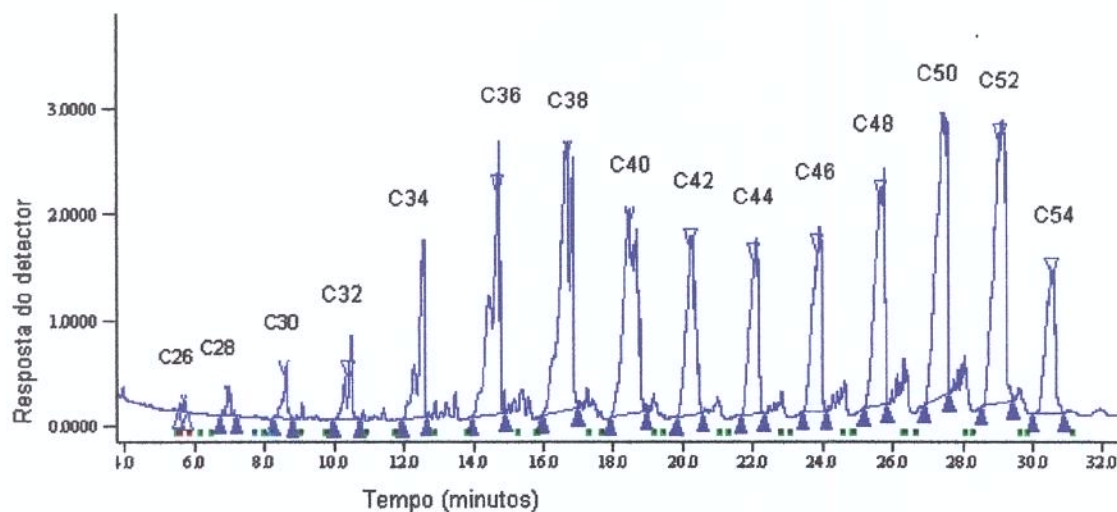


Figura 2 – Perfil de triacilgliceróis da gordura de leite da raça Holandesa, Produtor B. Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-100-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção “splitless”-2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min

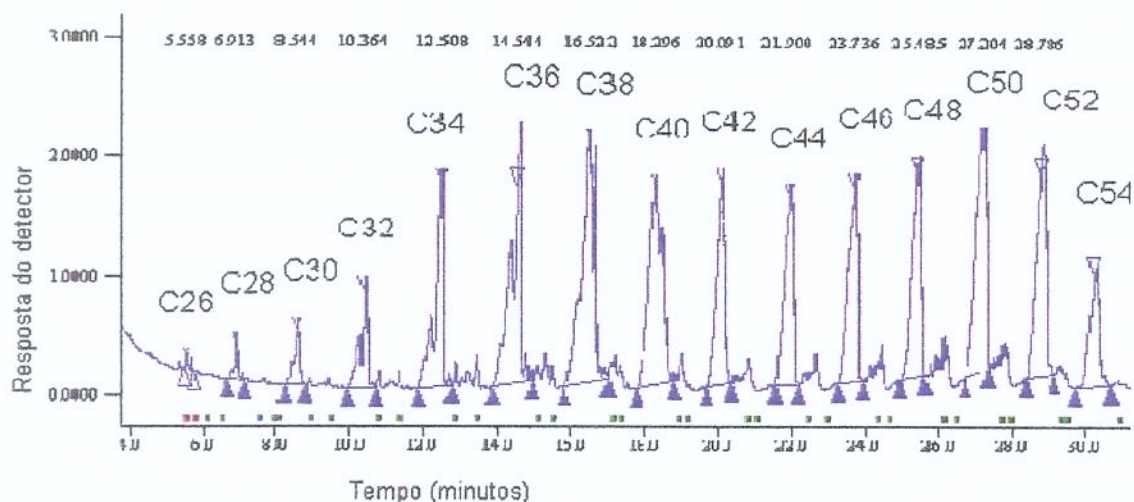


Figura 3 – Perfil de triacilgliceróis da gordura do leite da raça Girolanda, Produtor C. Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-100-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção "splitless"-2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min

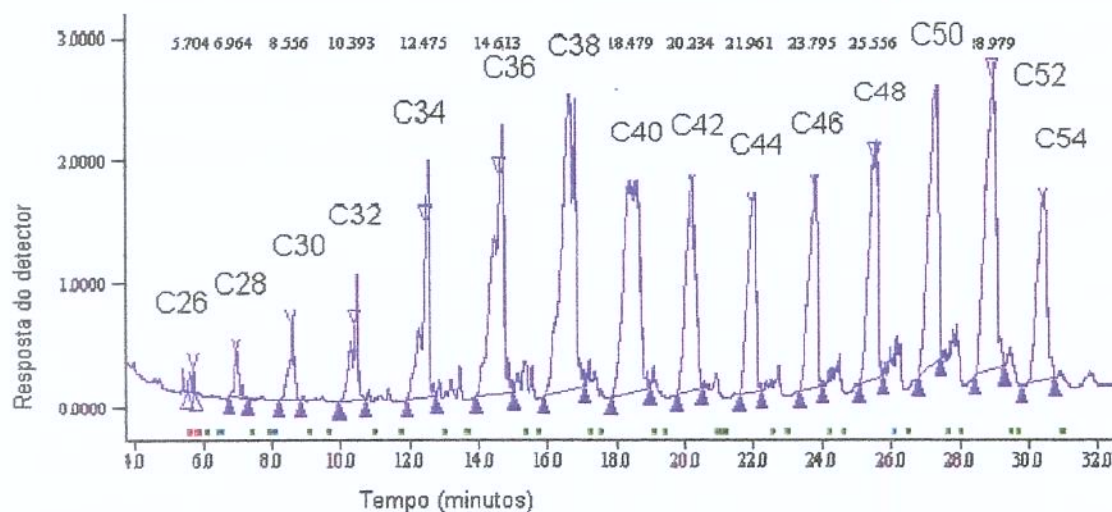


Figura 4 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite da raça Jersey, produtor D. Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-100-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção "splitless"-2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min.

Em coluna capilar com fase estacionária de fenilmetilsilicone os triacilgliceróis são separados de acordo com o número de átomos de carbono e cada pico é resolvido apresentando uma estrutura fina, diferentemente da coluna empacotada, governada pelo número de insaturações, responsável pelo aumento do tempo de retenção. O cromatograma obtido apresentou alta resolução, sendo quantificados 15 picos correspondentes aos triacilgliceróis de número de átomos de carbono pares, correspondentes ao C26 a C54. Timms (1980), Precht (1992) e Molkentin & Precht (1995) obtiveram resultados semelhantes. Timms (1980) e Precht (1992) identificaram 16 triacilgliceróis, respectivamente, do C26 ao C56 e do C24 ao C54. Molkentin & Precht (1995) identificaram 15 triacilgliceróis do C26 ao C54.

Entre os picos de número de carbonos pares são vistos picos menores, que correspondem a triacilgliceróis de número de carbono ímpares, devido à substituição de um dos 3 componentes da parcela de acil grupos pares por um ácido graxo de carbono ímpar, principalmente 15:0 e 17:0 (Maniogui et al.1991). Estes triacilgliceróis de número ímpar de átomos de carbono não foram quantificados, isto é, não foram integrados aos respectivos picos precedentes. O triacilglicerol C56 não foi quantificado por apresentar baixa reprodutibilidade e concentração.

Na tabela 1, correspondendo ao Produtor A, observa-se que os triacilgliceróis de baixo peso molecular e os de alto peso molecular são os que apresentaram maior variação durante os períodos de coleta, podendo-se verificar este comportamento nas figuras 5 a 7. Pode-se observar que durante o período de verão as maiores variações ocorreram nos triacilgliceróis C26 e C28, que foram respectivamente 79,6% e 50,0% e entre 31,0% e 46,6% nos triacilgliceróis C30, C32, C34, C52 e C54. Durante o outono a variação entre 50% e 60% foi encontrada nos triacilgliceróis C26, C28 e C54 e entre 33,0% a 48,0% nos triacilgliceróis C30, C32, C34 e C52. Durante o período de inverno foram observadas as mais baixas variações nos triacilgliceróis, com exceção do C54 que

mostrou variação de 58,8% e C52 de 33,5%, enquanto que os demais apresentaram variação menor que 29,6%.

Tabela 1 - Composição de triacilgliceróis (% relativa) da raça Mestiça, Produtor A, de acordo com a época do ano, analisados por cromatografia gasosa, usando injeção com programação de temperatura e coluna capilar de sílica fundida.

T	Verão (a)			Outono (a)			Inverno (b)		
	Mín	Máx	Média±dp	Mín	Máx	Média±dp	Mín	Máx	Média±dp
C26	0,10 – 0,49		0,2 ± 0,1	0,08 – 0,18		0,12 ± 0,04	0,10 – 0,14		0,12±0,02
C28	0,28 – 0,56		0,4 ± 0,1	0,25 – 0,51		0,4 ± 0,1	0,30 – 0,40		0,36±0,04
C30	0,56 – 1,04		0,7 ± 0,2	0,51 – 0,98		0,7 ± 0,2	0,50 – 0,71		0,62±0,08
C32	1,10 – 2,06		1,5 ± 0,4	1,07 – 1,87		1,4 ± 0,3	0,94 – 1,31		1,2±0,1
C34	3,07 – 4,92		3,8 ± 0,7	3,00 – 4,48		3,7 ± 0,6	2,47 – 3,31		3,0±0,3
C36	7,51 – 9,63		8,6 ± 0,7	7,85 – 9,87		8,7 ± 0,9	6,71 – 8,60		7,8±0,7
C38	12,67 – 14,09		13,4 ± 0,5	11,64 – 15,40		13 ± 1	12,84 – 16,12		14±1
C40	11,33 – 11,80		11,5 ± 0,2	10,35 – 13,91		12± 1	11,90 – 14,42		12,8±0,9
C42	5,49 – 7,00		6,0 ± 0,5	5,20 – 6,58		5,8 ± 0,5	4,80 – 5,86		5,5±0,3
C44	4,65 – 6,20		5,1 ± 0,6	4,24 – 5,55		4,9 ± 0,5	3,55 – 4,54		4,2±0,3
C46	5,51 – 6,83		5,8 ± 0,5	4,98 – 6,10		5,7 ± 0,5	4,25 – 5,49		5,0±0,4
C48	7,52 – 8,48		8,1 ± 0,4	7,37 – 8,88		8,1 ± 0,6	6,60 – 8,75		7,4±0,7
C50	10,79 – 13,95		13 ± 1	11,19 – 14,72		13 ± 1	12,21 – 13,37		12,8±0,4
C52	11,45 – 16,60		15 ± 2	11,38 – 17,50		15 ± 2	13,52 – 20,33		17±2
C54	5,61 – 8,68		7 ± 1	3,93 – 9,65		8 ± 2	4,67 – 11,33		8±2

a – Média (M) e desvio padrão (dp) de 6 lotes injetados em triplicata.

b - Dados, média (M) e desvio padrão (dp) de 7 lotes, injetados em triplicata.

T – Triacilglicerol.

Faixa de variação: Mín = mínimo, Máx = máximo.

Tabela 2 - Composição de triacilgliceróis (% relativa) da raça Holandesa, Produtor B, de acordo com a época do ano, analisados por cromatografia gasosa, usando injeção com programação de temperatura e coluna capilar de sílica fundida.

T	Verão (a)			Outono (a)			Inverno (b)		
	Mín	Máx	Média±dp	Mín	Máx	Média±dp	Mín	Máx	Média±dp
C26	0,14 – 0,19		0,17 ± 0,02	0,13 – 0,15		0,14 ± 0,01	0,09 – 0,24		0,17 ± 0,05
C28	0,48 – 0,64		0,54 ± 0,06	0,38 – 0,50		0,46 ± 0,05	0,31 – 0,76		0,6 ± 0,2
C30	0,99 – 1,16		1,06 ± 0,08	0,71 – 0,95		0,85 ± 0,09	0,57 – 1,29		1,1 ± 0,3
C32	2,01 – 2,40		2,2 ± 0,2	1,40 – 1,93		1,9 ± 0,2	1,15 – 2,51		2,1 ± 0,5
C34	4,65 – 5,49		5,1 ± 0,3	3,32 – 4,55		4,0 ± 0,5	2,90 – 5,33		4,6 ± 0,9
C36	9,95 – 11,08		10,5 ± 0,5	7,82 – 10,03		9,1 ± 0,9	7,00 – 10,62		10 ± 1
C38	12,87 – 13,94		13,7 ± 0,4	13,01 – 15,18		14,0 ± 0,8	11,21 – 14,23		13 ± 1
C40	10,06 – 11,67		11,1 ± 0,6	11,11 – 13,02		11,9 ± 0,7	9,70 – 11,70		10,9 ± 0,6
C42	6,52 – 7,15		6,9 ± 0,2	5,62 – 7,29		6,4 ± 0,7	5,28 – 7,62		6,6 ± 0,7
C44	5,82 – 6,91		6,2 ± 0,4	4,93 – 6,63		5,6 ± 0,7	4,89 – 7,06		5,9 ± 0,7
C46	6,31 – 7,88		6,8 ± 0,6	5,62 – 7,46		6,4 ± 0,7	5,82 – 7,53		6,5 ± 0,6
C48	7,94 – 9,73		8,5 ± 0,7	7,77 – 9,54		8,6 ± 0,7	7,21 – 9,27		8,3 ± 0,7
C50	10,68 – 11,70		11,4 ± 0,4	12,23 – 13,13		12,5 ± 0,3	10,16 – 15,14		12 ± 2
C52	9,91 – 12,68		11,3 ± 0,9	9,51 – 16,23		13 ± 3	10,23 – 17,91		13 ± 3
C54	3,87 – 5,43		4,6 ± 0,7	2,44 – 8,07		5 ± 3	4,36 – 8,33		6 ± 1

a – Média (M) e desvio padrão (dp) de 6 lotes injetados em triplicata.

b - Dados, média (M) e desvio padrão (dp) de 7 lotes, injetados em triplicata.

T – Triacilglicerol.

Faixa de variação: Mín = mínimo, Máx = máximo.

Tabela 3 - Composição de triacilgliceróis (% relativa) da raça Girolanda, Produtor C, de acordo com a época do ano, analisados por cromatografia gasosa, usando injeção com programação de temperatura e coluna capilar de sílica fundida.

T	Verão (a)			Outono (a)			Inverno (b)		
	Mín	Máx	Média±dp	Mín	Máx	Média±dp	Mín	Máx	Média±dp
C26	0,17 – 0,30		0,22 ± 0,05	0,13 – 0,24		0,19 ± 0,05	0,21 – 0,29		0,22 ± 0,03
C28	0,62 – 0,93		0,8 ± 0,1	0,41 – 0,84		0,6 ± 0,2	0,71 – 1,04		0,8 ± 0,1
C30	1,12 – 1,61		1,5 ± 0,2	0,84 – 1,49		1,2 ± 0,3	1,27 – 1,85		1,5 ± 0,2
C32	2,26 – 3,23		2,9 ± 0,3	1,81 – 2,92		2,5 ± 0,5	2,53 – 3,61		2,9 ± 0,3
C34	5,32 – 6,61		6,2 ± 0,5	4,48 – 6,38		5,6 ± 0,7	5,58 – 7,14		6,0 ± 0,5
C36	11,18 – 12,29		11,7 ± 0,4	9,56 – 12,55		11 ± 1	10,40 – 12,58		11,0 ± 0,8
C38	13,05 – 14,82		13,9 ± 0,7	12,88 – 13,96		13,5 ± 0,5	13,08 – 14,18		13,3 ± 0,4
C40	10,65 – 12,69		11,5 ± 0,8	10,43 – 11,39		11,0 ± 0,4	10,89 – 11,70		11,2 ± 0,3
C42	7,23 – 8,93		8,3 ± 0,6	6,46 – 8,21		7,6 ± 0,8	7,35 – 8,95		8,2 ± 0,5
C44	6,49 – 8,36		7,6 ± 0,7	5,91 – 7,72		7,0 ± 0,7	6,60 – 8,23		7,6 ± 0,5
C46	7,15 – 8,16		7,6 ± 0,5	6,71 – 7,88		7,4 ± 0,4	6,97 – 7,96		7,6 ± 0,3
C48	7,73 – 8,96		8,3 ± 0,5	7,95 – 9,18		8,5 ± 0,4	7,86 – 8,46		8,2 ± 0,2
C50	8,64 – 10,95		9,3 ± 0,8	9,29 – 12,07		10 ± 1	8,03 – 10,34		9,5 ± 0,7
C52	6,50 – 8,69		7,6 ± 0,8	6,97 – 13,00		10 ± 2	5,90 – 9,60		9 ± 1
C54	2,15 – 3,12		2,6 ± 0,4	2,06 – 6,07		4 ± 1	2,21 – 4,33		3,6 ± 0,7

a – Média (M) e desvio padrão (dp) de 6 lotes injetados em triplicata.

b - Dados, média (M) e desvio padrão (dp) de 7 lotes, injetados em triplicata.

T – Triacilglicerol.

Faixa de variação: Mín = mínimo, Máx = máximo.

Tabela 4 - Composição de triacilgliceróis (% relativa) da raça Jersey, Produtor D, de acordo com a época do ano, analisados por cromatografia gasosa, usando injeção com programação de temperatura e coluna capilar de sílica fundida.

T	Verão (a)			Outono (a)			Inverno (b)		
	Mín	Máx	Média±dp	Mín	Máx	Média±dp	Mín	Máx	Média±dp
C26	0,15 – 0,20		0,18 ± 0,02	0,13 – 0,20		0,17 ± 0,03	0,16 – 0,25		0,22 ± 0,03
C28	0,47 – 0,67		0,58 ± 0,08	0,44 – 0,63		0,57 ± 0,07	0,55 – 0,82		0,72 ± 0,09
C30	0,81 – 1,20		1,1 ± 0,2	0,84 – 1,15		1,0 ± 0,1	0,98 – 1,40		1,2 ± 0,1
C32	1,62 – 2,26		2,0 ± 0,2	1,63 – 2,27		2,0 ± 0,2	1,91 – 2,62		2,3 ± 0,2
C34	4,40 – 5,33		4,8 ± 0,4	3,88 – 4,90		4,6 ± 0,4	4,40 – 5,48		5,0 ± 0,3
C36	9,72 – 10,89		10,2 ± 0,4	8,52 – 10,55		9,9 ± 0,8	9,00 – 10,37		9,8 ± 0,5
C38	13,03 – 15,37		14,1 ± 0,9	13,02 – 15,60		14 ± 1	13,84 – 14,20		14,0 ± 0,1
C40	10,47 – 13,68		12 ± 1	11,28 – 13,80		13 ± 1	11,82 – 12,35		12,1 ± 0,2
C42	6,04 – 7,16		6,7 ± 0,4	6,09 – 7,21		6,8 ± 0,4	6,46 – 7,22		6,8 ± 0,3
C44	5,42 – 6,34		5,9 ± 0,3	5,24 – 6,22		5,9 ± 0,4	5,50 – 6,16		5,7 ± 0,2
C46	5,96 – 7,26		6,7 ± 0,4	5,85 – 6,85		6,5 ± 0,4	5,91 – 6,45		6,1 ± 0,2
C48	5,30 – 9,27		8 ± 1	7,85 – 8,74		8,3 ± 0,4	7,25 – 7,63		7,5 ± 0,1
C50	10,83 – 13,20		11,7 ± 0,9	10,76 – 11,95		11,3 ± 0,5	9,66 – 11,05		10,2 ± 0,5
C52	9,85 – 13,06		11,48 ± 1,16	8,79 – 14,84		11,54 ± 2,24	10,48 – 13,14		11,82 ± 0,90
C54	2,75 – 5,61		4,24 ± 1,09	2,10 – 8,29		4,84 ± 2,35	5,60 – 7,12		6,51 ± 0,49

a – Média (M) e desvio padrão (dp) de 6 lotes injetados em triplicata.

b - Dados, média (M) e desvio padrão (dp) de 7 lotes, injetados em triplicata.

T – Triacilglicerol.

Faixa de variação: Mín = mínimo, Máx = máximo.

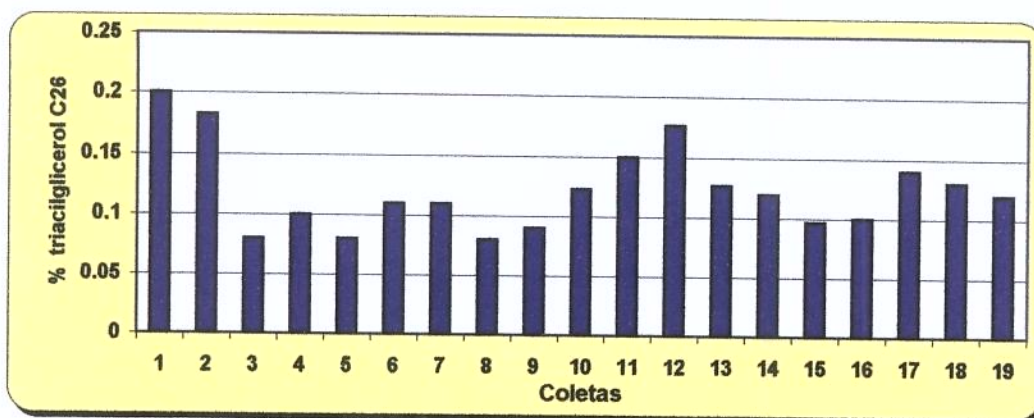


Figura 5 – Variação da concentração do triacilglicerol C26 da gordura do leite da raça Mestiça, durante a coleta.

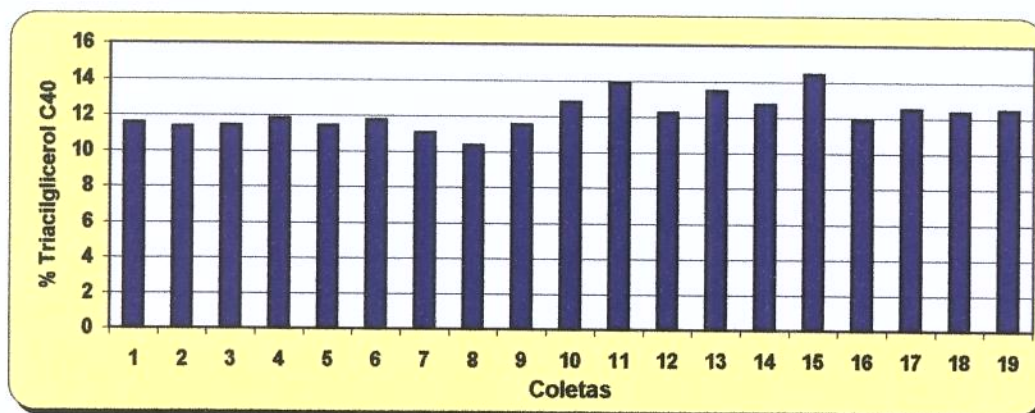


Figura 6 – Variação da concentração do triacilglicerol C40 da gordura do leite da raça Mestiça, durante a coleta

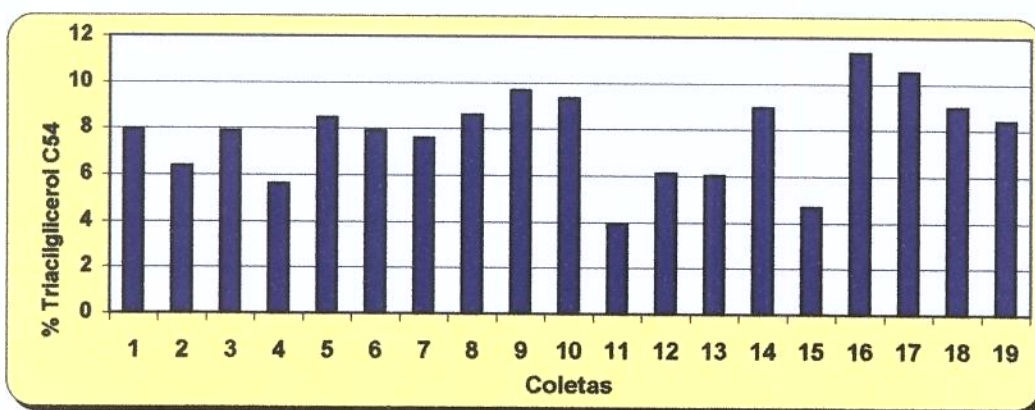


Figura 7 - Variação da concentração do triacilglicerol C54 da gordura do leite da raça Mestiça, durante a coleta.

Na tabela 2, correspondente ao produtor B, verifica-se no período do verão pouca variação, somente os triacilgliceróis C26, C28, C52 e C54 apresentaram variação entre 30% e 40%, enquanto nos demais esta ficou entre 8% e 25%. No período do outono, os triacilgliceróis C52 e C54, apresentaram variação de respectivamente 71% e 231% e os demais de 7% a 38%. No período de inverno nos triacilgliceróis C26 a C32 ocorreu variação maior que 100%, de 75 % a 91% no C34, C52 e C54 e nos demais a faixa de variação foi de 21% a 52%. A variação na concentração, durante o período de coleta, dos triacilgliceróis de baixo, médio e alto peso molecular podem ser observados nos anexos 2 a 4.

Na tabela 3, correspondente ao Produtor C, verifica-se maior variação no período de verão nos triacilgliceróis C26 de 76% e C28, C30, C32 e C54 de 43% a 50%, ficando os restantes na faixa entre 10% a 34%. No outono a variação de 100% ou mais aconteceu no C26 e C54, 85% no C26, 77% no C30, 66% no C32 e 87% no C52. No inverno somente o C54 apresentou variação de 96% e o C52 de 63%, os demais mostraram variação menor que 46%. Os anexos 5 a 7 mostram a variação da concentração dos triacilgliceróis C26, C40 e C54, durante as coletas.

Na tabela 4, correspondente ao Produtor D, verificou-se no período do verão a variação de mais de 100% somente no triacilglicerol C54, e durante o inverno ocorreram as menores variações na gordura durante todo o tempo das coletas. As variações nas concentrações dos triacilgliceróis C26, C40 e C54 durante todo o período estudado, podem ser vistos nos anexos 8 a 10.

As figuras 8 a 10 mostram o comportamento dos triacilgliceróis, durante os períodos de verão, outono e inverno de acordo com as raças estudadas.

A variação de mais de 100% nos teores de triacilgliceróis C26, C28, C30, C32, C34, C44, C52 e C54 foi encontrada por Precht (1992) e nos triacilgliceróis C28, C30 e C32 por Timms (1980).

A faixa dos valores encontrados quando comparados com os resultados de Timms (1980), mostrou ser igual para os triacilgliceróis C28, C38 e C52 e uma faixa diferente nos triacilgliceróis C26 e C48. Os teores encontrados dos triacilgliceróis C30, C32, C34, C36, C42, C44, C46, C50 e C54 apresentaram uma faixa maior, enquanto que para o C40 a faixa foi menor.

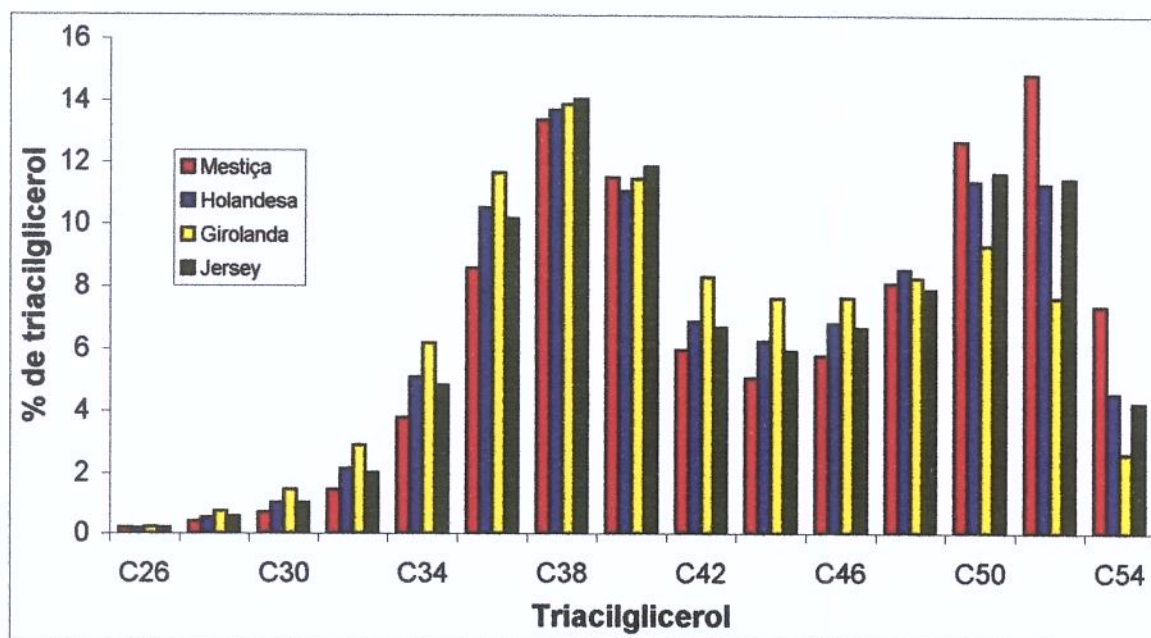


Figura 8 – Variação dos triacilgliceróis durante o verão de acordo com a raça do animal.

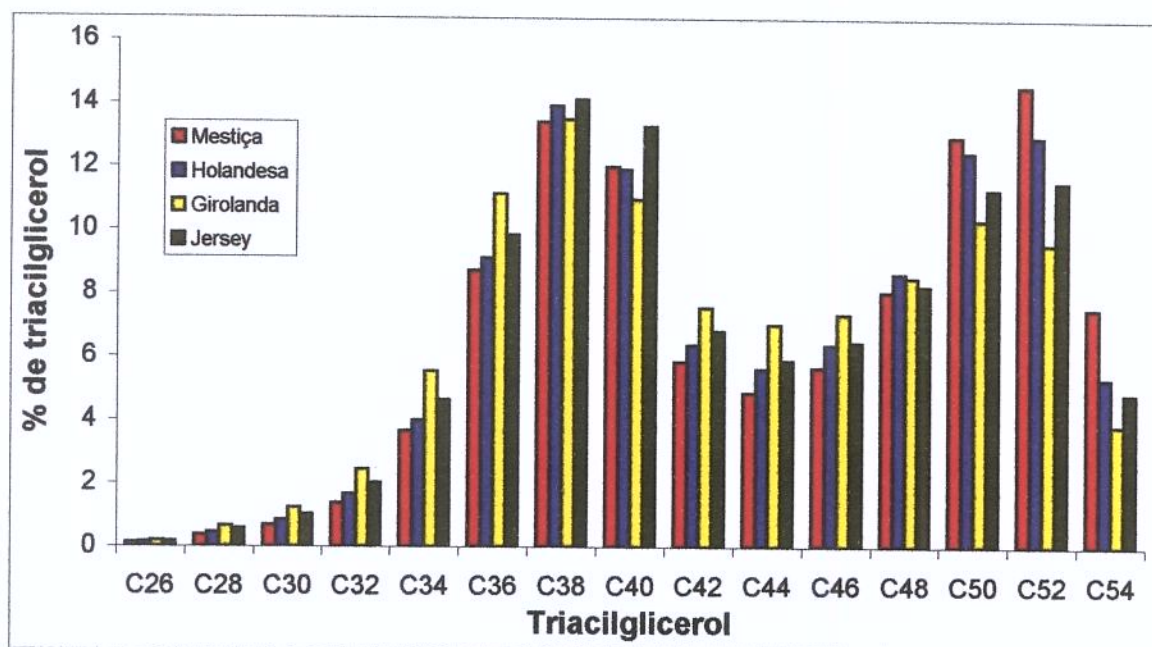


Figura 9 – Variação dos triacilgliceróis durante o outono de acordo com a raça do animal.

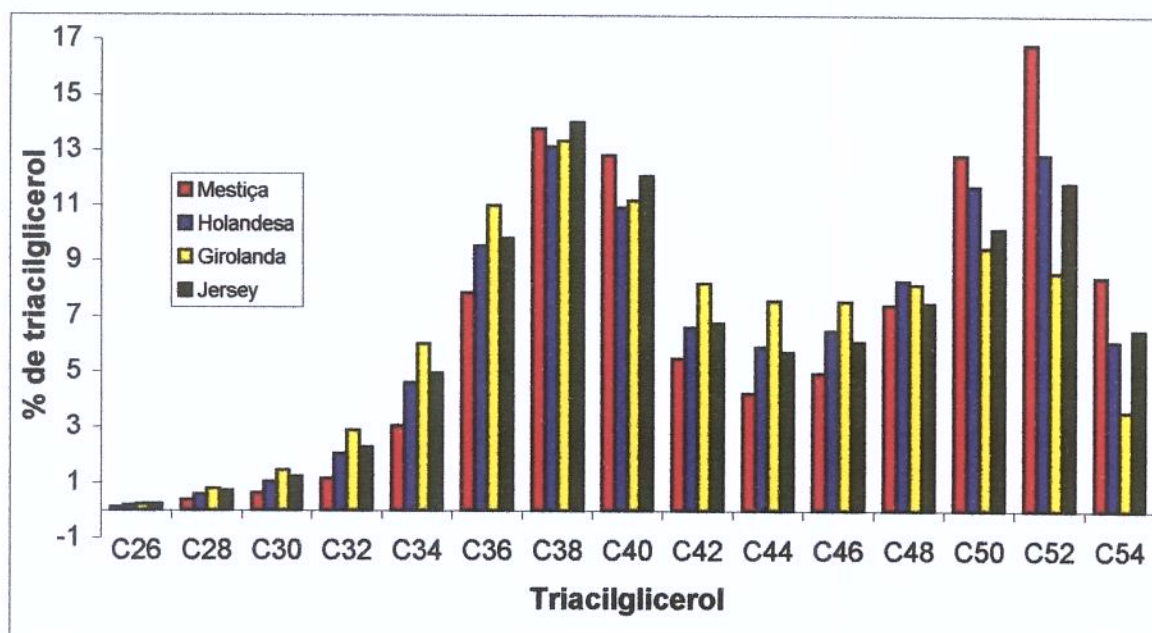


Figura 10 – Variação dos triacilgliceróis durante o inverno de acordo com a raça do animal.

Precht (1992) apresentou resultados semelhantes aos encontrados nos triacilgliceróis C34, C36, C38, C42, C50 e C54. Os triacilgliceróis C26, C28, C30, C32, C40, C44, C48 e C52 apresentaram faixa de variação maior e o C46 faixa menor, quando comparados aos de Precht.

A reprodutibilidade dos resultados das análises quantitativas dos triacilgliceróis foi expressa em termos de desvio padrão que variaram de 0,00 até 0,58 e coeficiente de variação que se apresentou entre 0,00 a 9,84%, calculados de uma série de três análises ou injeções consecutivas. Os resultados de Timms (1980) apresentaram desvio padrão entre 0,08 e 1,69 e Precht (1992) entre 0,02 e 2,14.

A análise estatística (ANOVA) foi empregada nos resultados obtidos com as concentrações dos triacilgliceróis, durante os nove meses de coleta, buscando encontrar diferenças entre as variáveis: localização do animal entre os períodos das coletas (estábulo ou estábulo mais pasto), estações do ano (verão, outono e inverno), raças (Mestiça, Holandesa, Jersey e Girolanda) e as 15 dietas oferecidas.

A análise de variância (ANOVA) mostrou que entre as raças Jersey, Holandesa, Girolanda e Mestiça, existe diferença significativa, entre todos os triacilgliceróis estudados do C26 ao C54. O teste de Tukey mostrado na tabela 5, relaciona as diferenças dos triacilgliceróis nas respectivas raças.

Quando se analisa a variável estação de ano que neste estudo foi realizada no período do verão, outono e inverno, o resultado da análise mostrou que existe diferença significativa ($p < 0,05$) no período estudado nos triacilgliceróis C26, C28, C30, C32, C34, C36, C46, C48, C50 e C54. O teste de Tukey relaciona em quais estações do ano os triacilgliceróis são significativamente diferentes, sendo estas diferenças mostradas na tabela 6.

Analisando-se a localização do animal, obteve-se nesta variável duas possibilidades, a do animal ter se localizado no estábulo e pasto ou somente no

estábulo. O resultado da análise de variância (ANOVA) mostrou existir diferença significativa da localização do animal, nos triacilgliceróis C26, C28, C30, C32, C34, C36, C42, C44, C46, C50, C52 e C54; nos demais triacilgliceróis analisados C38, C40 e C48, não existe diferença significativa.

Tabela 5 – Resultado do Teste de Tukey para as diferenças entre as raças. Os triacilgliceróis descritos em cada quadro apresentam diferenças significativas entre as respectivas raças ($p < 0,05$).

Raças	Girolanda	Mestiça	Jersey	Holandesa
Girolanda	-	-	-	-
Mestiça	C26,C28,C30, C32,C34,C36, C38,C42,C44, C46,C52, C54	-	-	-
Jersey	C26,C28,C30, C32,C34,C36, C38,C40,C42,C44, C46,C52,C54	C26,C28,C30, C32,C34,C36, C40,C42,C44, C46,C50,C52, C54	-	-
Holandesa	C26,C28,C30, C38,C40,C48, C50-	C26,C28,C30, C32,C34,C36, C40,C42,C44, C46,C48,C50, C52,C54	C26,C28,C30, C32,C34,C36, C42,C44,C46, C50,C52,C54	-

Tabela 6 – Resultado do Teste de Tukey para a variável estação do ano. .Os triacilgliceróis descritos em cada quadro apresentam diferenças significativas entre as estações do ano ($p < 0,05$).

	Verão	Outono	Inverno
Inverno	C36,C46,C48,C54	C26,C28,C30,C48,C50	
Outono	C30,C32,C34,C36		
Verão	-	-	

A análise de variância (ANOVA) mostrou haver diferença significativa ($p < 0,05$) entre os triacilgliceróis e as dietas. O teste de Tukey que analisa a influência das 15 dietas em cada um dos triacilgliceróis mostrou haver diferença significativa ($p < 0,05$) em relação às 15 dietas oferecidas aos animais, nos 15 triacilgliceróis determinados. Pode-se observar que os triacilgliceróis que obtiveram maior diferença significativa entre as dietas foram o C26, C30, C32, C34, C36, C42, C44, C50, C52 e C54. As diferenças significativas de cada triacilglicerol em relação a cada uma das dietas podem ser observadas nos anexos 11 a 25.

6 – Conclusão

O método cromatográfico empregado mostrou ser eficiente na separação, identificação e quantificação dos triacilgliceróis da gordura do leite.

Foram identificados e quantificados 15 triacilgliceróis do C26 ao C54.

Boa reprodutibilidade foi conseguida, visto que o maior desvio padrão obtido foi o de 0,81, com coeficiente de variação menor que 10%.

A composição em triacilgliceróis da gordura do leite produzido na região de Campinas mostrou variação significativa em todos os triacilgliceróis, do C26 ao C54, em relação a raça do animal, época do ano, localização do animal (pasto ou estábulo) e tipo de ração.

7 - Referências Bibliográficas

1. ALONSO, L. Capillary gas chromatography of some triglycerides in cheese using programmed-temperature injection. **Chromatographia**. v. 35, n. 9, p. 649-652. 1993.
2. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. AOAC International. 16^a ed. Gaithersburg, Maryland. USA. 1997.
3. BARRON, L. J. R.; HIERRO, M. T. G.; SANTA-MARIA, G. HPLC and GLC analysis of the triglyceride composition of bovine, ovine and caprine milk fat. **Journal of Dairy Research**. v. 57, p. 517-526. 1990.
4. GEERAERT, E. & DE SCHEPPER, D. Structure of triglycerides by chromatographic techniques. part1: capillary gc of ozonized triglycerides. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**. v. 5, n. 2, p. 80-84. 1982.
5. GEERAERT, E. & SANDRA, P. Capillary GC of triglycerides in fats and oils using a high temperature phenylmethylsilicone stationary phase, part 1. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**. v. 8, n. 8, p. 415-422. 1985.

6. GRETI, J.; BUGAUT, M.; BEZARD, J. Composition of molecular species of triacylglycerols in bovine milk fat. **Journal of Dairy Science**. v. 76, p. 1850-1869. 1993.
7. HUEBNER, V. R. The analysis of glycerides by high temperature gas-liquid partition chromatography. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 38, p. 628-631. 1961.
8. LECKER, G.; FREGA, N.; BOCCI, F.; BERTACCO, G. Il grasso del latte, l'esame gas cromatografico dei triacilgliceroli nell'accertamento della genuinità del burro. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**. v. 43, n. 2, p. 95-110. 1992.
9. LEE, T. W. & HASTILOW, C. I. Quantitative determination of triacylglycerols profile of structured lipid by capillary supercritical fluid chromatography and high-temperature gas chromatography. **Journal of American Oil Chemists' Society**. v. 6, n. 12, p. 1405-1413. 1999.
10. LUND, P. Analysis of butterfat triglycerides by capillary gas chromatography. **Milchwissenschaft**. v. 43, n. 3, p. 159-161. 1988.
11. MANIOGUI, C.; GRETI, J.; BUGAUT, M.; GAUTHIER, S.; BEZARD, J. Determination of bovine triacylglycerols by reversed-phase liquid chromatography and gas chromatography. **Journal of Chromatography**. v. 543, p. 81-103. 1991.
12. MOKKENTIN, J. & PRECHT, D. Comparison of packed and capillary columns for quantitative gas chromatography of triglycerides in milk fat. **Chromatographia**. v. 39, n. 5/6, p. 265-270. 1994.
13. MOKKENTIN, J. & PRECHT, D. Entwicklung einer kapillar-GC-methode zur schnellen triglyceridanalytik von milchfetten. **Fat Science Technology**. v. 97, n. 2, p. 43-49. 1995.

14. PENTON, Z. Part I. Triglycerides and cholesteryl esters in foods. Disponível em: <<http://www.varianinc.com/csb/gcnotes/gc22.html>>. Acesso em: 29/01/2000.
15. PRECHT, D. Control of milk fat purity by gas chromatography triglyceride analysis. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**. v. 43, n. 3, p. 219-242. 1991.
16. PRECHT, D. Detection of foreign fat in milk fat. **Z Lebensmittel Untersuchung und Forschung**. v. 194, p. 1-8. 1992.
17. TMMS, R. E. Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats. **Journal of Dairy Research**. v. 47, p. 295-303. 1980
18. TRAITLER, H. & PRÉVÔT, A. gas chromatographic separation of triglycerides according to their degree of unsaturation on glass capillary columns. **Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications**. v. 4, n. 3, p. 109-114. 1981.

Capítulo 6

Metodologia Analítica para Determinação de Adulteração em Gordura de Leite

Capítulo 6 – Metodologia Analítica para Determinação de Adulteração em Gordura de Leite

1 – Resumo

O objetivo deste estudo foi desenvolver uma metodologia analítica capaz de caracterizar a autenticidade da gordura do leite e seus derivados. A pureza da gordura do leite foi avaliada pela análise de seus triacilgliceróis por cromatografia gasosa usando alta temperatura e injetor com programação de temperatura, levando-se em conta a sua variabilidade relacionada a fatores genéticos, climáticos e alimentares. Baseado neste estudo foi aplicada análise estatística fatorial no perfil de triacilgliceróis da gordura de leite genuína, na qual foram monitoradas todas as variáveis, que de acordo com a literatura são capazes de modificar a sua composição e nos dados de adulteração da gordura genuína com óleos vegetais de soja, girassol e milho na proporção de 5, 10 e 20%. Este estudo proporcionou a elaboração de um programa de computador, capaz de determinar a adulteração de gordura de leite com gordura estranha, na faixa de 10% ou mais. Este estudo estatístico foi comparado com o estudo feito por regressão linear múltipla proposta por Timms (1980) para gorduras de leite australianas e por Precht (1991 e 1992) para gorduras de leite germânicas.

2 – Summary

The objective of this study was to characterize the authenticity of milk and milk products. Purity of milk fat was evaluated by analysis of its triacylglycerols by high temperature gas chromatography with a programmed temperature injector, wherein variability related to genetic, climatic and feeding factors was taking into

consideration. Based on this study, a factorial statistical analysis was applied to the triacylglycerol profile of genuine milk fat, in which all the variables which, according to the literature, are capable of modifying the composition, were monitored; and to the data related to genuine milk fat that was adulterated with soybean, sunflower and corn oils, in a proportion of 5, 10 and 20%. Said study has been compared with the study performed by multiple linear regression proposed by Timms (1980) concerning Australian milk fat; and by Precht (1991 and 1992) concerning German milk fat.

3 – Introdução

De acordo com Younes & Soliman (1986) o conhecimento da composição da gordura do leite, de outras gorduras animais e de óleos vegetais, pode ser útil no estudo da adulteração, pois com o conhecimento da composição de cada uma destas gorduras, é possível se saber a faixa normal de variação de um determinado elemento nesta gordura, e este ser um indicador da adulteração.

No leite de mamíferos a gordura é qualitativa e quantitativamente muito variada, tornando-se um problema, devido a não se ter um componente específico, quando se deseja determinar a adulteração.

Os primeiros testes para determinar a adulteração foram realizados através testes químicos como Reichert-Meissl e Polenske (Laruelle et al., 1976), que determinam os ácidos graxos solúveis e insolúveis em água.

Parodi em 1972, relacionou dois métodos para determinar a autenticidade da gordura de leite: determinação do perfil de triacilgliceróis e análise de esteróis. Neste trabalho, Parodi subestimou a variação da composição da gordura do leite, e este fato conduz a resultados errôneos, apesar desta técnica contribuir para a determinação da adulteração de gordura de origem vegetal e animal. O método

de determinação de esteróis é útil na determinação de adulteração somente por gordura de origem vegetal.

Precht (1992) descreve métodos por cromatografia gasosa de ácidos graxos, triacilgliceróis e esteróis, para determinar a autenticidade da gordura do leite pelo estudo do perfil de ácidos graxos ou triacilgliceróis e relações entre estes componentes, levando-se em conta a variabilidade deste perfil, em relação a fatores genéticos, climáticos e alimentares. Tendo como base esta variabilidade, é possível definir correlações fundamentais entre os componentes.

Em 1980 Timms demonstrou que era possível determinar a adulteração da gordura do leite da Austrália com gorduras estranhas, através de uma análise estatística de dados autênticos. Descreveu uma fórmula fazendo uso dos triacilgliceróis C40, C42 e C44, utilizando regressão linear múltipla.

Em 1991 Precht publicou um artigo sobre o controle da pureza da gordura do leite, e definiu que para gorduras de leite da Europa a fórmula de Timms, não se aplicava, devido a maior variabilidade dos dados, e assim, usando a mesma idéia de Timms, pesquisou a variabilidade da gorduras autênticas de seu país, formulando assim uma equação geral e outras específicas para cada tipo de adulteração, utilizando na equação geral os triacilgliceróis C26, C28, C30, C32, C34, C40, C42, C44 e C46.

Em 1992 Precht refez seus cálculos baseando-se na análise de triacilgliceróis de 755 gorduras de leite e 20 gorduras estranhas. Em todas estas gorduras analisadas, foram realizadas misturas simuladas em computador com diferentes quantidades de gorduras estranhas, e então, foi fixada como gordura modificada de leite, aquela que apresentasse pelo menos um dos triacilgliceróis fora da faixa de variação medida para gordura de leite. A fórmula, então estabelecida, através de procedimentos estatísticos delineados no artigo, permitiu a detecção de gordura estranha com substancial melhora na sensibilidade. Os

triacilgliceróis que compõem a equação geral são: C32, C35, C44, C46, C48 e C50.

Contarini & Battelli (1993) usaram a fórmula proposta por Precht para determinar a autenticidade da gordura de leite, através da análise de triacilgliceróis por cromatografia gasosa. Conseguindo, deste modo, determinar a adição de cerca de 5 a 10% de gordura estranha na gordura do leite.

Contarini & Battelli (1997) aplicaram o método oficial da Comunidade Européia na avaliação da autenticidade da gordura de leite. O método é válido apesar de necessitar de uma longa fase experimental pois requer numerosos testes interlaboratoriais, a fim de se determinar uma faixa precisa de variação dos triacilgliceróis.

Banfi & Bergna (1999) verificaram a pureza de gordura do leite pelo método oficial da União Européia (EU), que é baseado na determinação por cromatografia gasosa dos triacilgliceróis de acordo com o total de número de átomos de carbono, seguida da aplicação da fórmula derivada da regressão linear múltipla. O método oficial sugere a injeção "on-column", no entanto, eles usaram a injeção com programação de temperatura, conseguindo obter os mesmos resultados de repetibilidade e reprodutibilidade estabelecidos pelo método oficial.

Na literatura, vários tipos de adulterantes da gordura do leite são citados. Hendrickx & Huyghebaert (1971), descreveram as gorduras de substituição, compreendendo as gorduras que foram modificadas para imitar da melhor maneira possível a gordura butírica. São assim consideradas as gorduras naturais ou misturas de gorduras naturais, as gorduras interesterificadas, óleo de coco ou de palmiste (tendo em vista obter uma quantidade suficiente de ácidos graxos de cadeia média), triacilgliceróis sintéticos como a tributirina -C₁₂H₂₃O₆- (visando aumentar a quantidade de ácidos graxos de cadeia curta) e a tricaprina, a fim de normalizar a relação C12:0/C10:0. Além das gorduras de origem vegetal, como óleo de soja e de girassol e gordura animal.

As gorduras de origem vegetal mais utilizadas como adulterantes são óleos de girassol; algodão; soja, soja e algodão parcialmente hidrogenado, coco; mistura de 60% de margarina de óleo de milho hidrogenado e 40% de creme de manteiga doce, margarina e leite de soja; oliva, palma; parte comestível do gérmen de trigo e óleo de gérmen de trigo (Parodi, 1972; Younes & Soliman, 1986; Soliman & Younes, 1986; Fox et al., 1988; Duthie et al., 1988; Sato et al., 1990; Precht, 1991; Precht, 1992; Lercker et al., 1992; Fuente & Juarez, 1999).

As gorduras de origem animal mais citadas na literatura como adulterantes são o sebo, toucinho e a banha de porco (Soliman & Younes, 1986; Precht, 1991; Precht, 1992; Lercker et al., 1992; Fuente & Juarez, 1999).

Collomb & Spahni (1991) descreveram vários tipos de adulterantes de gordura de leite para consumo humano e animal. Entre os adulterantes da gordura de leite para consumo humano cita as gorduras de substituição, compreendendo as margarinas, bebidas de soja e as gorduras sintéticas; os produtos de imitação compreendendo as misturas de manteiga e gorduras vegetais; misturas com gorduras tecnologicamente modificadas, como gorduras vegetais submetidas à hidrogenação e transesterificação.

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método analítico e estatístico para determinação de adulteração em gordura de leite.

4 - Material e Métodos

4.1 – Material

Amostras de leite foram coletadas duas vezes ao mês, no início do verão até o final do período do inverno. A definição do período de coleta, baseou-se no trabalho de Precht (1992), que caracterizou a gordura do leite durante todas as

estações do ano. Como em nosso país não possuímos estações do ano suficientemente definidas, foi escolhido o período de 9 meses, visto que não há diferenças de temperatura significativas entre a primavera e o outono.

Foram escolhidas 4 raças de animal: Mestiça, Holandesa, Jersey e Girolanda, disponibilizadas pelos produtores da Cooperativa dos Produtores de Leite da Região de Campinas, denominados respectivamente de produtor A, B, C e D.

Foram realizadas 19 coletas de amostras de leite onde foram monitoradas algumas variáveis, sobre os animais, que de acordo com a literatura são importantes na variação da composição da gordura do leite, tais como: alimentação oferecida; localização do animal, pasto ou estábulo e época do ano em que foi realizada a coleta, isto é, verão, outono e inverno. A monitoração das variáveis foi realizada através de um formulário simples, fornecido a Cooperativa que deveria ser preenchido no período da coleta e que pode ser visto no anexo 1.

Amostras de óleo de soja, milho e girassol, utilizadas para adulteração da gordura do leite foram adquiridas no mercado local. A adulteração foi realizada pela adição de 5, 10 e 20 % de cada óleo na gordura do leite de um dos produtores, escolhido aleatoriamente.

4.2 – Preparação da amostra

4.2.1 – Extração da gordura

A extração da gordura do leite puro e adulterado foi realizada através do método Rose-Gottlieb que é indicado para produtos lácteos, de acordo com o Método 905.02, item 33.2.25 da Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1997).

O método Rose-Gottlieb é usado principalmente em produtos lácteos e envolve a precipitação e solubilização da proteína por etanol e amônia respectivamente, e subsequente extração da gordura com uma mistura de éter etílico e éter de petróleo.

4.2.2 – Separação dos triacilgliceróis

A separação da gordura foi realizada por extração em fase sólida, de acordo com Lercker, G. et al. (1992).

Numa coluna de vidro adicionou-se 500 mg de sílica 60 (Merck) e em seguida cerca de 1,0 cm de sulfato de sódio. O acondicionamento da coluna foi realizado através da passagem pela coluna de 3 mL de hexano. Cerca de 0,02g de gordura foi dissolvida em hexano e carregada no topo da coluna. Os triacilgliceróis foram eluídos por adição de 3 mL de hexano, seguida de 3 mL de solução hexano:éter etílico (8:2). A solução eluída da coluna foi levada à secar em banho-maria (50-60°C) e diluída em 10 mL de hexano com grau de pureza cromatográfica. Um volume de 1,0 µL da amostra foi injetado no cromatógrafo.

4.3 – Método

4.3.1 – Equipamento

Cromatógrafo gasoso marca Varian 3400, equipado com coluna capilar de sílica fundida de 30m de comprimento por 0,32mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,1 µm com fase estacionária de 5% fenil 95% metilsilicone DB5HT (J&W), com temperatura limite de uso de 400°C. Injetor Varian 7865 com programação de temperatura. Detector de ionização de chama.

Processamento dos dados - realizado por MS-DOS_6 – “Star Chromatography Workstation”.

4.3.2 – Reagentes

Solução - padrão - 5 triacilgliceróis saturados C30 (tricaprilina - Sigma), C36 (trilaurina - Sigma), C42 (trimiristina - Sigma), C48 (tripalmitina - Sigma) e C54 (triestearina - Sigma), dissolvidos em hexano (Li Chrosolv) em concentrações semelhantes.

4.3.3 – Condições cromatográficas

Programação do injetor

Temperatura inicial de 100°C com isoterma de 15 segundos, em seguida a temperatura foi elevada para 380°C, numa razão de 200°C/minuto.

A injeção foi realizada no modo “splitless” pelo período de 2 minutos. No período em “split” a razão foi 1:25.

Programação da coluna

Temperatura inicial da 210°C, com isoterma de 1 minuto Logo depois a temperatura foi aumentada para 250°C na razão de 20°C/minuto, isoterma de 1 minuto e posterior aumento para 360°C na razão de 4°C/minuto.

Detector

Detector a temperatura de 400°C.

Gases – hidrogênio com fluxo de 30 mL/minuto, nitrogênio com fluxo de 30 mL/minuto e ar sintético com fluxo de 300 mL/minuto.

Fase móvel

O gás de arraste usado foi o hidrogênio com velocidade linear de 2,1 cm/minuto.

4.4 – Análise qualitativa e quantitativa

A identificação foi realizada através da comparação dos tempos de retenção (t_r) e do tempo de retenção corrigido (t_r') dos picos da amostra analisada com o de padrões, e a técnica de co-eluição (spiking) de padrões junto com amostra.

A quantificação foi realizada por normalização interna, com obtenção da porcentagem relativa de cada fração de triacilgliceróis.

4.5 – Análise estatística

Para verificar diferenças entre a composição da gordura do leite puro, considerando toda a sua variação durante o período de coleta, e as gorduras de leite adulterada com óleos vegetais, os dados primários obtidos dos cromatogramas dos 15 triacilgliceróis foram analisados pela técnica Estatística Multivariada de Análise Fatorial com rotação promax. Com a análise fatorial obteve-se três fatores que foram submetidos à Análise Discriminante, resultando em duas funções discriminantes que proporcionaram a criação de uma planilha de cálculo no Excel para se obter uma regra de decisão, capaz de determinar se os dados de uma amostra desconhecida é constituída de gordura pura ou adulterada. Utilizou-se o pacote estatístico SPSS (Statistical Package Software System).

5 - Resultados

Os dados referentes à análise de triacilgliceróis, durante os períodos do verão, outono e inverno, das coletas de leite dos produtores A, B, C e D, que correspondem respectivamente às raças Mestiça, Holandesa, Jersey e Girolanda, são mostradas na Tabela 1, onde pode-se verificar a faixa de variação da concentração de cada triacilglicerol, durante a época de coleta bem como a média e desvio padrão. Dentro

desta faixa de concentração estão incluídas as variações devido ao tipo de alimentação (15 dietas diferentes) e localização do animal (pasto ou estábulo). As figuras 1 a 4 mostram os cromatogramas do perfil dos triacilgliceróis obtidos em cada raça e a figura 5 mostra a concentração média dos triacilgliceróis durante o período da coleta de acordo com a raça.

A raça Girolanda apresentou uma maior variação percentual para os triacilgliceróis de baixo e médio peso molecular em relação as demais raças, porém o maior percentual para os triacilgliceróis de alto peso molecular foi apresentado pela raça Mestiça.

Os dados referentes à análise de triacilgliceróis da gordura adulterada com 5, 10 e 20% de óleos de soja, girassol e milho podem ser vistos nos anexos 26 a 28.

5.1 – Análise fatorial

O objetivo da análise fatorial é reduzir o número de variáveis, porque com os 15 triacilgliceróis identificados e quantificados, temos um espaço com 15 dimensões (C26 a C54) e temos de reduzi-los para um espaço menor. A análise fatorial, produz uma matriz, $[n \times p]$, onde n = número de amostras e p = número de variáveis ou triacilgliceróis (C26 a C54), respectivamente em linhas e colunas, correspondendo a 228×15 , ou seja, 3420 dados. A partir desta matriz aplica-se o

método de extração de componentes principais, que delimita as áreas onde se encontram os fatores mais importantes, e que estão dispostos em sua diagonal. A tabela 2 mostra os 15 fatores ou 15 novas variáveis obtidos, que explicam 100% da variabilidade dos dados. A escolha de somente três fatores baseou-se no resultado do autovalor do fator, que deve ser maior que 1 ou na variância explicada que deve ser maior que 10%. Portanto, os 3 primeiros fatores possuem este alvo e foram os escolhidos, explicando 96,2% da variabilidade dos dados. No gráfico do anexo 29, verifica-se que a partir do terceiro os demais fatores possuem baixos significados. O primeiro fator correspondendo a correlações de primeira ordem, encontra-se os triacilgliceróis que possuem maior correlação entre si e explica 70,7% da variabilidade dos dados, o segundo fator onde se encontram os triacilgliceróis que possuem correlação mediana, correlações de segunda ordem, explica 15,8% e o terceiro fator com os triacilgliceróis de baixa correlação (correlações de terceira ordem) explica 9,7%.

Tabela 1 – Composição de triacilgliceróis da gordura do leite em %, determinados por cromatografia gasosa.

T	Mestiça			Holandesa			Girolanda			Jersey		
	Min	Máx	M±dp	Min	Máx.	M±dp	Min	Máx.	M±dp	Min	Máx.	M±dp
C26	0,08-0,20		0,12±0,0 _A	0,09-0,24		0,16±0,03	0,13-0,30		0,21±0,0 _A	0,13-0,25		0,19±0,0 ₉
C28	0,25-0,56		0,37±0,0 ₉	0,31-0,76		0,5±0,1	0,41-1,04		0,7±0,1	0,44-0,82		0,6±0,1
C30	0,50-1,04		0,7±0,2	0,57-1,29		1,0±0,2	0,84-1,85		1,4±0,2	0,80-1,40		1,1±0,2
C32	0,94-2,06		1,3±0,3	1,15-2,51		2,0±0,4	1,81-3,61		2,8±0,4	1,62-2,60		2,1±0,3
C34	2,47-4,92		3,5±0,6	2,90-5,49		4,6±0,7	4,48-7,14		5,9±0,6	3,88-5,48		4,8±0,4
C36	6,71-9,87		8,4±0,8	7,00-11,08		9,7±1,1	9,56-12,58		11,3±0,8	8,52-10,89		9,9±0,7
C38	11,64-6,12		14±1	11,21-15,18		13,6±0,8	12,88-14,82		13,6±0,6	13,02-15,60		14,1±0,7
C40	10,36-14,42		12±1	9,70-13,02		11,3±0,7	10,43-12,69		11,2±0,5	10,47-13,80		12±1
C42	4,80-6,99		5,7±0,5	5,28-7,76		6,6±0,6	6,46-8,95		8,0±0,7	6,04-7,22		6,8±0,4
C44	3,55-6,20		4,7±0,6	4,89-7,06		5,9±0,6	5,91-8,36		7,4±0,6	5,24-6,34		5,8±0,3
C46	4,25-6,83		5,4±0,6	5,67-7,88		6,6±0,6	6,71-8,16		7,5±0,4	5,85-7,26		6,4±0,4
C48	6,60-8,88		7,8±0,6	7,21-9,73		8,5±0,7	7,73-9,18		8,3±0,4	7,25-9,56		8,1±0,7
C50	10,79-14,72		13±1	10,16-15,14		11,9±1,1	8,03-12,07		10±1	9,66-13,20		11,0±0,9
C52	11,38-20,33		15,7±2,3	9,51-17,91		12,4±2,3	5,90-13,00		8,6±1,6	8,79-14,84		11,6±1,4
C54	3,93-11,33		7,8±1,9	2,44-8,33		5,4±1,7	2,06-6,07		3±1	2,10-8,29		5,3±1,7

T – Triacilglicerol

Faixa de variação: Min = mínimo, Máx = máximo

M±dp = média ± desvio padrão de 19 amostras durante 9 meses.

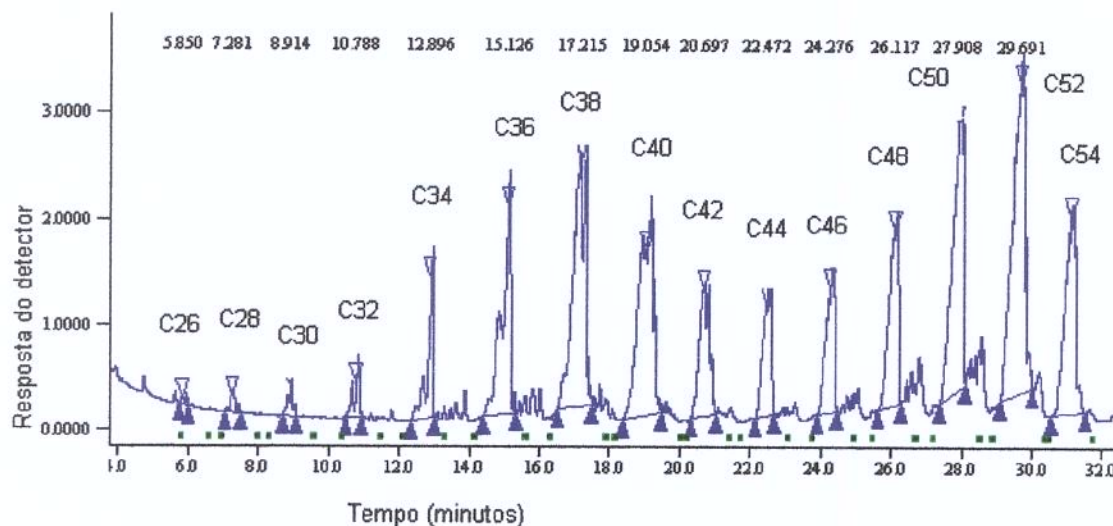


Figura 1 – Perfil de triacilgliceróis da gordura de leite de vaca Mestiça – Produtor A. Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-100-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção "splitless"-2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min.

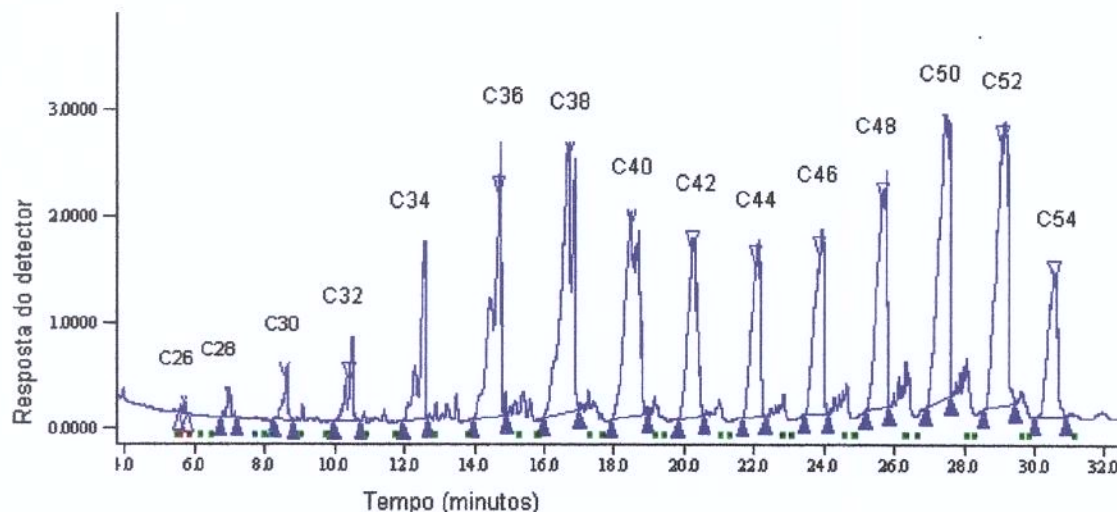


Figura 2 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite de vaca Holandesa – Produtor B. Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-100-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção "splitless"-2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min.

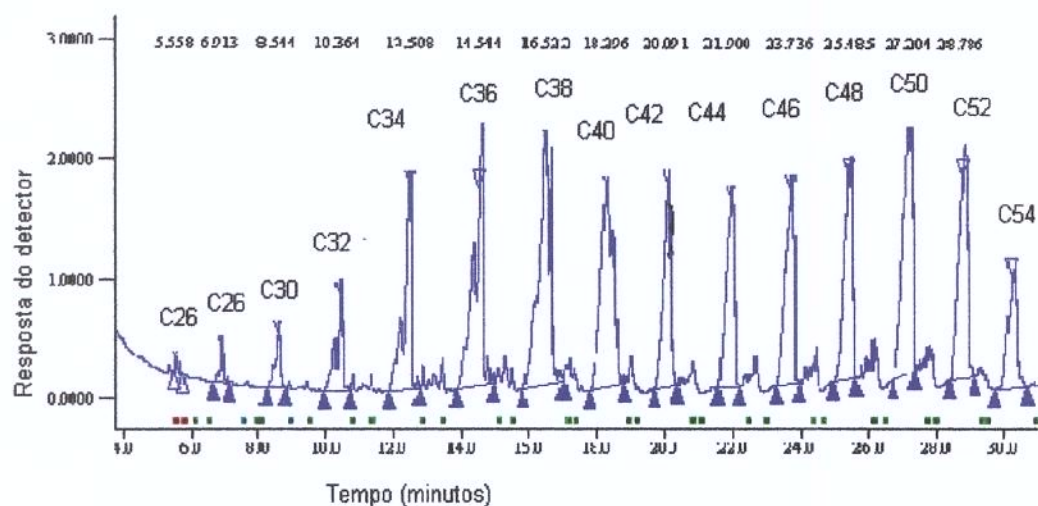


Figura 3 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite de vaca Girolanda – Produtor C. Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-100-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção "splitless"-2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min.

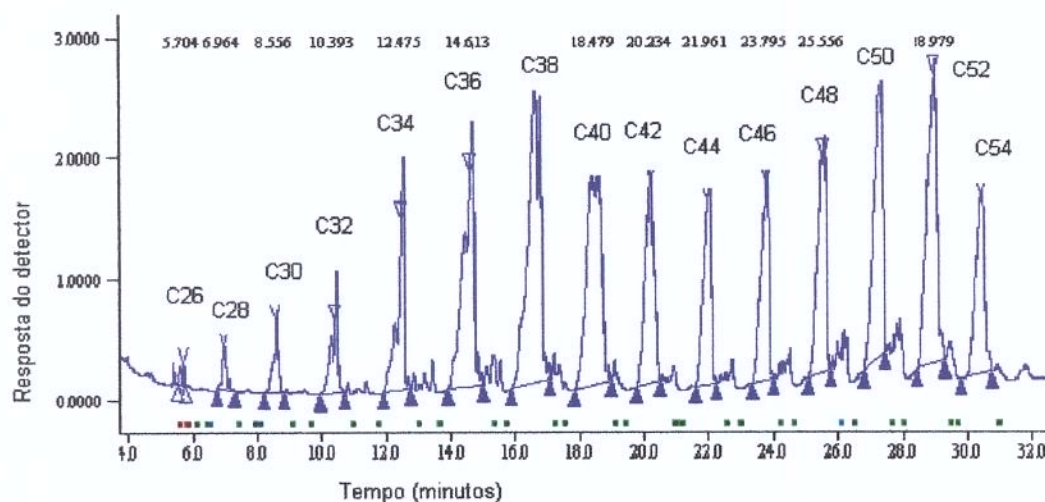


Figura 4 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite de vaca Jersey – Produtor D. Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-100-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção "splitless"-2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min.

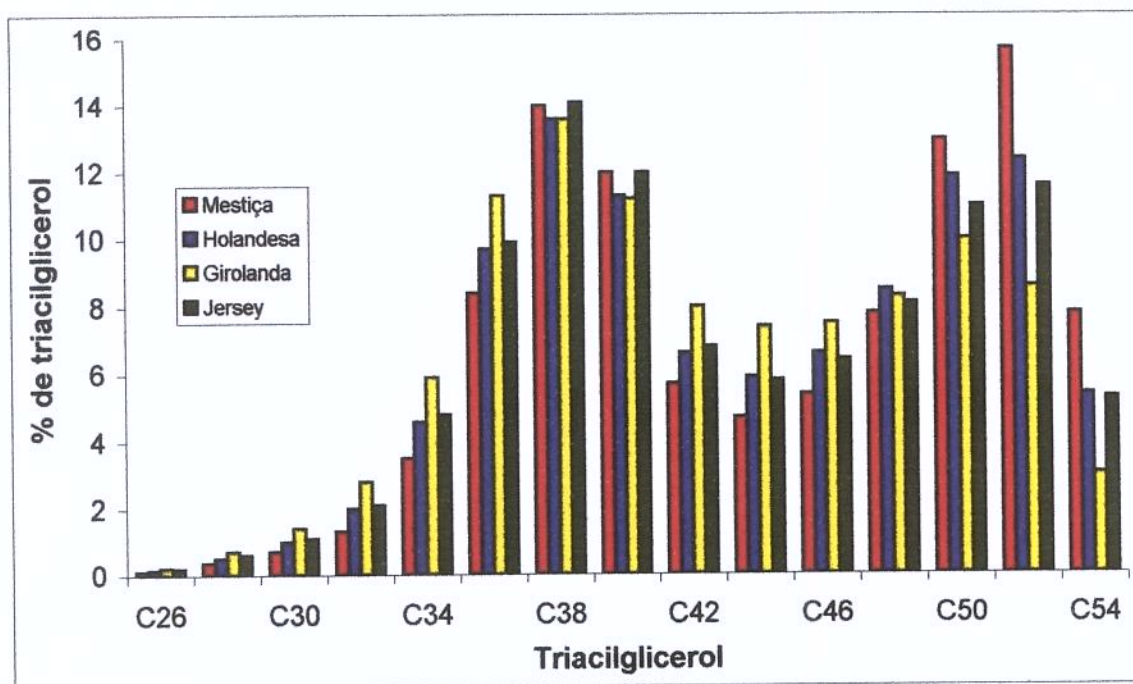


Figura 5 – Concentração média de triacilgliceróis durante a coleta de acordo com a raça.

Cada fator corresponde a uma função do tipo, $F_{1,2,3} = \sum w_i C_n$, onde w_i são os pesos correspondentes e C_n o triacilglicerol. A composição dos três fatores e seus respectivos pesos, que determinam a importância relativa de cada década uma das variáveis originais dentro do fator, está descrita na tabela 3.

Verifica-se que no primeiro fator os triacilgliceróis de maior peso molecular, C50, C52 e C54, estão em oposição aos de médio e baixo peso molecular, ocorrendo o mesmo fato no segundo (C52 e C54) e no terceiro fator (C54). Todos os triacilgliceróis possuem pesos em todos os fatores, porém estes foram omitidos quando o seu peso foi desprezível no respectivo fator. A tabela completa pode ser vista no anexo 30.

A matriz de covariância mostrou que todos os fatores são independentes, sendo, portanto possível plotá-los. A figura 6 mostra o espaço onde estão localizados os três fatores com seus respectivos triacilgliceróis de maior importância. As figuras 7 a 9 mostram a visualização destes fatores no espaço de duas dimensões aplicado aos dados de leite puro e adulterado, e observa-se que os dados do leite adulterado concentram-se próximos a alguns dados do leite puro, podendo ser confundidos com estes últimos.

Após a formação da matriz de correlação e delineamento dos fatores foi montada uma nova matriz $[n \times p]$, onde n (linha) corresponde aos fatores e p (colunas) os triacilgliceróis, e novas constantes foram produzidas. A soma de cada coluna resultou no denominado escore fatorial, para cada um dos respectivos fatores. A partir destes dados foi possível delinear modelos para visualizar os dados estudados no espaço tridimensional, figura 10, e no plano, figuras 11 a 13. Observa-se na figura 10 que os dados de leite puro e adulterados estão agora mais condensados.

Tabela 2 – Análise de componentes principais e variação aplicada aos três fatores.

Compo nentes	Autovalores iniciais			Soma de quadrados de extração			Soma de quadrados com rotação		
	Total	% de variação	% acu- mulada	Total	% de variação	% acu- mulada	Total	% de variação	% acu- mulada
1	10,606	70,704	70,704	10,606	70,704	70,704	8,339	55,591	55,591
2	2,377	15,849	86,552	2,377	15,849	86,552	3,962	26,415	82,006
3	1,453	9,684	96,236	1,453	9,684	96,236	2,134	14,230	96,236
4	0,198	1,320	97,556						
5	0,170	1,136	98,692						
6	8,457e-2	0,564	99,256						
7	4,611e-2	0,307	99,563						
8	2,211e-2	0,147	99,711						
9	1,486e-2	9,903e-2	99,810						
10	1,362e-3	9,079e-2	99,901						
11	7,847e-3	5,231e-2	99,953						
12	2,899e-3	1,933e-2	99,972						
13	2,467e-3	1,645e-2	99,989						
14	1,140e-3	7,601e-3	99,996						
15	5,504e-4	3,669e-3	100,00						

Tabela 3 – Matriz de componentes rotacionados mostrando a composição dos 3 fatores e seus respectivos pesos.

	Componentes		
	1	2	3
C50	-0,970		
C28	0,960		
C30	0,960		
C26	0,948		
C32	0,943	0,320	
C34	0,881	0,452	
C42	0,812	0,534	
C52	-0,768	-0,578	
C44	0,768	0,623	
C36	0,751	0,572	
C48		0,973	
C46	0,615	0,782	
C54	-0,417	-0,760	-0,465
C40			0,972
C38			0,909

Método de rotação: Varimax com Normalização Kaiser.

Rotação convergida em 5 iterações.

A figura 11 mostra que no escore do fator 1 os dados do leite adulterado estão contidos dentro da faixa de dados do leite puro, concluindo-se que este fator não é capaz de diferenciar estes dois grupos. Na figura 12 os dados do leite puro encontram-se numa faixa amplamente diferenciada, concluindo-se que o fator 2 é capaz de diferenciar os dois grupos de leite. Na figura 13 observa-se que uma pequena faixa dos dados de leite adulterado encontram-se na faixa de leite puro.

Rotação dos Fatores

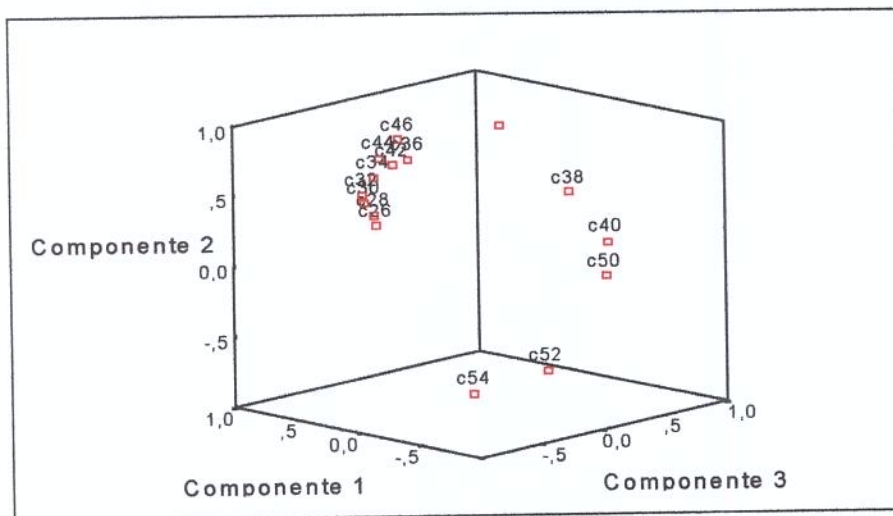


Figura 6 – Gráfico da Rotação dos 3 Fatores, mostrando onde estão localizados os triacilgliceróis no espaço tridimensional.

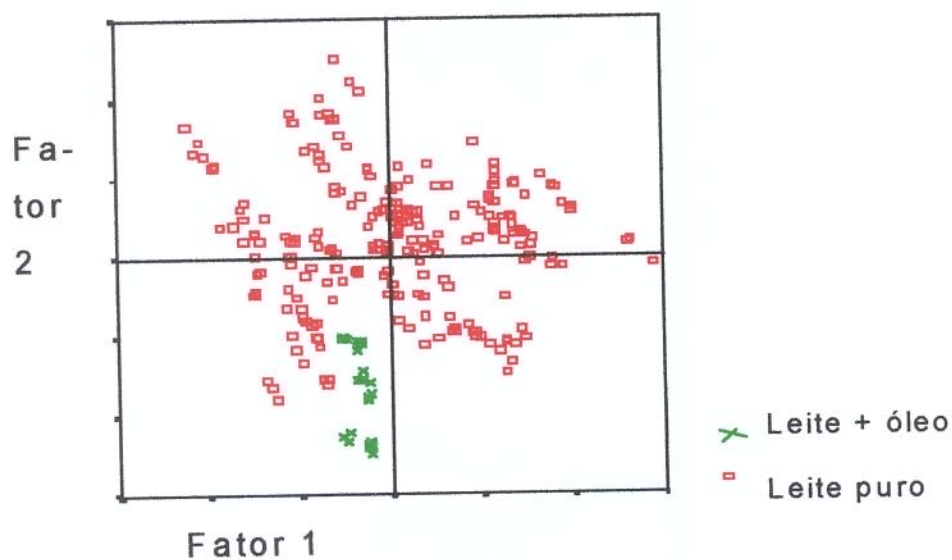


Figura 7 – Fator 1 e fator 2 vistos no plano, mostrando os dados de leite puro e adulterado.

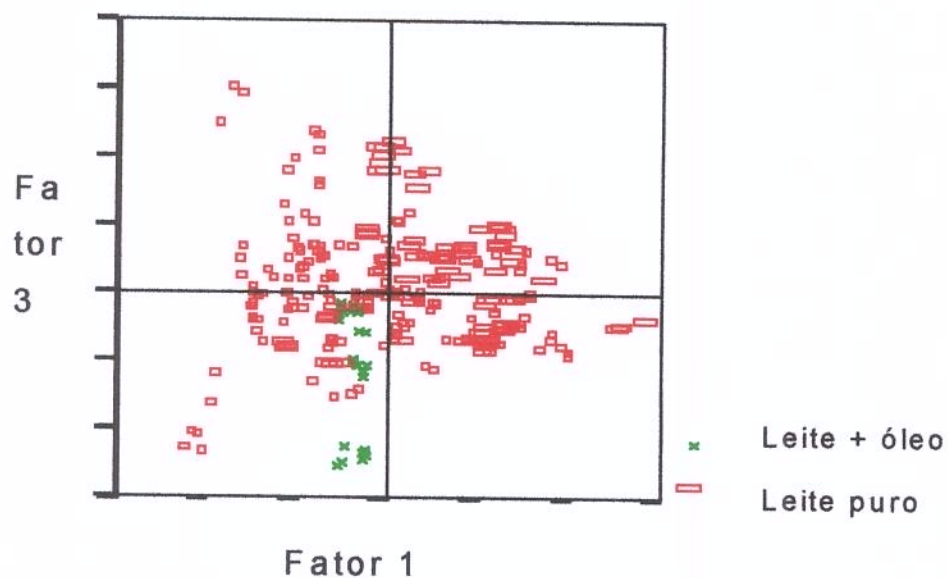


Figura 8 – Fator 1 e fator 3 vistos no plano, mostrando os dados de leite puro e adulterado.

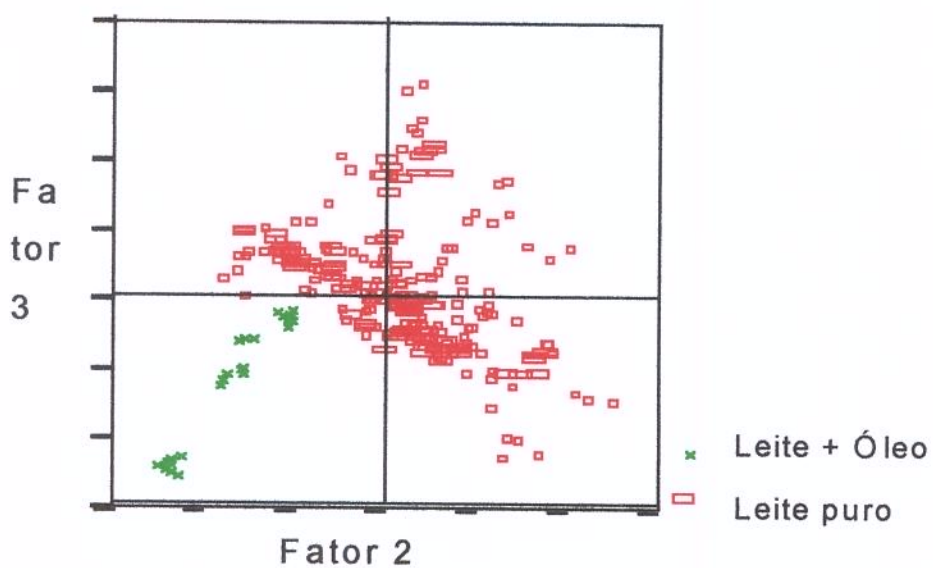


Figura 9 – Fator 2 e fator 3 vistos no plano, mostrando os dados de leite puro e adulterado.

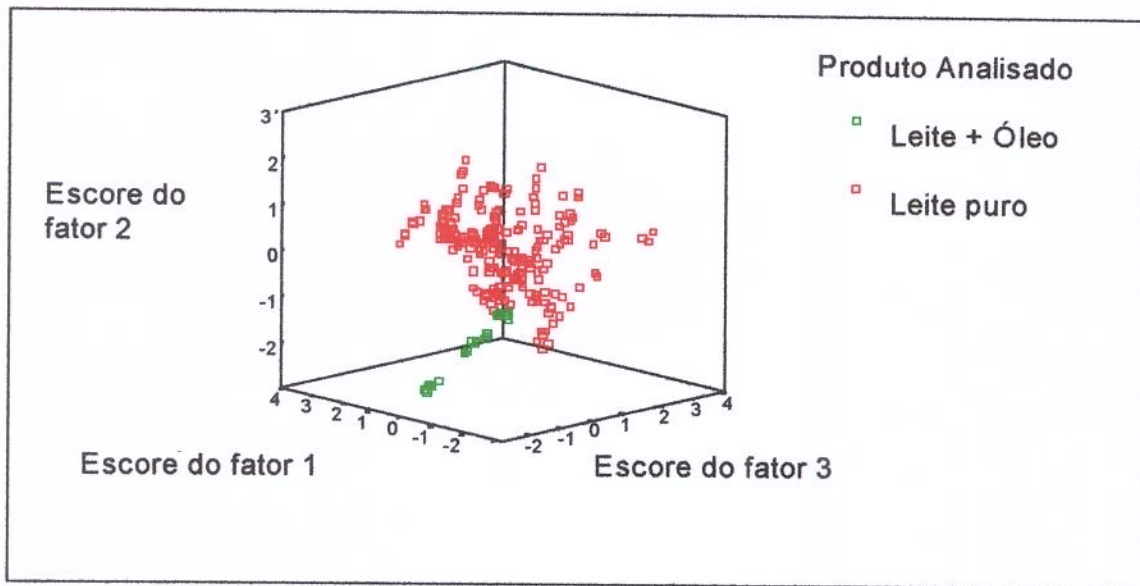


Figura 10 – Gráfico dos escores do leite puro e adulterado em cada um dos fatores

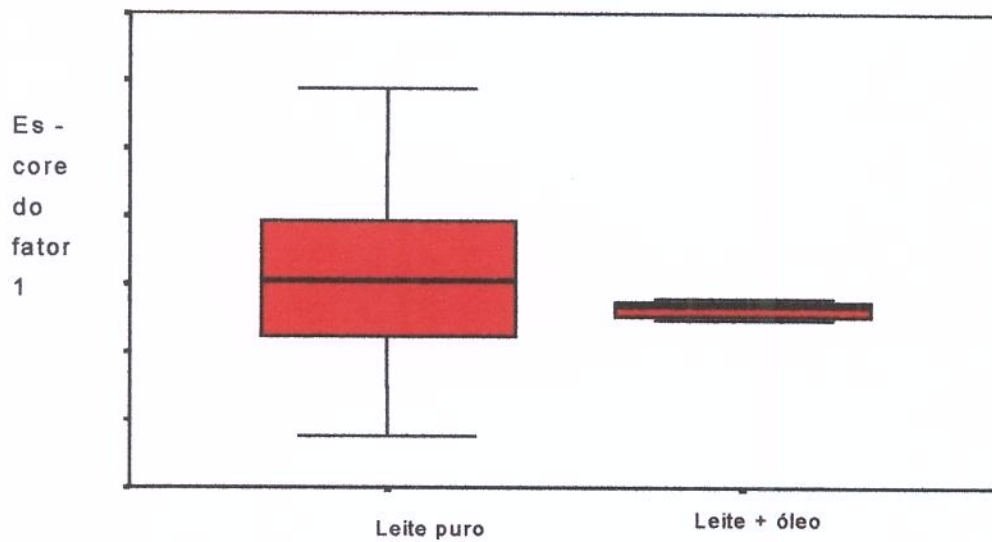


Figura 11 – Fator 1 mostrando os escores do leite puro e adulterado com óleos de soja, milho e girassol.

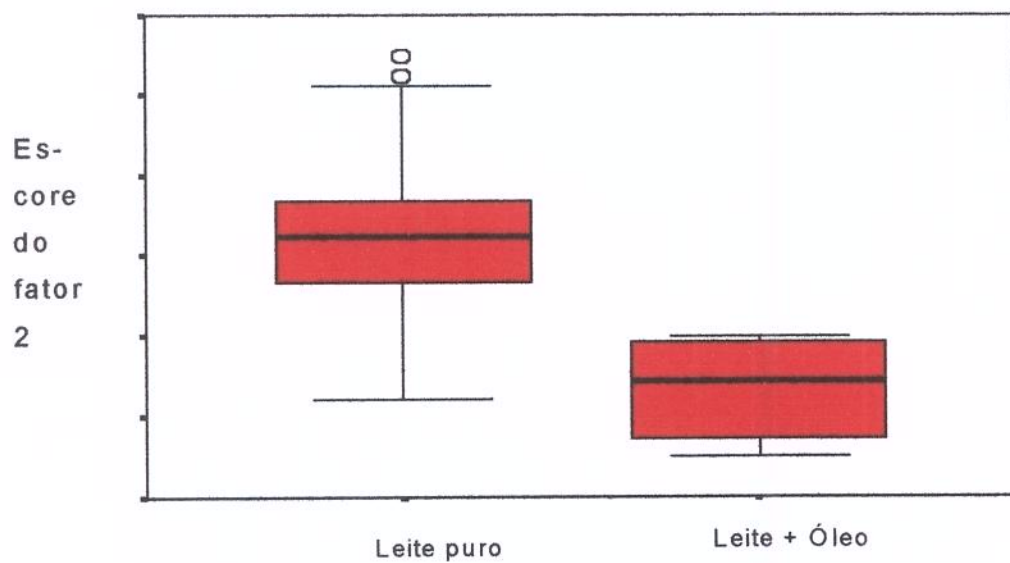


Figura 12 – Fator 2 mostrando os escores do leite puro e adulterado com óleos de soja, milho e girassol.

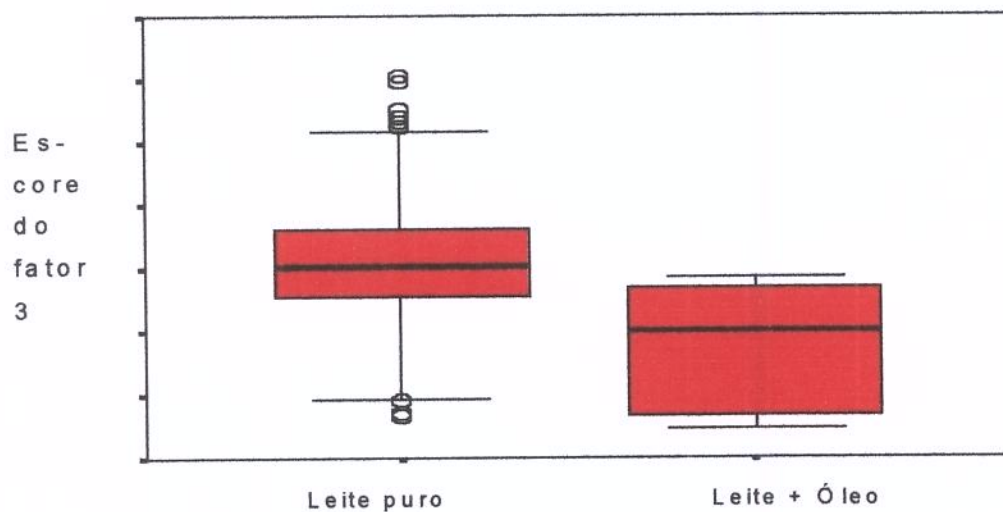


Figura 13 – Fator 3 mostrando os escores do leite puro e adulterado com óleos de soja, milho e girassol.

O teste de variância mostrou que o fator 1, 2 e 3 para o leite puro diferem significativamente do leite adulterado ($p < 10\%$).

Verificou-se através do teste t de médias que o fator 1 é significativamente diferente no intervalo de confiança de 95%, o fator 2 no intervalo de confiança de 10% e o fator 3 não é significativamente diferente. Estes dados estão descritos no anexo 31. Confirmando-se então, que os três fatores deveriam ser usados para discriminar os dados.

5.2 – Análise discriminante

É necessário definir uma função que selecione quais os fatores ou grupo de fatores que são capazes de discriminar leite puro de leite adulterado. A análise das variáveis (“step wise”), anexo 32, demonstrou que os três fatores devem participar desta função, pois o valor de Lambda de Wilks é alto. De acordo com o teste do coeficiente da função discriminante canônica obteve-se o julgamento que o fator mais importante é o fator 2, com coeficiente de 1,153, o segundo fator em importância é o 3, com coeficiente de 0,825 e o terceiro o fator 1 com coeficiente de 0,249. No teste da qualidade da função, no anexo 20, observa-se que a função é dita boa, porque: $\lambda = 0,481$, $\rho = 0,00$ ($< 0,05$), $\chi^2 = 184,044$ e $p = 0,00001$ ($p < 0,05$). As funções lineares discriminantes de Fisher definidas foram:

$$f \text{ leite puro} = -0,175 + 0,088.f_1 + 0,410.f_2 + 0,294.f_3$$

$$f \text{ leite adulterado} = -6,765 - 0,747.f_1 - 3,465.f_2 - 2,480.f_3$$

A função discriminante linear possui dois centróides, uma para leite puro em 0,356 e outra para leite adulterado em -3,006. Estes dois pontos podem ser melhor visualizados na figura 14 que mostra a distribuição da função canônica para leite puro e leite adulterado. A figura foi disposta sobre uma linha reta, mostrando que os

The figure consists of two histograms side-by-side, separated by a vertical line and a zero symbol. The left histogram represents the 'Controle' group, and the right represents the 'Intervenção' group.

Controle Group Histogram:

- Y-axis:** Frequência (Frequency)
- X-axis:** Médias (Averages), ranging from -5,00 to -1,50.
- Statistics:**
 - dp = 1,37
 - Média = -3,01
 - N = 27,00

Intervenção Group Histogram:

- Y-axis:** Frequência (Frequency)
- X-axis:** Médias (Averages), ranging from -2,25 to 2,75.
- Statistics:**
 - dp = 0,95
 - Média = 0,0
 - N = 228,00

A especificidade baixa pode ser averiguada através do teste de predição. Analisando-se a predição dos grupos analisados entre leite puro e leite adulterado

com 5, 10 e 20 % de óleos de soja, milho e girassol, que pode ser vista no anexo 34, verifica-se que os dados referentes a adulteração com 5% de óleos de milho, soja e girassol, não são possíveis de serem identificados, enquanto que as adulterações com percentuais de 10 e 20 %, são possíveis de serem detectadas. A baixa especificidade pode ser atribuída a alta variabilidade da gordura, porque dados de gordura de leite puro se confundem com os de adulterado, ou pouca quantidade de amostras de dados com gordura de leite adulterados, sendo sugerida a pesquisas futuras a análise de adulterações em faixas mais estreitas.

5.4 – Automatização da análise estatística

Para a aplicação desta análise estatística em amostras desconhecidas e prever automaticamente se consiste em gordura de leite pura ou adulterada, foi elaborada uma planilha de cálculo no Excel, capaz de facilitar a decisão.

Esta planilha desenvolvida promove a padronização dos triacilgliceróis, pela determinação dos fatores que é soma ponderada dos triacilgliceróis, calcula o escore fatorial, que é uma soma ponderada dos fatores, e calcula a função discriminante para cada grupo de leite puro e leite adulterado, determinando uma regra de decisão, se a função discriminante para leite puro for maior ou igual à função discriminante para leite adulterado, esta amostra é dita pura e no caso em que a função discriminante para leite puro for menor que a função para leite adulterado a amostra é considerada adulterada.

O programa desenvolvido possui uma tela, que pode ser vista na figura 15, na qual uma coluna é destinada a se inserir o valor percentual dos 15 triacilgliceróis (C26 a C54), analisados por cromatografia gasosa, de uma amostra desconhecida. Após a introdução do último valor, uma outra janela mostrará o resultado destes dados, se pertencem a uma amostra pura ou adulterada.

Software para determinar se uma nova amostra de análise de gordura de leite é Pura ou Adulterada		
Picos	% Área	Entre nesta coluna com os % de área dos triacilgliceróis Tipo de Leite? Puro
C26	0.15	
C28	0.45	
C30	0.84	
C32	1.60	
C34	3.70	
C36	8.50	
C38	13.00	
C40	11.50	
C42	5.60	
C44	4.60	
C46	5.20	
C48	7.20	
C50	11.80	
C52	15.40	
C54	10.80	
Soma	100.34	

Figura 15 – Programa desenvolvido. Exemplo de como são inseridos os dados de uma amostra desconhecida.

Comparando a variação dos dados percentuais dos triacilgliceróis obtidos durante o período de coleta com os dados da variação publicados por Timms (1980) e Precht (1992), podemos verificar que a variação das concentrações dos triacilgliceróis de nossos dados difere dos de Timms, principalmente nas concentrações dos triacilgliceróis C26, C32, C34, C36, C38, 40, C44, C50, C52 e C54 e dos dados de Precht nos triacilgliceróis C26, C28, C32, C38, C40, C50 e C52.

Empregando as fórmulas proposta por Timms (1980) e Precht (1992), nas adulterações realizadas em laboratório, obtivemos o resultado mostrado na Tabela 4, onde a coluna R correspondente a Timms (1980) representa a aplicação da fórmula, $R = 14,197 C40 - 36,396 C42 + 32,364 C48$, que define uma faixa de confiança de 99% para gordura de leite no intervalo de $R = 98,12 - 101,88$. Os resultados obtidos em laboratório com a adulteração de uma gordura de leite com 5, 10 e 20% de óleos vegetais de soja, girassol e milho mostraram que a fórmula proposta não atende ao perfil de variabilidade da gordura de leite brasileira. Verifica-se que a gordura genuína foi dita estar adulterada e a adulteração com 10% de óleo de soja e 10% de óleo de milho foram consideradas puras.

Utilizando os dados de adulteração na fórmula geral proposta por Precht, D., (1991):

$R = -2,7575 C26 + 6,4077 C28 + 5,5437 C30 - 5,3247 C32 + 6,2600 C34 + 8,0108 C40 - 5,0336 C42 + 0,6356 C44 + 6,0171 C46$, que cobre a adulteração com todas as gorduras estranhas e provém limites de detecção de 4 a 5%, na qual a gordura pura deve estar na faixa de $R = 97,63 - 102,42$, com 99% de confiança, verificou-se que a fórmula classificou o leite puro como adulterado e as adulterações com 5 e 10% de óleo de soja foram consideradas como gordura de leite pura.

Tabela 4 – Comparação dos dados da gordura de leite adulterada empregando o programa desenvolvido e as fórmulas de Timms (1980) e Precht (1992).

Leite %	Óleo%			Timms(1)	Precht(2)	Precht(3)	Proposta(4)
	Soja	Girassol	Milho				
100	0	0	0	<i>Adulter.</i>	<i>Adulter.</i>	<i>Adulter.</i>	Puro
95	5	0	0	Adulter.	<i>Puro</i>	Puro	<i>Puro</i>
90	10	0	0	<i>Puro</i>	<i>Puro</i>	Puro	<i>Puro</i>
80	20	0	0	Adulter.	Adulter.	Adulter.	Adulter.
95	0	5	0	Adulter.	Adulter.	<i>Puro</i>	<i>Puro</i>
90	0	10	0	Adulter.	Adulter.	<i>Puro</i>	Adulter.
80	0	20	0	Adulter.	Adulter.	Adulter.	Adulter.
95	0	0	5	Adulter.	Adulter.	<i>Puro</i>	<i>Puro</i>
90	0	0	10	Puro	Adulter.	Adulter.	Adulter.
80	0	0	20	Adulter.	Adulter.	Adulter.	Adulter.

(1) R da equação proposta por Timms, R, (1980), correspondendo a um intervalo confiança maior que 99%, e que relaciona os triacilgliceróis C40, C42 e C44.

(2) R proposto por Precht, D, (1991), correspondendo a um intervalo de confiança de 99%, e que realaciona os triacilgliceróis C26, C28, C30, C32, C34, C40, C42, C44 e C46.

(3) R proposto por Precht, D, (1992), correspondendo a um intervalo de confiança de 99%, e que relaciona os triacilgliceróis C26, C32, C34, C36, C40, C42, C46, C48, C50 e C52.

(4) Fórmula proposta para o leite brasileiro a partir de um programa de computador, usando a técnica Estatística Multivariada de Análise Fatorial, que mostra se o leite é puro ou adulterado.

- Em negrito itálico os resultados em que a fórmula discorda da realidade.

Aplicando-se a fórmula, proposta por Precht (1992), para a detecção de adulteração específica com óleo de soja, girassol e oliva, nos dados obtidos com a adulteração realizada em laboratório:

$R = 0,8167 C26 + 2,8039 C32 + 0,3467 C34 + 1,4387 C36 + 2,3912 C40 + 0,5802 C42 + 2,0674 C46 + 0,5678 C48 + 1,0304 C50 + 1,5387 C52$; para uma faixa de valores para gordura de leite pura de $R = 98,85 - 102,04$, obteve-se a classificação do leite puro como adulterado. As adulterações com 5 e 10% de óleo de soja, 5% de óleo de girassol e com 5% de óleo de milho foram consideradas como gordura de leite pura.

A aplicação do estudo proposto não poderá identificar adulterações com óleo de soja até 10%, uma vez que a variabilidade da gordura estudada apresentou uma faixa bastante ampla. Isto pode ser verificado na tabela 1, onde o Produtor A correspondendo a gordura de leite da raça Mestiça, apresentou um percentual de 20,33% no triacilglicerol C52 e 11,33% no C54, sendo que estes valores mostram-se próximos aos valores encontrados na gordura de leite adulterada.

Como pode ser visto na tabela 4, a adulteração com óleos de girassol e milho poderá ser identificada num percentual de 10% ou mais, uma vez que a amplitude de variação da gordura do leite foi menor que os valores encontrados com a adulteração com estes óleos. Os valores encontrados para adulteração com 10% de óleo de girassol no triacilglicerol C52 foi de 16,5% e no C54 15,1%, para o óleo de milho os valores encontrados foram 17,45 % para o C52 e 13,16% para o C54.

Uma vez que os óleos vegetais, de acordo com a literatura, são ricos em triacilgliceróis mais pesados (C50, C52 e C54), estes podem ser encontrados no óleo de soja, principalmente na faixa de 3-7% de C50, 30-40% de C52 e de 48-63% de C54, no óleo de girassol de 1-2,5% de C50, 18-23% de C52 e de 69-79% de C54, e no óleo de milho de 4,7-7,3% de C50, de 33-41% de C52 e de 47-60% de C54, podendo-se afirmar que somente estes triacilgliceróis contribuem na

variação da gordura de leite adulterada. A adição de 5% de gordura vegetal contribuirá pouco para o acréscimo no percentual dos triacilgliceróis, mostrando-se ainda dentro do perfil de variabilidade da gordura de leite pura.

6 – Conclusão

A determinação de triacilgliceróis por cromatografia gasosa usando alta temperatura e injeção com programação de temperatura revelou-se uma técnica rápida e eficaz na determinação do perfil dos triacilgliceróis da gordura do leite. A monitoração de todas as variáveis possíveis de modificar a composição da gordura se mostrou importante, visto que foi verificada grande variabilidade durante o período de coleta. O desenvolvimento de um programa de computador simples empregando os dados obtidos com o perfil de uma gordura de leite, através da análise estatística multivariada de Análise Fatorial, possibilita agilidade no controle da autenticidade de produtos lácteos.

O estudo proposto para determinação de adulteração de gordura de leite por gordura estranha, não se mostrou eficiente na determinação de adulteração em pequenas quantidades (5% de adulteração), mas é possível determinar a adulteração num percentual maior e igual a 10%.

Na comparação dos dados obtidos com adulteração realizada em laboratório, com as fórmulas propostas por outros autores, como Timms e Precht, pode-se verificar que estas fórmulas, não se aplicaram a variabilidade de nosso leite. O emprego de todas as fórmulas ao nosso leite puro, mostrou erroneamente que este estava adulterado. O estudo desenvolvido mostra acerto no leite puro, exceto no caso de adulteração com pequena quantidade de gordura estranha, quando não foi possível ser esta identificada, pois as concentrações encontram-se dentro da faixa de variabilidade de nossa gordura. A grande variabilidade da nossa gordura mostrou ser então o fator limitante para a obtenção de resultados mais sensíveis com esta metodologia.

7 - Referências Bibliográficas

1. AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. AOAC International. 16^a Edição. 3^a Revisão, Gaithersburg, Maryland. USA. 1997.
2. BANFI, S. & BERGNA, M. Programmable temperature vaporizer (PTV) applied to the triglyceride analysis of milk fat. **High Resolution Chromatography**. v. 22, n. 2. p. 93-96. 1999.
3. COLLOMB, M. & SPAHNI, M. Adulteration des produits laitiers. revue des critères analytiques de détection de graisses végétales et animales dans la graisse de beurre. **Travaux de Chimie Alimentaire et d'Hygiene**. v. 82, p. 615-662. 1991.
4. CONTARINI, G & BATTELLI, G. Valutazione della genuinità del burro mediante analisi di trigliceridi ed acidi grassi. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**. v. 70, n. 11, p. 491-499. 1993.
5. CONTARINI, G. & BATTELLI, G. Application of EU method for the evaluation of the purity of milkfat: Experiences and suggestions. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**. v. 74, n. 11, p. 527-533. 1997.
6. DUTHIE, A. H.; FOX, J. R.; CAVALIER, J. P.; WULFF, S. Modification of the Vermont test for monitoring fat adulteration of dairy products. **Journal of Dairy Science**. v. 71, p. 1764-1768. 1988.
7. FOX, J. R.; DUTHIE, A. H.; WULFF, S. Precision and sensitive of a test for vegetable fat adulteration of milk fat. **Journal of Dairy Science**. v. 71, p. 574-578. 1988.
8. FUENTE, M. A, DE LA & JUAREZ, M. Application of chromatographic techniques to the study of triglycerides and sterols of milk fat. **Food Science and Technology International**. v. 5, n. 2, p. 103-119. 1999.

9. HENDRICKX, H. & HUYGHEBAERT, A. Quelques aspects de la détection des graisses étrangères dans la matière grasse butyrique. **Le Lait**. v. 51, n. 11/12, p. 611-622. 1971.
10. LARUELLE, L.; VAN DIJCK, M; DAENENS, P. Fatty-acid composition of Reichert-Meissl and Polenske fractions in butterfat. **Journal of Dairy Research**. v. 43, p. 137-140. 1976.
11. LECKER, G.; FREGA, N.; BOCCI, F.; BERTACCO, G. Il grasso del latte, l'esame gas cromatografico dei triacilgliceroli nell'accertamento della genuinità del burro. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**. v. 43, n. 2, p. 95-110. 1992.
12. PARODI, P. W. Methods for determining the authenticity of modified milkfats. **The Australian Journal of Dairy Technology**. n. 2, p. 12-17. 1972.
13. PRECHT, D. Control of milk fat by gas chromatographic triglyceride analysis. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**. v. 43, p. 219-242. 1991.
14. PRECHT, D. Detection of foreign fat in milk Fat. **Z Lebensmittel Untersuchung und Forschung**. v. 194, p. 1-8. 1992.
15. SATO, T; KAWANO, S.; IWAMOTO, M. Detection of foreign fat adulteration of milk fat by near infrared spectroscopic method. **Journal of Dairy Science**. v. 73, p. 3408-3413. 1990.
16. SOLIMAN, M. A. & YOUNES, N. A. Adulterated butterfat fatty acid composition of triglycerides and 2-monoglycerides. **Journal Of American Oil Chemists' Society**. v. 63, n. 2, p. 248-250. 1986.
17. TIMMS, R. E. Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats. **Journal of Dairy Research**. v. 47, p. 295-303. 1980.

18. YOUNES, N. A. & SOLIMAN, M. M. A. Adulteration of butterfat with other sources of fat. **Grasas y Aceites**. v. 37, n. 4, p. 200-203. 1986.

Capítulo 7

Capítulo 7 - Aplicação do Método Estatístico Fatorial na Avaliação da Pureza da Gordura de Leite em Leite e Produtos Lácteos

Capítulo 7 - Aplicação do Método Estatístico Fatorial na Avaliação da Pureza da Gordura de Leite em Leite e Produtos Lácteos

1 – Resumo

A adulteração da gordura do leite tem sido preocupação de pesquisadores em todo o mundo, principalmente a relacionada a produtos lácteos. A pureza da gordura do leite é avaliada pela análise de seus triacilgliceróis, levando-se em conta a sua variabilidade relacionada a fatores genéticos, climáticos e alimentares.

A aplicação da técnica estatística multivariada de análise fatorial proporcionou a elaboração de um programa simples de computador, capaz de determinar a adulteração de gordura de leite com gordura estranha, numa faixa de 10% ou mais.

Neste trabalho foi realizada a confirmação dos resultados experimentais através da análise de triacilgliceróis por cromatografia gasosa de produtos lácteos comerciais, tais como leites de diversos tipos, manteiga, queijo e requeijão. Os resultados obtidos foram submetidos ao programa de computador elaborado, baseado em análise estatística fatorial, e também às fórmulas obtidas por regressão linear múltipla proposta por Timms (1980) para gorduras de leite australiano e por Precht (1991 e 1992) que elaborou uma outra fórmula para gorduras de leite de origem germânica, visto que a fórmula de Timms não se aplicava às gorduras locais, devido a sua maior variabilidade.

A aplicação do método desenvolvido revelou que os produtos analisados não estavam adulterados.

2 – Summary

Adulteration of milk fat is a concern of researchers all over the world, mainly with respect to dairy products. Purity of milk fat was evaluated from analysis of its triacylglycerols, taking into account the variability related to genetic, climatic and feeding factors.

Application of multivariate statistical analysis allowed for the elaboration of a simple software capable of determining the adulteration of milk fat with strange fat, in a range of 10% or more.

In this study, experimental results were confirmed by gas chromatographic analysis of triacylglycerols of commercial dairy products such as various types of milk, butter, cheese and cream cheese. The obtained results were submitted to the software developed, based on factorial statistical method, and also to the formula achieved by multiple linear regression proposed by Timms (1980) for Australian milk fat, obtained and by Precht (1991 & 1992), who proposed another formula for milk fats of German origin, since Timm's formula could not be applied to their local fats, due to greater variability.

Application of said developed method revealed that the analysed products were not adulterated.

3 – Introdução

A adulteração de óleos e gorduras de alto custo tais como gordura de leite tem sido preocupação de pesquisadores em todo o mundo, devido às vantagens econômicas advindas da parcial substituição da gordura de alto preço por outras mais economicamente vantajosas, sem a devida informação no rótulo (Batelli & Pellegrino, 1994; Lipp, 1995).

A detecção de gorduras estranhas na gordura de leite é um problema muito complexo. A gordura de leite contém numerosos componentes que também são encontrados na maior parte dos óleos vegetais e animais, sendo bastante difícil se eleger um constituinte específico que não exista na gordura do leite e exista nas demais gorduras. A maioria dos métodos usa diferenças de concentração dos componentes das diversas gorduras que constituem a mistura (Collomb, & Spahni, 1991).

Em 1991, Collomb e Spahni preocupando-se com o problema, publicaram uma revisão descrevendo os diferentes tipos de adulteração da gordura do leite e as diferenças entre a legislação suíça e a da Comunidade Européia com respeito a manteiga e a manteigas expandidas. Os métodos descritos foram: análise de índices físico-químicos, calorimetria diferencial, espectrometria no infra-vermelho, análise de componentes insaponificáveis (esteróis, hidrocarbonetos, álcoois alifáticos, tocoferóis), análise da composição de ácidos graxos (ácidos graxos totais, posição do ácido graxo na molécula do glicerol), análise de mono, di e triacilgliceróis, e outros tipos de análise (determinação de compostos cetônicos, cristais de triacilglicerol ou di-esteril éteres, análise da relação 1-2C/1-3C, métodos imunológicos).

Em 1995, Lipp publicou um artigo com a revisão dos principais métodos de análise de triacilgliceróis na determinação de adulteração e qualidade da gordura do leite. Outros pesquisadores revisaram a aplicação da cromatografia gasosa na análise de triacilgliceróis, como Guyot (1977), Christie, (1989), Lyapkov & Melamed (1990), Schaller (1991), Evershed (1992) e Trvzická & Mareš (1994).

Timms (1980) analisou a composição de 76 gorduras de leite da Austrália, obtidas de usinas durante um ano, por cromatografia gasosa. Timms (1980), mostrou que todos os dados obtidos se ajustavam à equação: $R = 14,197 C_{40} - 36,396 C_{42} + 32,364 C_{44}$, com um desvio padrão de R de 0,7088, onde C_{40} , C_{42} e C_{44} são os pesos percentuais dos triacilgliceróis com números de carbono 40, 42 e 44. Esta equação define gordura de leite pura e

assume que 5% de qualquer gordura não láctea pode ser detectada com um intervalo de confiança maior que 99%. Timms usou uma função, para discriminar a gordura de leite pura da gordura adulterada, do tipo:

$\sum a_i C_i = R + e$, onde i é o número de carbono, C_i é a percentagem do triacilglicerol com número de carbono C_i , a_i é o coeficiente a ser estimado, R é uma constante que é definida como 100 para gordura de leite pura, e e é o erro randômico. Usando somente triacilgliceróis com número de carbonos 40, 42 e 44, derivou a equação: $100 = 14,197 C_{40} - 36,396 C_{42} + 32,364 C_{44} + e$, por regressão linear múltipla.

A aplicação da fórmula proposta por Timms (1980) em gorduras de leite modificadas por interesterificação ou fracionamento e gorduras de leite obtido de vacas alimentadas com óleo de semente encapsulada, revela que estas gorduras não estão dentro do limite de confiança da equação.

Precht em 1991, utilizando também análise de regressão linear múltipla, e baseando-se na análise por cromatografia gasosa de triacilgliceróis em coluna empacotada, publicou a fórmula geral para a determinação de adulteração de qualquer natureza e fórmulas adicionais para um determinado grupo de gorduras, tais como: soja, girassol, oliva, semente de uva, algodão, gérmen de trigo, gérmen de milho, linhaça e óleo de peixe; para óleo de coco e semente de palma; para óleo de palma e sebo, e para toucinho ou banha. A fórmula geral fornece limites de detecção de 4 a 5%, na qual a gordura pura deve estar na faixa de 97,63 a 102,42, com 99% de confiança.

$$R = -2,7575 C_{26} + 6,4077 C_{28} + 5,5437 C_{30} - 5,3247 C_{32} + 6,2600 C_{34} + 8,0108 C_{40} - 5,0336 C_{42} + 0,6356 C_{44} + 6,0171 C_{46}.$$

A fórmula descrita abaixo foi proposta para a determinação de adulteração com óleo de soja, girassol, oliva, algodão, gérmen de milho,

semente de algodão e óleo de peixe e possui faixa de confiança de 99% no intervalo de 98,20 a 103,28.

$$R = 2,0983 C30 + 0,7288 C34 + 0,6927 C36 + 0,6353 C38 + 3,7452 C40 - 1,2929 C42 + 1,3544 C44 + 1,7013 C46 + 2,5383 C50.$$

Em 1992 Precht publicou outro artigo demonstrando as fórmulas divulgadas anteriormente. Ele analisou 755 amostras por um período de 5 anos, que foram coletadas de diferentes raças e regiões. Constatou que as amostras analisadas possuíam uma faixa de variação maior e que 9 dos 15 triacilgliceróis apresentavam desvio padrão mais baixo comparado aos resultados de Timms. Usando um programa de computador desenvolvido para este propósito específico, todas as equações formuladas obtidas por regressão linear foram checadas para as gorduras estranhas estudadas, atentando-se para o fato de que a composição de uma gordura estranha também está sujeita a variação.

Uma outra técnica estatística, a Multivariada de Análise Fatorial, foi desenvolvida nas mesmas condições dos trabalhos destes primeiros autores, para gordura de leite brasileiro (artigo anterior). Foi pesquisado o perfil dos triacilgliceróis de amostras de gordura de leite genuínas, obtidas de 19 coletas de quatro produtores de raças diferentes. Foram avaliadas as diferenças entre as raças, alimentação oferecida ao animal, época do ano e localização do animal. Usando a técnica multivariada de análise fatorial, foram avaliadas as amostras genuínas e adulterações realizadas em laboratório, usando como adulterantes os óleos de soja, milho e girassol comercial. Desenvolveu-se um programa de computador no qual introduzindo-se os valores percentuais de cada um dos 15 triacilgliceróis encontrados, tem-se como resultado um quadro que define se estes valores correspondem a uma gordura pura ou adulterada.

Batelli & Pellegrino (1994), usaram a fórmula proposta por Prechet, D. (1991b) para a detecção de gordura estranha em gordura de leite, na análise de diversos tipos de queijo, a fim de conferir a sua aplicabilidade. Concluíram que a

fórmula pode ser aplicada quando ocorre fraca lipólise, isto é, quando a acidez da gordura está abaixo de 15 mmol por 100 gramas. Os resultados positivos com o emprego da fórmula foram obtidos com amostras de queijo genuíno produzido sob condições industriais específicas e queijos comerciais que declaravam no rótulo conter gordura vegetal. Em casos em que ocorreu a lipólise mais intensa, como nos queijos picantes “Gorgonzola” e “Provolone”, a fórmula de Precht erroneamente indicou a presença de gordura estranha.

A determinação da composição de triacilgliceróis e o uso da fórmula específica para o controle da pureza da gordura do leite, como foi proposto por Precht, foi realizada por Renterghem (1997). Foram checadas 125 amostras de manteiga da Bélgica, e a precisão e a exatidão do método foram testadas. A composição de triacilgliceróis de amostras, produzidas de abril até setembro de 1995, estava dentro dos limites propostos. Vinte amostras de manteiga, selecionadas de várias origens (15 diferentes países) e períodos de produção, foram também analisadas e provaram a rusticidade da fórmula.

As equações de regressão multilinear propostas por Precht para detecção de gordura estranha em gordura de leite, baseadas na análise por cromatografia gasosa de triacilgliceróis de numerosas amostras de gordura de leite germânicas, foram aplicadas por Collomb et al. (1999), na análise de 90 amostras de manteiga de várias regiões da Suíça, produzidas em diferentes épocas do ano. A composição de triacilgliceróis forneceu valores de regressão que estavam bem dentro dos limites propostos para a equação. Concluíram que as equações propostas para manteigas de origem germânicas são também válidas para a determinação da pureza de manteigas suíças.

O objetivo deste trabalho foi aplicação do método analítico e estatístico desenvolvido para determinação de adulteração da gordura em leite e produtos lácteos.

4 - Material e Métodos

4.1 – Material

Amostras de leite integral tipo longa vida, leite tipo B, leite tipo C, manteiga tipo extra, queijo tipo prato e requeijão cremoso foram adquiridas em supermercados na região de Campinas, compreendendo 3 lotes de cada amostra. Uma amostra de cada lote foi analisada.

4.2 – Preparação da amostra

4.2.1 – Extração da gordura

A extração da gordura das amostras de leite e requeijão foi realizada pelo método Rose-Gottlieb, indicado para produtos lácteos, de acordo com o Método 905.02, item 33.2.25 da Association of Official Analytical Chemists – AOAC (1997).

O método Rose-Gottlieb é usado principalmente em produtos lácteos e envolve a precipitação e solubilização da proteína por etanol e amônia respectivamente, e subsequente extração da gordura com uma mistura de éter etílico e éter de petróleo.

As amostras de manteiga foram solubilizadas em n-hexano.

As amostras de queijo foram trituradas e a gordura extraída com solvente n-hexano, sendo posteriormente o solvente evaporado em banho-maria a 60°C.

4.2.2 – Separação dos triacilgliceróis

A separação da gordura foi realizada por extração em fase sólida, de acordo com Lercker et al. (1992).

Numa coluna de vidro adicionou-se 500 mg de sílica 60 (Merck) e em seguida cerca de 1,0 cm de sulfato de sódio. O acondicionamento da coluna foi

realizado através da passagem pela coluna de 3 mL de hexano. Cerca de 0,02 g de gordura foi dissolvida em hexano e carregada no topo da coluna. Os triacilgliceróis foram eluídos por adição de 3 mL de hexano, seguida de 3 mL de solução hexano:éter etílico (8:2). A solução eluída da coluna foi levada a secar e diluída em 10 mL de hexano com grau de pureza cromatográfica. Um volume de 1,0 µL da amostra foi injetado no cromatógrafo.

4.3 – Método

4.3.1 – Equipamento

Cromatógrafo gasoso marca Varian 3400, equipado com coluna capilar de sílica fundida de 30m de comprimento por 0,32 mm de diâmetro interno e espessura de filme de 0,1 µm com fase estacionária de 5% fenil 95% metilsilicone DB5HT (J&W), com temperatura limite de uso de 400°C.. Injetor Varian 7865 com programação de temperatura. Detector de ionização de chama. Processamento dos dados realizado por MS-DOS_6 – “Star Chromatography Workstation”.

4.3.2 – Reagentes

Solução - padrão - 5 triacilgliceróis saturados C30 (tricaprilina - Sigma), C36 (trilaurina – Sigma), C42 (trimiristina - Sigma), C48 (tripalmitina - Sigma) e C54 (triestearina - Sigma), dissolvidos em hexano (Li Chrosolv) em concentrações semelhantes.

Reagentes com grau de pureza analítico - silicagel 60 (Merck), álcool etílico absoluto (Chemco), éter de petróleo (Merck), éter etílico (Cinética Química), n-hexano (Mallinckrodt), sulfato de sódio anidro (synth) e amônia 28 a 30% (Ecibra).

4.3.3 – Condições cromatográficas

Injetor com programação de temperatura

Temperatura inicial de 100°C com isoterma de 0,05 do minuto, em seguida a temperatura foi elevada para 380°C, numa razão de 200°C/minuto.

A injeção foi realizada no modo “splitless” pelo período de 2 minutos.

Programação da coluna

Temperatura inicial da 210°C, com isoterma de 1 minuto Logo depois a temperatura foi aumentada para 250°C na razão de 20°C/minuto, isoterma de 1 minuto e posterior aumento para 360°C na razão de 4°C/minuto.

Detector

Detector a temperatura de 400°C.

Gases – hidrogênio com fluxo de 30 mL/minuto, nitrogênio com fluxo de 30 mL/minuto e ar sintético com fluxo de 300 mL/minuto.

Fase móvel

O gás de arraste usado foi o hidrogênio com velocidade linear de 2,1 cm/minuto.

4.4 – Análise qualitativa e quantitativa

A identificação foi realizada através da comparação dos tempos de retenção (t_r) e do tempo de retenção corrigido (t_r') dos picos da amostra analisada com o de padrões e a técnica de co-eluição (“spiking”) de padrões junto com amostra.

A quantificação foi realizada por normalização interna, com obtenção da porcentagem relativa de cada fração de triacilgliceróis.

4.5 – Análise estatística

Empregou-se um programa simples de computador baseado em técnicas: análise fatorial, usando o método de extração do componente principal com rotação Varimax, e análise discriminante, usando dados genuínos de gordura do leite e de gordura adulterada. O programa consistiu da análise estatística dos dados, utilizando o pacote estatístico SPSS (Statistical Package Software System) e posterior elaboração de uma planilha de cálculo no Excel.

5 - Resultados

O resultado da análise por cromatografia gasosa dos triacilgliceróis do leite integral tipo longa vida, leite tipo C, leite tipo B, manteiga, queijo prato e requeijão cremoso de marcas comerciais encontradas no mercado local, são mostradas nas tabelas 1 a 6, respectivamente. Os resultados apresentam as médias de três injeções consecutivas com seus desvios padrões e percentual de coeficiente de variação (%CV). As determinações da mesma amostra realizadas em dias diferentes, não mostraram diferenças, visto que o maior desvio padrão encontrado entre os picos em todas as amostras foi de $\pm 0,4$. Os perfis cromatográficos dos produtos lácteos estudados podem ser vistos nos anexos 35 a 40.

Tabela 1 – Composição de Triacilgliceróis (%) de Leite Integral tipo Longa Vida Comercial.

Leite integral marca P							
T	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Média dos
	M±dp	%CV	M±dp	%CV	M±dp	%CV	Lotest±dp
C26	0,17±0,01	3,46	0,19±0,01	2,99	0,17±0,00	0	0,18±0,01
C28	0,53±0,01	2,17	0,58±0,01	1,72	0,55±0,01	1,06	0,55±0,03
C30	1,08±0,04	3,75	1,02±0,04	3,95	1,03±0,01	1,12	1,04±0,03
C32	2,3±0,1	5,17	2,27±0,06	2,43	2,12±0,02	0,94	2,2±0,1
C34	5,22±0,05	0,88	5,4±0,2	3,45	5,20±0,04	0,69	5,3±0,01
C36	10,70±0,02	0,22	11,2±0,2	1,85	10,9±0,1	1,23	10,9±0,3
C38	14,09±0,06	0,41	15,0±0,2	1,10	14,25±0,05	0,33	14,5±0,5
C40	11,1±0,1	1,19	11,64±0,09	0,75	11,30±0,08	0,67	11,4±0,3
C42	6,74±0,06	0,94	6,77±0,03	0,44	6,68±0,01	0,09	6,73±0,05
C44	6,05±0,04	0,67	5,78±0,01	0,20	5,99±0,02	0,35	5,9±0,1
C46	6,84±0,01	0,17	6,32±0,02	0,24	6,77±0,01	0,15	6,6±0,3
C48	8,48±0,03	0,34	7,80±0,09	1,12	8,45±0,04	0,43	8,2±0,4
C50	10,98±0,03	0,32	10,6±0,2	1,43	11,08±0,02	0,19	10,9±0,3
C52	10,52±0,04	0,38	10,3±0,3	2,64	10,42±0,04	0,36	10,4±0,1
C54	5,2±0,2	3,20	5,01±0,06	1,28	5,15±0,09	1,69	5,1±0,1

T – Triacilglicerol

M±dp = média de 3 injeções ± desvio padrão, CV = coeficiente de variação

Tabela 2 - Composição de Triacilgliceróis (%) de Leite tipo C Comercial.

Leite tipo C marca L							
T	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Média dos Lotes±dp
	M±dp	%CV	M±dp	%CV	M±dp	%CV	
C26	0,17±0,01	3,46	0,17±0,00	0	0,16±0,00	0	0,17±0,01
C28	0,53±0,01	2,17	0,56±0,01	1,02	0,51±0,01	1,12	0,53±0,03
C30	1,07±0,01	0,54	1,10±0,01	1,05	0,99±0,01	0,58	1,05±0,06
C32	2,29±0,05	2,00	2,32±0,03	1,24	2,10±0,02	0,95	2,2±0,1
C34	5,7±0,1	2,24	5,74±0,04	0,70	5,32±0,01	0,22	5,6±0,2
C36	11,6±0,1	1,06	11,70±0,04	0,36	11,08±0,02	0,14	11,5±0,3
C38	14,5±0,1	0,76	14,52±0,03	0,21	14,36±0,03	0,20	14,46±0,09
C40	10,9±0,1	1,36	10,81±0,04	0,37	11,29±0,06	0,50	11,0±0,3
C42	7,09±0,04	0,50	7,08±0,02	0,29	6,85±0,02	0,25	7,0±0,1
C44	6,63±0,03	0,44	6,57±0,03	0,47	6,14±0,03	0,52	6,5±0,3
C46	7,37±0,03	0,36	7,31±0,02	0,27	6,89±0,04	0,52	7,2±0,3
C48	8,83±0,07	0,77	8,71±0,06	0,65	8,49±0,03	0,34	8,7±0,2
C50	10,7±0,1	0,91	10,48±0,06	0,53	10,82±0,06	0,51	10,7±0,2
C52	8,9±0,1	1,44	8,92±0,05	0,55	9,89±0,06	0,56	9,2±0,6
C54	3,7±0,1	3,10	4,01±0,08	2,09	5,10±0,04	0,71	4,3±0,7

T – Triacilglicerol

M±dp = média de 3 injeções ± desvio padrão, CV = coeficiente de variação

Tabela 3 – Composição de Triacilgliceróis (%) de Leite tipo B Comercial.

Leite tipo B marca L							
T	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Média dos Lotes±dp
	M±dp	%CV	M±dp	%CV	M±dp	%CV	
C26	0,17±0,01	3,33	0,17±0,00	0	0,18±0,01	3,27	0,17±0,01
C28	0,58±0,01	2,00	0,52±0,00	0	0,51±0,01	1,12	0,54±0,04
C30	1,10±0,02	2,09	1,04±0,02	1,46	1,04±0,02	1,47	1,06±0,03
C32	2,31±0,03	1,39	2,11±0,02	0,82	2,21±0,01	0,52	2,2±0,1
C34	5,61±0,04	0,64	5,55±0,03	0,62	5,65±0,06	1,02	5,60±0,05
C36	11,50±0,0	0,75	11,60±0,03	0,28	11,66±0,04	0,36	11,59±0,08
C38	14,31±0,0	0,36	14,41±0,06	0,39	14,47±0,05	0,35	14,40±0,08
C40	10,75±0,0	0,38	10,62±0,04	0,36	10,59±0,05	0,45	10,65±0,09
C42	7,17±0,07	0,95	7,02±0,02	0,22	7,03±0,03	0,43	7,07±0,08
C44	6,64±0,04	0,57	6,67±0,02	0,35	6,60±0,01	0,09	6,64±0,04
C46	7,38±0,02	0,28	7,45±0,02	0,23	7,42±0,02	0,21	7,42±0,04
C48	8,80±0,02	0,17	8,96±0,03	0,36	8,98±0,02	0,23	8,9±0,1
C50	10,70±0,0	0,30	10,78±0,01	0,11	10,83±0,05	0,46	10,77±0,07
C52	9,02±0,08	0,84	9,11±0,07	0,73	9,1±0,1	1,21	9,08±0,05
C54	3,95±0,06	1,46	4,0±0,1	2,57	3,74±0,07	1,75	3,9±0,1

T – Triacilglicerol

M±dp = média de 3 injeções ± desvio padrão, CV = coeficiente de variação

Tabela 4 – Composição de Triacilgliceróis (%) da manteiga.

Manteiga marca P							
T	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Média dos Lotes±dp
	M±dp	%CV	M±dp	%CV	M±dp	%CV	
C26	0,18±000	0	0,18±0.01	3,27	0,27±0.01	2,11	0,21±0,05
C28	0,54±0,00	0	0,51±0,01	1,12	0,77±0,01	1,51	0,6±0,1
C30	1,04±0,02	1,47	0,95±0,01	0,61	1,37±0,02	1,26	1,1±0,2
C32	2,11±0,02	0,95	2,05±0,02	0,75	2,63±0,03	0,96	2,3±0,3
C34	5,06±0,02	0,30	5,07±0,05	1,01	5,92±0,06	1,03	5,4±0,5
C36	10,52±0,04	0,38	10,6±0,1	0,95	11,3±0,1	1,05	10,8±0,4
C38	14,31±0,03	0,18	14,35±0,06	0,42	14,4±0,1	0,91	14,35±0,05
C40	11,53±0,02	0,13	11,3±0,1	0,89	11,8±0,1	0,96	11,5±0,3
C43	6,62±0,02	0,26	6,58±0,02	0,30	6,90±0,02	0,30	6,7±0,2
C44	5,91±0,01	0,17	5,91±0,04	0,68	5,85±0,04	0,60	5,89±0,03
C46	6,60±0,01	0,15	6,62±0,02	0,26	6,37±0,06	0,87	6,5±0,1
C48	8,29±0,02	0,18	8,34±0,03	0,30	7,77±0,09	1,12	8,1±0,3
C50	11,12±0,03	0,27	11,22±0,05	0,47	9,87±0,03	0,25	10,7±0,8
C52	10,87±0,07	0,63	10,98±0,09	0,82	9,2±0,1	1,51	10,4±1,0
C54	5,30±0,03	0,61	5,43±0,07	1,21	5,7±0,4	6,89	5,48±0,2

T – Triacilglicerol

M±dp = média de 3 injeções ± desvio padrão, CV = coeficiente de variação

Tabela 5 – Composição de Triacilgliceróis (%) de Queijo Prato Comercial.

Queijo Prato Marca V							
T	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Média dos Lotes±dp
	M±dp	%CV	M±dp	%CV	M±dp	%CV	
C26	0,17±0,01	3,46	0,15±0,00	0	0,19±0,00	0	0,17±0,02
C28	0,51±0,01	1,12	0,49±0,01	1,19	0,60±0,01	0,97	0,53±0,06
C30	0,96±0,01	1,04	0,93±0,01	0,62	1,09±0,01	0,53	0,99±0,09
C32	1,84±0,03	1,75	1,83±0,02	1,09	2,25±0,04	1,60	2,0±0,2
C34	4,64±0,02	0,43	4,45±0,02	0,47	5,43±0,05	0,97	4,8±0,5
C36	9,89±0,06	0,56	9,6±0,1	1,00	11,06±0,06	0,50	10,2±0,8
C38	14,01±0,08	0,54	13,88±0,02	0,15	14,53±0,06	0,38	14,1±0,3
C40	11,47±0,07	0,62	11,47±0,06	0,51	11,18±0,07	0,65	11,4±0,2
C42	6,30±0,03	0,55	6,28±0,03	0,49	6,70±0,03	0,39	6,4±0,2
C44	5,51±0,01	0,21	5,41±0,02	0,28	5,97±0,02	0,26	5,6±0,3
C46	6,19±0,01	0,09	6,14±0,01	0,19	6,57±0,02	0,32	6,3±0,2
C48	8,08±0,04	0,50	8,09±0,02	0,26	8,14±0,04	0,44	8,10±0,03
C50	11,62±0,07	0,57	11,77±0,08	0,64	10,64±0,06	0,57	11,3±0,6
C52	12,26±0,09	0,75	12,65±0,06	0,49	10,26±0,09	0,88	12±1,3
C54	6,6±0,1	1,55	6,93±0,06	0,93	5,4±0,1	2,14	6,3±0,8

T – Triacilglicerol

M±dp = média de 3 injeções ± desvio padrão, CV = coeficiente de variação

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Tabela 6 – Composição de Triacilgliceróis (%) de Requeijão Cremoso Comercial.

Requeijão Cremoso Marca V							
T	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Média dos Lotes±dp
	M±dp	%CV	M±dp	%CV	M±dp	%CV	
C26	0,16±0,01	3,53	0,17±0,01	3,33	0,18±0,01	3,27	0,17±0,01
C28	0,53±0,01	1,89	0,53±0,01	1,10	0,56±0,01	1,04	0,54±0,02
C30	0,99±0,01	0,59	1,02±0,01	0,56	1,09±0,02	1,41	1,03±0,05
C32	2,04±0,03	1,23	2,06±0,05	2,52	2,3±0,1	4,80	2,1±0,1
C34	5,1±0,1	2,29	5,10±0,0	0,39	5,43±0,08	1,38	5,2±0,2
C36	10,46±0,09	0,86	10,63±0,06	0,54	11,04±0,03	0,24	10,7±0,3
C38	14,12±0,05	0,33	13,54±0,02	0,17	14,21±0,06	0,39	14,0±0,4
C40	11,2±0,2	1,92	11,49±0,07	0,58	11,07±0,05	0,42	11,3±0,2
C42	6,62±0,05	0,80	6,61±0,04	0,57	6,88±0,05	0,75	6,7±0,2
C44	5,99±0,01	0,19	5,85±0,02	0,26	6,25±0,02	0,37	6,0±0,2
C46	6,71±0,03	0,39	6,56±0,01	0,09	7,00±0,03	0,38	6,8±0,2
C48	8,40±0,01	0,14	8,35±0,01	0,12	8,60±0,05	0,59	8,5±0,1
C50	11,17±0,07	0,60	11,29±0,07	0,64	10,94±0,06	0,50	11,1±0,2
C52	10,96±0,03	0,24	11,2±0,1	1,10	9,86±0,04	0,41	10,7±0,7
C54	5,64±0,02	0,27	5,66±0,06	1,14	4,60±0,04	0,95	5,3±0,6

T – Triacilglicerol

M±dp = média de 3 injeções ± desvio padrão, CV = coeficiente de variação

Como podem ser visualizados na Tabela 7, os dados de produtos lácteos que foram analisados com o emprego do nosso programa de computador para detecção de gordura estranha, não foi verificada a presença de adulteração ao nível detectado pela fórmula, mostrando estar o programa adaptado à

variabilidade de nossos produtos. Como visto anteriormente, embora a composição da gordura do leite de vacas, individualmente seja afetada pelo estágio de lactação, dieta, raça e outros fatores, o produto comercial é consistentemente uniforme, em razão da homogeneização, padronização do conteúdo de gordura e retirada do leite proveniente de colostro e vacas com mastite (Jensen, 1991). Pode-se afirmar que em produtos comerciais o programa se aplicará mais consistentemente, visto tratar-se de um produto padronizado e não estar afetado por fatores pontuais de variabilidade onde se pode obter valores percentuais extremos de triacilgliceróis.

Empregando as fórmulas proposta por Timms (1980) e Precht (1992) nos resultados dos produtos lácteos analisados, obtivemos o resultado mostrado na Tabela 4, onde a coluna R correspondente a Timms (1980) representa a aplicação de sua fórmula, usando os triacilgliceróis C40, C42 e C48, que define uma faixa de confiança de 99% para gordura de leite para o intervalo 98,12-101,88. O emprego desta fórmula mostrou que todos os lotes dos produtos lácteos continham gordura estranha, podendo-se afirmar que a fórmula proposta não atende ao perfil de variabilidade da gordura de leite brasileira.

Empregaram-se os dados cromatográficos da análise dos produtos lácteos na fórmula total proposta por Precht (1991), que cobre a adulteração com todas as gorduras estranhas e provem limites de detecção de 4 a 5%, no qual a gordura pura deve estar no intervalo de 97,63 – 102,42, com 99% de confiança usando os triacilgliceróis C26, C28, C30, C32, C34, C40, C42, C44 e C46. O emprego desta fórmula geral resultou na classificação de todos os lotes dos produtos lácteos analisados em produtos adulterados, evidenciando-se que esta fórmula também não se adapta a variabilidade da gordura de leite brasileira.

Tabela 7 – Aplicação das fórmulas de detecção de adulteração em produtos comerciais

Produto	Fórmulas			
	Timms(1)	Precht(2)	Precht(3)	Proposta(4)
Leite integral lote 1	Adulterado	Adulterado	Adulterado	Puro
Leite integral lote 2	Adulterado	Adulterado	Adulterado	Puro
Leite integral lote 3	Adulterado	Adulterado	Adulterado	Puro
Leite C lote 1	Adulterado	Adulterado	Adulterado	Puro
Leite C lote 2	Adulterado	Adulterado	Puro	Puro
Leite C lote 3	Adulterado	Adulterado	Puro	Puro
Leite B lote 1	Adulterado	Adulterado	Puro	Puro
Leite B lote 2	Adulterado	Adulterado	Puro	Puro
Leite B lote 3	Adulterado	Adulterado	Puro	Puro
Queijo prato lote 1	Adulterado	Adulterado	Puro	Puro
Queijo prato lote 2	Adulterado	Adulterado	Puro	Puro
Queijo prato lote 3	Adulterado	Adulterado	Puro	Puro
Requeijão lote 1	Adulterado	Adulterado	Puro	Puro
Requeijão lote 2	Adulterado	Adulterado	Adulterado	Puro
Requeijão lote 3	Adulterado	Adulterado	Adulterado	Puro
Manteiga lote 1	Adulterado	Adulterado	Adulterado	Puro
Manteiga lote 2	Adulterado	Adulterado	Puro	Puro
Manteiga lote 3	Adulterado	Adulterado	Puro	Puro

(1) R da equação proposta por Timms, R. (1980), correspondendo a um intervalo confiança de maior que 99% ($R=14,197C40-36,396C42+32,364C44$; $R=98,12-101,88$).

(2) R proposto por Precht, D. (1991), correspondendo a um intervalo de confiança de 99%. Fórmula geral.

(3) R proposto por Precht, D. (1992), correspondendo a um intervalo de confiança de 99%, para adulterantes, como os usados.

- Em negrito itálico os produtos que são considerados possuírem gordura de estranha.

Empregou-se a fórmula particular, proposta por Precht (1992) para a detecção de adulteração com óleo de soja, girassol e oliva, nos dados obtidos na análise de produtos lácteos, que usa os triacilgliceróis C26, C32, C34, C36, C40, C42, C46, C48, C50 e C52, para uma faixa de valores para gordura de leite pura no intervalo de 98,85-102,04. O emprego desta fórmula mostrou que somente alguns produtos estavam adulterados, como o lote 1 da manteiga extra e todos os lotes do leite integral tipo longa vida, evidenciando-se que esta fórmula também não é adaptada a produtos brasileiros.

Contarini et al. (1993) usou a fórmula de Precht em amostras de manteiga genuína e adulterada com diferentes percentagens de adulterante e conseguiu a identificação da adulteração na faixa de 5 a 10%. Usando a mesma fórmula Batelli & Pellerini (1994) determinaram a pureza da gordura de queijos genuínos e produtos lácteos comerciais que no rótulo declaravam a adição de gordura vegetal.

6 – Conclusão

O programa estatístico proposto para determinação de adulteração de gordura de leite por gordura estranha empregado em produtos lácteos brasileiros mostrou-se eficiente na determinação de adulteração em produtos comerciais.

O método analítico e estatístico desenvolvido mostrou que nenhum dos produtos lácteos analisados estava adulterado com gorduras estranhas à gordura láctea.

As fórmulas de Timms (Austrália) e Precht (Alemanha) aplicadas no mesmo produto demonstraram que a maioria deles estava adulterada, comprovando que as fórmulas desenvolvidas em outros países não se aplicam a gordura de leite brasileira

7 – Referências Bibliográficas

- 1 - AOAC INTERNATIONAL. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. AOAC International 16ª Edição , 3ª Revisão. Gaithersburg, Maryland. USA. 1997.
- 2 - BATELLI, G. & PELLEGRINO, L. Detection of non-dairy fat in cheese by gas chromatography of triglycerides. **Italian Journal of Food Science**. n. 4, p. 407-419. 1994.
- 3 - CHRISTIE, W. W. **Gas Chromatography and Lipids**. Pergamon Press. Ayr. U. K. 1989.
- 4 - COLLOMBO, M. & SPAHNI, M. Adultération des produits laitiers. revues ds critères analytiques de détection de graisse végétales et animales dans la graisse du beurre. **Travaux de Chimie Alimentaire et d'Hygiène**. v. 82, n. 6, p. 615-662. 1991.
- 5 - COLLOMBO, M.; SPAHNI, M.; BUEHLER, T. Analysis of triglycerides. II. Validation of a modification of a multilinear regression method for the determination of foreign fats in milk fat. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**. v. 89, n. 1, p. 75-83. 1999
- 6 - CONTARINI, G.; LEARDI, R.; PEZZI, C.; TOPPINO, P. M. Valutazione della genuinità del burro mediante analisi di trigliceridi ad acidi grassi. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**. v. 70, n. 11, p. 491-499. 1993.
- 7 - EVERSLED, R. P. Gas chromatography of lipids. In **Lipid Analysis**. Edition R. Hamilton. IRL Press, Oxford. U.K. 1992.
- 8 - GUYOT, A. L. Chromatographic gaz-liquide des triglycérides de la matière grasse butyrique ii. applications à quelques problèmes de contrôle.

Bulletin des Recherches Agronomiques de Gembloux. v. 12, n. 4, p. 311. 1977.

- 9 - JENSEN, R. G.; FERRIS, A. N.; LAMMI-KEEFE, C. J. Symposium: milk fat-composition, function and potential for change. the composition of milk fat. **Journal of Dairy Science.** v. 74, n. 9, p. 3228-3243. 1991.
- 10 - LECKER, G.; FREGA, N.; BOCCI, F.; BERTACCO, G. Il grasso del latte, l'esame gas cromatografico dei triacilgliceroli nell'accertamento della genuinità del burro. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia.** v. 43, n. 2, p. 95-110. 1992.
- 11 - LIPP, M. Review of methods for the analysis of triglycerides in milk fat: application for studies of milk quality and adulteration. **Food Chemistry.** v. 54, p. 213-221. 1995.
- 12 - LYAPKOV, B. G. & MELAMED, D. B. Chromatographic methods for analysis of mixtures of individual triacylglycerols. **Biochemistry.** v. 45, n. 3, p. 306. 1990.
- 13 - PRECHT, D. Control of milk fat by gas chromatographic triglyceride analysis. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte.** v. 43, p. 219-242. 1991.
- 14 - PRECHT, D. Detection of foreign fat in milk fat. **Z Lebensmittel Untersuchung und Forschun.** v. 194, p. 1-8. 1992.
- 15 - RENTERGHEM, R. Van. The triglyceride composition of belgian butter in view of EU controls on milk fat purity. **Milchwissenschaft.** v. 52, n. 2, p.79-82. 1997.
- 16 -SCHALLER, H. Anwendung von hochtemperaturphasen für die triglyceridanalytik mittels kapillar-GC. **Fat Science Technology.** v. 93, p. 510. 1991.

- 17 - TIMMS, R. E. Detection and quantification of non-milk fat in mixtures of milk and non-milk fats. **Journal of Dairy Research**. v. 47, p. 295-303. 1980.
- 18 - TRVZICKÁ, E. & MARĚS, P. Gas-liquid chromatography of neutral lipids. in **Lipid Chromatographic Analysis** . Edition T. Shibamoto. Marcel Dekker, New York. USA. 1994.

Conclusões Gerais

Conclusões Gerais

1 - A injeção com programação de temperatura e em “splitless” mostrou ser uma técnica adequada para ser utilizada em compostos com alta temperatura de ebulição e com larga faixa de ponto de ebulição, conseguindo-se deste modo superar os efeitos negativos da injeção a quente, como a decomposição catalítica e o fracionamento da amostra devido ao calor na seringa.

A condição ideal do injetor para a obtenção do melhor fator de resposta para os padrões de triacilgliceróis saturados foi de injeção em “splitless” por 2 minutos na temperatura inicial de 100°C, com isoterma de 15 segundos, até 380°C num gradiente de 200°C/minuto.

2 – As condições ideais de separação, identificação e quantificação dos triacilgliceróis por cromatografia gasosa de uma mistura padrão de C30, C36, C42, C48 e C54 foi: temperatura da coluna de 210°C, com isoterma de 1 minuto, até 250°C no gradiente de 20°C/minuto e de 250°C, com isoterma de 1 minuto, até 360°C, em gradiente de 4°C/minuto.

A utilização da temperatura inicial da coluna mais alta, 210°C com duas rampas de aquecimento possibilitaram a obtenção de valores de resposta próximos a 1,0 para todos os padrões de triacilgliceróis, inclusive para o C54 (fator de resposta = 1,18), além de diminuir sensivelmente o tempo total de análise.

3 – O estudo da composição dos triacilgliceróis de óleos de soja, girassol e milho, possíveis adulterantes da gordura do leite mostrou que os 4 triacilgliceróis mais importantes na composição dos três óleos, apresentaram grande variação entre os lotes analisados. Esta variação ficou em torno de 90% para o C38 nos três óleos, entre 37 e 50% para o C50, entre 20 e 27% para o C52 e entre 12 e 24% para o C54.

A análise de variância e teste de Tukey mostraram que os triacilgliceróis C50, C52 e C54, são significativamente diferentes nos três óleos estudados e podem ser usados para caracterizá-los.

4 – A determinação de triacilgliceróis por cromatografia gasosa usando alta temperatura e injeção com programação de temperatura revelou-se uma técnica rápida e eficaz na determinação do perfil dos triacilgliceróis da gordura do leite. Foram identificados e quantificados 15 triacilgliceróis do C26 ao C54. A monitoração de todas as variáveis possíveis de modificar a composição da gordura se mostrou importante visto que foi verificada grande variabilidade durante o período de coleta. A composição em triacilgliceróis da gordura do leite produzido na região de Campinas mostrou variação significativa em todos os triacilgliceróis do C26 ao C54, em relação a raça do animal, época do ano, localização do animal pasto ou estábulo e tipo de ração.

5 - O desenvolvimento de um programa de computador simples empregando os dados obtidos com o perfil de uma gordura de leite, através da análise estatística multivariada de Análise Fatorial, possibilitou agilidade no controle da autenticidade de produtos lácteos. O estudo proposto não se mostrou eficiente na determinação de adulteração em pequenas quantidades (5% de adulteração), mas foi possível determinar a adulteração num percentual maior e igual a 10%.

6 - Na comparação dos dados obtidos com adulteração realizada em laboratório, com as fórmulas propostas por outros autores, como Timms (1980) e Precht (1991), verificou-se que as mesmas, não se aplicaram devido à variabilidade de nosso leite, pois o leite puro foi considerado adulterado, enquanto que o estudo aqui proposto mostrou acerto no leite puro.

7 - O programa estatístico proposto para determinação de adulteração de gordura de leite por gordura estranha, utilizada em produtos lácteos brasileiros, mostrou-se eficiente na determinação de adulteração em alguns produtos comerciais, como leites longa vida, B e C, manteiga, queijo prato e requeijão.

Na comparação dos dados obtidos nestes produtos lácteos, com fórmulas propostas por outros autores, como Timms na Austrália e Precht na Alemanha, pode-se verificar que estas fórmulas não se aplicam ao perfil da gordura de leite brasileira.

Evidenciou-se que nenhum dos produtos lácteos analisados estava adulterado com gorduras estranhas à gordura láctea de acordo com o programa utilizado.

Anexos



Faculdade de Engenharia de Alimentos
Departamento de Ciência de Alimentos
Laboratório de Análise de Alimentos
Caixa Postal 6121 - CEP13081-970 - Campinas - SP
Fone (019) 2397224 / 2397276 / 2398653
Fax (019) 2397890

À Cooperativa de Produtores de Leite da Região de Campinas
Rodovia SP-340 Campinas-Mogi Mirim Km 127,5
Jaguariuna - Fax (019) 867-2862

PRODUTOR: A.....B.....C.....D.....

1 - RAÇA DO ANIMAL QUE FORNECEU O LEITE

PURA

MISTA

NOME DA RAÇA (QUANDO PURA).....

COMPOSIÇÃO (QUANDO MISTA).....

2 - O GADO ESTÁ NO PASTO

ESTÁBULO

ESTÁBULO E PASTO

3 - USOU RAÇÃO?

SIM

NÃO

4 - COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO

SOJA

MILHO

AVEIA

SAIS

BAGAÇO DE CANA

MELAÇO

OUTROS

QUAIS

5 - ALGUM ANIMAL PARIU NOS ÚLTIMOS DIAS?

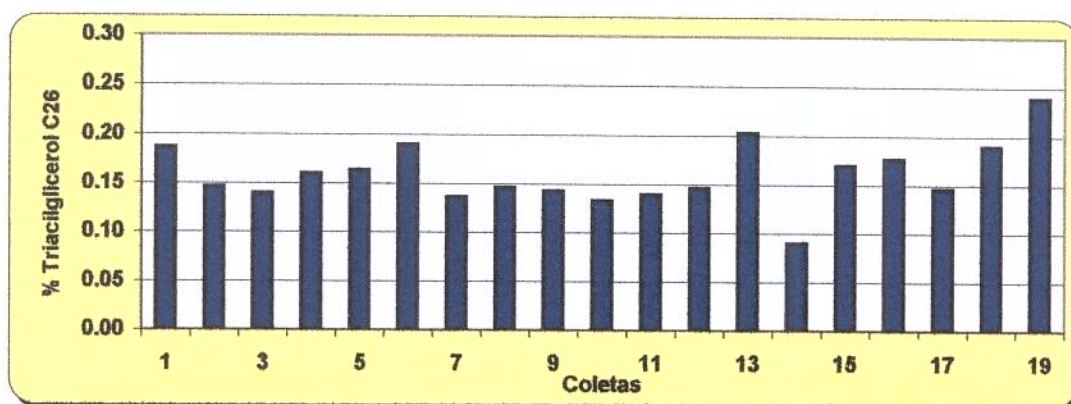
SIM

NÃO

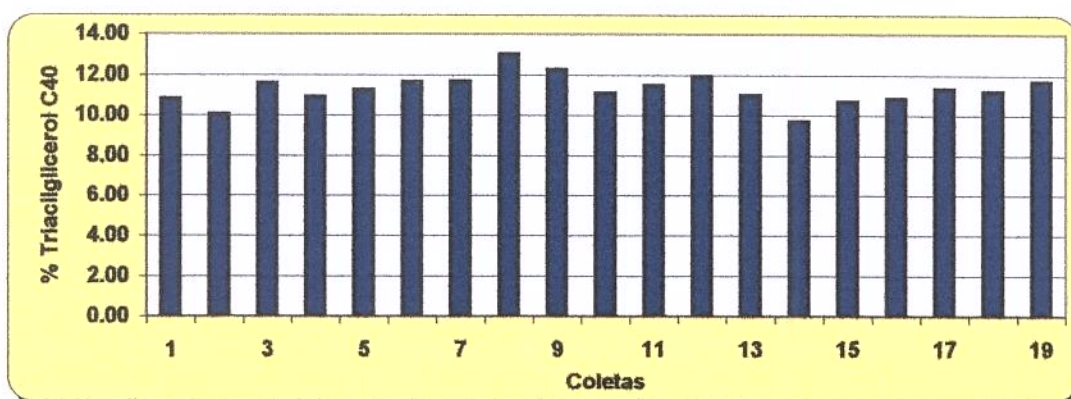
6 - NÚMERO DE PARIÇÕES QUE JÁ OCORREU NO ANIMAL

7 - IDADE DO ANIMAL QUE FORNECEU O LEITE

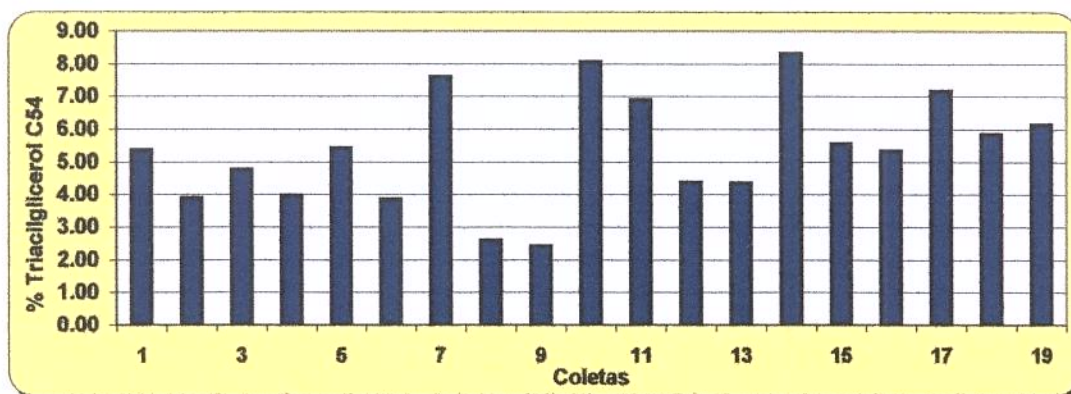
Anexo 1 – Formulário de controle das variáveis sobre os animais.



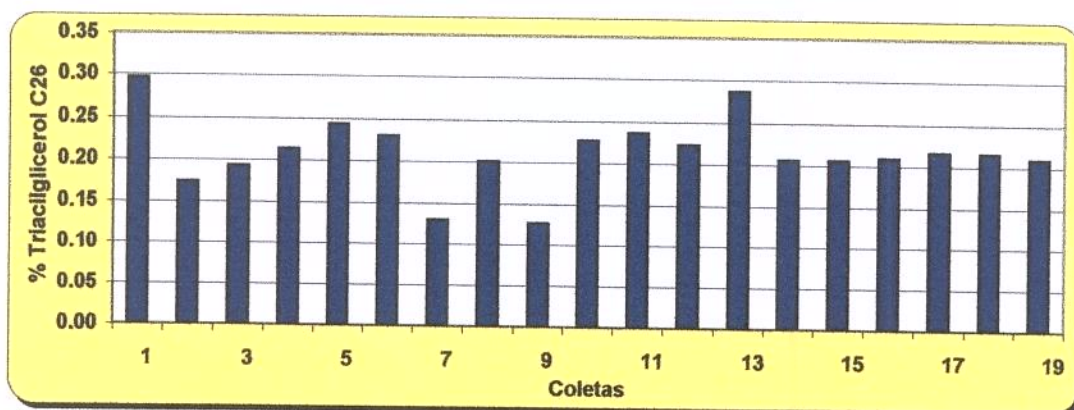
Anexo - 2 – Variação da concentração do triacilglicerol C26 da gordura do leite da raça Holandesa, durante a coleta.



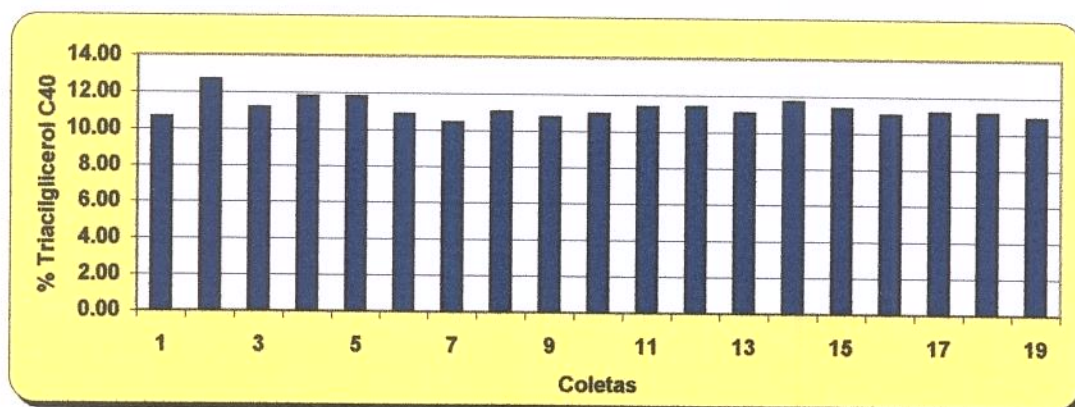
Anexo - 3 – Variação da concentração do triacilglicerol C40 da gordura do leite da raça Holandesa, durante a coleta.



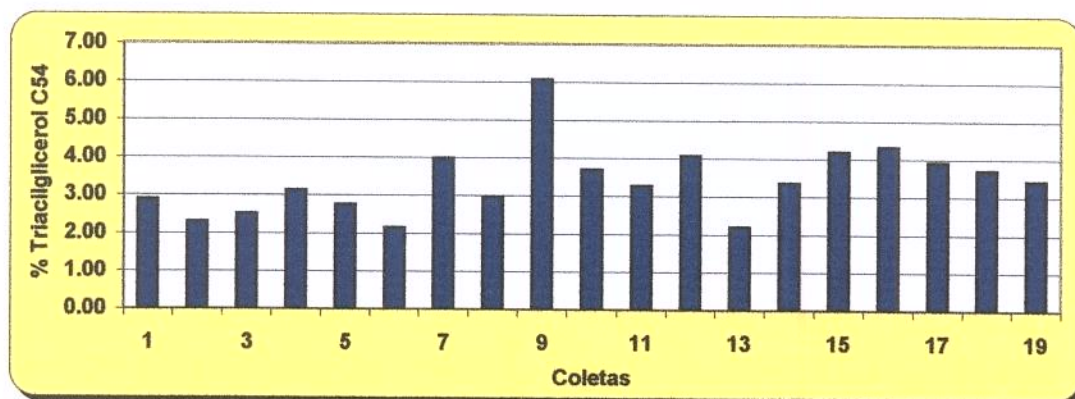
Anexo - 4 – Variação da concentração do triacilglicerol C54 da gordura do leite da raça Holandesa, durante a coleta.



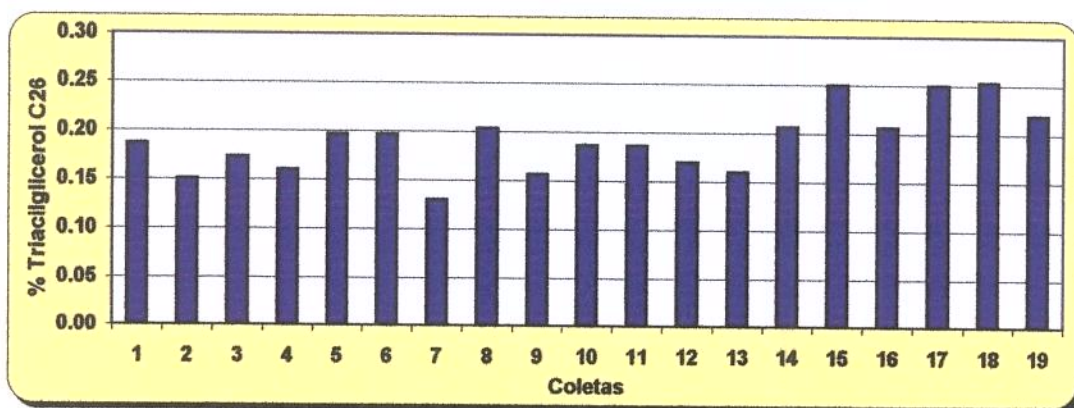
Anexo - 5 – Variação da concentração do triacilglicerol C26 da gordura do leite da raça Girolanda, durante a coleta.



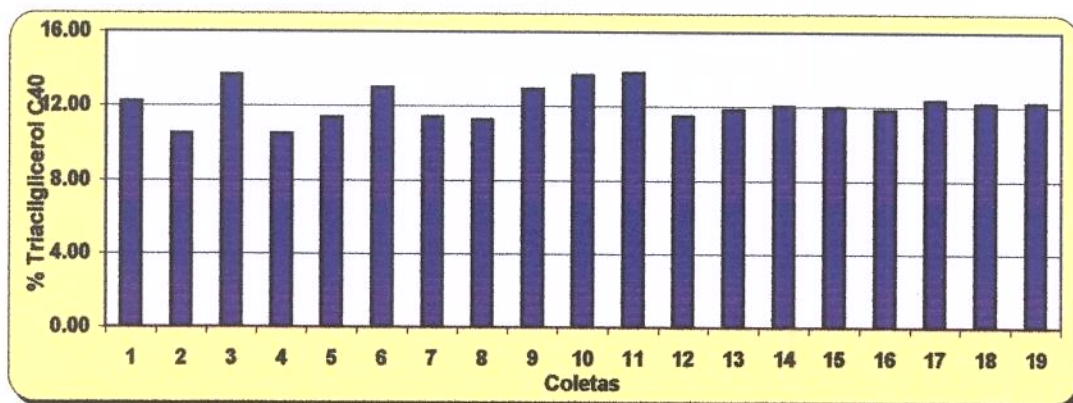
Anexo - 6 – Variação da concentração do triacilglicerol C40 da gordura do leite da raça Girolanda, durante a coleta.



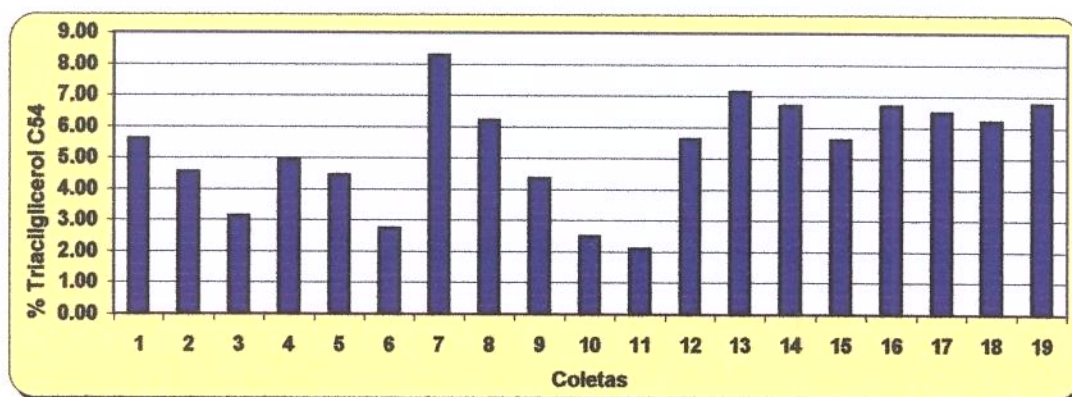
Anexo - 7 – Variação da concentração do triacilglicerol C54 da gordura do leite da raça Girolanda, durante a coleta.



Anexo - 8 – Variação da concentração do triacilglicerol C26 da gordura do leite da raça Jersey, durante a coleta.



Anexo - 9 – Variação da concentração do triacilglicerol C40 da gordura do leite da raça Jersey, durante a coleta.



Anexo - 10 – Variação da concentração do triacilglicerol C54 da gordura do leite da raça Jersey, durante a coleta .

Anexo 11 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C26.

C26

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	0.16	0.12	0.11	0.13	0.14	0.16	0.22	0.22	0.18	0.21	0.18	0.16	0.23	0.23	0.24	0.172
D1																
D2	S															
D3	S	N														
D4	N	N	N													
D5	N	N	N	N												
D6	N	S	S	N	N											
D7	S	S	S	S	S	S										
D8	S	S	S	S	S	S	N									
D9	N	S	S	N	N	N	N	N								
D10	S	S	S	S	S	S	N	N	N							
D11	N	S	S	S	N	N	N	S	N	N						
D12	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N					
D13	S	S	S	S	S	S	N	N	N	N	S	S				
D14	S	S	S	S	S	S	N	N	N	N	S	S	N			
D15	S	S	S	S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 12 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C28.

C28

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	0.51	0.38	0.33	0.38	0.46	0.54	0.69	0.76	0.58	0.72	0.58	0.55	0.75	0.74	0.75	0.565
D1																
D2	S															
D3	S	N														
D4	N	N	N													
D5	N	N	N	N												
D6	N	S	S	S	N											
D7	S	S	S	S	S	N										
D8	S	S	S	S	S	S	N									
D9	N	S	S	S	N	N	N	S								
D10	S	S	S	S	S	S	N	N	N							
D11	N	S	S	S	S	N	N	S	N	N						
D12	N	S	S	N	N	N	N	S	N	N	N					
D13	S	S	S	S	S	S	N	N	N	N	S	S				
D14	S	S	S	S	S	S	N	N	N	N	S	S	N			
D15	S	S	S	S	S	S	N	N	N	N	S	S	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 13 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influencia das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C30.

C30

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	0.98	0.69	0.57	0.67	0.88	1.01	1.20	1.41	1.21	1.42	1.05	1.00	1.27	1.23	1.27	1.041
D1																
D2	S															
D3	S	S														
D4	S	S	N													
D5	S	N	S	S												
D6	S	N	S	S	S											
D7	S	N	S	S	S	S										
D8	N	S	S	S	S	S	S									
D9	N	N	S	S	S	S	N	N								
D10	N	S	S	S	S	S	S	N	N							
D11	N	N	S	S	S	N	N	N	S	N						
D12	S	N	S	S	N	N	N	N	S	N	S					
D13	S	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	N				
D14	N	N	S	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N			
D15	N	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 14 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C32.

C32

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	1.96	1.36	1.08	1.24	1.78	1.20	2.29	2.78	2.52	2.85	2.06	1.94	2.39	2.31	2.36	2.045
D1																
D2	S															
D3	S	S														
D4	S	S	N													
D5	S	N	S	S												
D6	S	N	S	S	S											
D7	N	N	S	S	S	N										
D8	N	S	S	S	S	S	S									
D9	N	S	S	S	S	S	S	N								
D10	N	S	S	S	S	S	S	N	N							
D11	N	N	S	S	S	N	N	N	S	N						
D12	N	N	S	S	S	N	N	N	S	N	S					
D13	N	N	S	S	S	S	N	N	N	N	N	N				
D14	N	N	S	S	S	N	N	N	S	N	N	N	N			
D15	N	N	S	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 15 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C34.

C34

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	4.59	3.58	3.01	3.25	4.28	4.61	4.99	5.91	5.83	6.05	4.78	4.51	5.14	4.99	5.02	4.696
D1																
D2	N															
D3	S	S														
D4	S	S	N													
D5	S	N	S	S												
D6	S	N	S	S	S											
D7	N	N	S	S	S	N										
D8	N	S	S	S	S	S	S									
D9	N	S	S	S	S	S	S	N								
D10	N	S	S	S	S	S	S	N	N							
D11	N	N	S	S	S	N	N	N	S	S						
D12	N	N	S	S	S	N	N	N	S	S	S					
D13	N	N	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N				
D14	N	N	S	S	S	N	N	N	S	N	N	N	N			
D15	N	N	S	S	S	N	N	N	S	N	N	N	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 16 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C36.

C36

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	9.65	8.58	8.01	8.05	9.39	9.8	10.3	11.3	11.7	11.0	10.0	9.71	9.69	9.96	10.1	9.83
D1																
D2	N															
D3	S	S														
D4	S	S	N													
D5	S	N	N	N												
D6	N	N	S	S	S											
D7	N	N	S	S	S	N										
D8	N	S	S	S	S	S	S									
D9	S	S	S	S	S	S	S	N								
D10	N	N	S	S	S	S	N	N	N							
D11	N	N	S	S	S	N	N	N	S	S						
D12	N	N	N	S	N	N	N	N	S	S	N					
D13	N	N	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N				
D14	N	N	S	S	S	N	N	N	S	S	N	N	N			
D15	N	N	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 17 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C38.

C38

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	13.2	13.5	14.8	13.2	13.6	13.8	14.0	13.6	13.6	13.4	14.2	14.2	13.9	14.2	14.0	13.70
D1																
D2	N															
D3	S	S														
D4	N	N	S													
D5	N	N	N	N												
D6	N	N	N	N	N											
D7	N	N	N	N	N	N										
D8	N	N	S	N	N	N	N									
D9	N	N	N	N	N	N	N	N								
D10	N	N	N	N	N	N	N	N	N							
D11	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N						
D12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N					
D13	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N				
D14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
D15	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 18 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C40.

C40

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	11.0	11.9	13.6	12.4	11.3	11.8	11.5	11.3	10.6	11.0	12.2	12.2	12.0	12.1	12.2	11.70
D1																
D2	S															
D3	S	S														
D4	S	N	N													
D5	N	N	S	N												
D6	N	N	S	N	N											
D7	N	N	S	N	N	N										
D8	N	S	S	N	N	N	N									
D9	N	S	S	S	N	N	N	N								
D10	N	N	S	N	N	N	N	N	N							
D11	S	N	S	N	S	N	N	S	S	S						
D12	S	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N					
D13	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N				
D14	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N			
D15	S	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 19 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C42.

C42

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	6.49	5.71	5.63	5.63	6.38	6.95	6.61	8.02	7.84	8.35	6.88	6.56	6.87	6.67	6.90	6.79
D1																
D2	S															
D3	S	N														
D4	S	N	N													
D5	N	S	N	N												
D6	N	S	S	S	N											
D7	N	S	N	N	N	N										
D8	S	S	S	S	S	S	S									
D9	S	S	S	S	S	S	S	N								
D10	S	S	S	S	S	S	S	N	N							
D11	N	S	S	S	N	N	N	S	S	S						
D12	N	S	N	N	N	N	N	S	S	S	N					
D13	N	S	S	S	N	N	N	S	N	S	N	N				
D14	N	S	S	S	N	N	N	S	S	S	N	N	N			
D15	N	S	S	S	N	N	N	S	N	S	N	N	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 20 - Resultado do teste de Tukey mostrando a influencia das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C44.

C44

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	5.79	4.75	4.30	4.48	5.68	6.22	5.71	7.36	7.44	7.78	6.00	5.66	5.84	5.59	5.85	5.96
D1																
D2	S															
D3	S	N														
D4	S	N	N													
D5	N	S	S	S												
D6	N	S	S	S	N											
D7	N	S	S	S	N	N										
D8	S	S	S	S	S	S	S									
D9	S	S	S	S	S	S	S	N								
D10	S	S	S	S	S	S	S	N	N							
D11	N	S	S	S	N	N	N	S	S	S						
D12	N	S	S	S	N	N	N	S	S	S	N					
D13	N	S	S	S	N	N	N	S	S	S	N	N				
D14	N	S	S	S	N	N	N	S	S	S	N	N	N			
D15	N	S	S	S	N	N	N	S	S	S	N	N	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 21 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C46.

C46

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	6.49	5.52	5.17	5.11	6.32	6.87	6.08	7.46	7.77	7.73	6.62	6.22	6.20	5.97	6.19	6.475
D1																
D2	S															
D3	S	N														
D4	S	N	N													
D5	N	S	S	S												
D6	N	S	S	S	N											
D7	N	N	N	S	N	S										
D8	S	S	S	S	S	S	S									
D9	S	S	S	S	S	S	S	N								
D10	S	S	S	S	S	S	S	N	N							
D11	N	S	S	S	N	N	N	S	S	S						
D12	N	N	S	S	N	N	N	S	S	S	N					
D13	N	N	S	S	N	N	N	S	S	S	N	N				
D14	N	N	N	N	N	S	N	S	S	S	N	N	N			
D15	N	N	S	S	N	N	N	S	S	S	N	N	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 22 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C48.

C48

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	8.39	7.92	7.96	7.37	8.36	8.78	7.65	8.25	8.73	8.29	8.37	8.04	7.52	7.37	7.43	8.16
D1																
D2	S															
D3	N	N														
D4	S	N	N													
D5	N	N	N	S												
D6	N	S	N	S	N											
D7	N	N	N	N	N	S										
D8	N	N	N	S	N	S	N									
D9	N	S	N	S	N	N	S	N								
D10	N	N	N	N	N	N	N	N	N							
D11	N	S	N	S	N	N	N	N	N	N						
D12	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N					
D13	S	N	N	N	N	S	N	N	S	N	S	N				
D14	S	N	N	N	S	S	N	S	S	N	S	N	N			
D15	S	N	N	N	S	S	N	S	S	N	S	N	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 23 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C50.

C50

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	11.8	12.9	13.0	12.5	12.1	11.8	10.7	9.7	10.1	9.4	11.3	11.4	10.1	10.2	9.9	11.33
D1																
D2	S															
D3	N	N														
D4	N	N	N													
D5	N	N	N	N												
D6	N	S	N	N	N											
D7	N	S	S	S	N	N										
D8	S	S	S	S	S	S	N									
D9	S	S	S	S	S	S	N	N								
D10	S	S	S	S	S	S	N	N	N							
D11	N	S	S	N	N	N	N	S	N	S						
D12	N	S	N	N	N	N	N	S	N	S	N					
D13	S	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	N				
D14	S	S	S	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N			
D15	S	S	S	S	S	S	N	N	N	N	S	N	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 24 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C52.

C52

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	12.9	15.5	15.7	16.9	13.4	11.3	12.2	8.6	8.8	8.4	11.2	12.3	11.5	12.0	11.4	12.08
D1																
D2	S															
D3	N	N														
D4	S	N	N													
D5	N	S	N	S												
D6	N	S	S	S	N											
D7	N	S	N	S	N	N										
D8	S	S	S	S	S	S	S									
D9	S	S	S	S	S	N	N	N								
D10	S	S	S	S	S	N	S	N	N							
D11	N	S	S	S	N	N	N	S	N	N						
D12	N	S	N	S	N	N	N	S	N	S	N					
D13	N	S	S	S	N	N	N	S	N	N	N	N				
D14	N	S	N	S	N	N	N	S	N	N	N	N	N			
D15	N	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 25 – Resultado do teste de Tukey mostrando a influência das 15 dietas oferecidas na concentração do triacilglicerol C54.

C54

	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	Total
	6.04	7.54	6.81	8.69	5.94	4.39	6.02	3.38	3.07	3.58	4.49	5.52	6.15	6.59	6.48	5.453
D1																
D2	S															
D3	N	N														
D4	S	N	N													
D5	N	N	N	S												
D6	N	S	N	S	N											
D7	N	N	N	N	N	N										
D8	S	S	S	S	S	N	S									
D9	S	S	S	S	S	N	N	N								
D10	N	S	S	S	N	N	N	N	N							
D11	S	S	N	S	N	N	N	N	N	N						
D12	N	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N					
D13	N	N	N	N	N	N	N	S	N	N	N	N				
D14	N	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N			
D15	N	N	N	N	N	N	N	S	S	N	N	N	N	N		

D1 a D15 – composição das dietas.

S – significativamente diferente.

N – Não significativamente diferente.

Anexo 26 – Composição de triacilgliceróis da gordura de leite adulterada com óleo de soja.

Composição da gordura adulterada				
Ó. de Soja (%)	0	5	10	20
Leite (%)	100	95	90	80
T	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp
C26	0,14±0,01	0,13±0,01	0,15±0,00	0,12±0,00
C28	0,45±0,01	0,46±0,01	0,44±0,02	0,38±0,00
C30	0,80±0,01	0,83±0,03	0,79±0,01	0,67±0,01
C32	1,53±0,03	1,58±0,03	1,52±0,04	1,33±0,01
C34	3,56±0,03	3,35±0,01	3,47±0,08	3,07±0,05
C36	8,5±0,2	8,25±0,00	7,95±0,09	7,01±0,06
C38	13,4±0,3	13,3±0,2	12,69±0,08	10,61±0,09
C40	11,7±0,1	11,14±0,04	10,89±0,09	9,42±0,07
C42	5,80±0,08	5,57±0,02	5,39±0,01	4,66±0,03
C44	4,93±0,05	4,56±0,02	4,39±0,03	3,85±0,01
C46	5,62±0,08	5,18±0,02	4,97±0,05	4,35±0,01
C48	7,8±0,2	7,13±0,03	6,83±0,05	6,04±0,05
C50	12,8±0,3	11,8±0,2	11,52±0,09	10,71±0,07
C52	15,6±0,2	16,2±0,1	16,7±0,2	19,0±0,1
C54	7,6±0,3	10,5±0,2	12,3±0,2	18,8±0,2

T - triacilglicerol

M±dp – média de 3 injeções ± desvio padrão

Anexo 27 – Composição de triacilgliceróis da gordura de leite adulterada com óleo de girassol.

Composição da gordura adulterada				
Ó. de Girassol (%)	0	5	10	20
Leite (%)	100	95	90	80
T	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp
C26	0,14±0,01	0,15±0,01	0,14±0,01	0,12±0,00
C28	0,45±0,01	0,45±0,01	0,41±0,00	0,35±0,01
C30	0,80±0,01	0,83±0,02	0,75±0,01	0,64±0,01
C32	1,53±0,03	1,59±0,02	1,46±0,03	1,29±0,01
C34	3,56±0,03	3,67±0,03	3,44±0,08	3,08±0,02
C36	8,5±0,2	8,41±0,04	7,7±0,1	7,04±0,02
C38	13,4±0,3	12,77±0,02	12,26±0,03	10,82±0,05
C40	11,7±0,1	11,47±0,06	10,3±0,1	9,50±0,03
C42	5,80±0,08	5,67±0,05	5,16±0,03	4,72±0,03
C44	4,93±0,05	4,64±0,02	4,23±0,05	3,91±0,01
C46	5,62±0,08	5,23±0,01	4,78±0,05	4,47±0,02
C48	7,8±0,2	7,19±0,2	6,66±0,05	6,17±0,02
C50	12,8±0,3	11,84±0,04	11,14±0,03	10,47±0,09
C52	15,6±0,2	15,3±0,1	16,5±0,2	16,68±0,5
C54	7,6±0,3	10,82±0,06	15,1±0,3	20,7±0,2

T - triacilglicerol

M±dp – média de 3 injeções ± desvio padrão

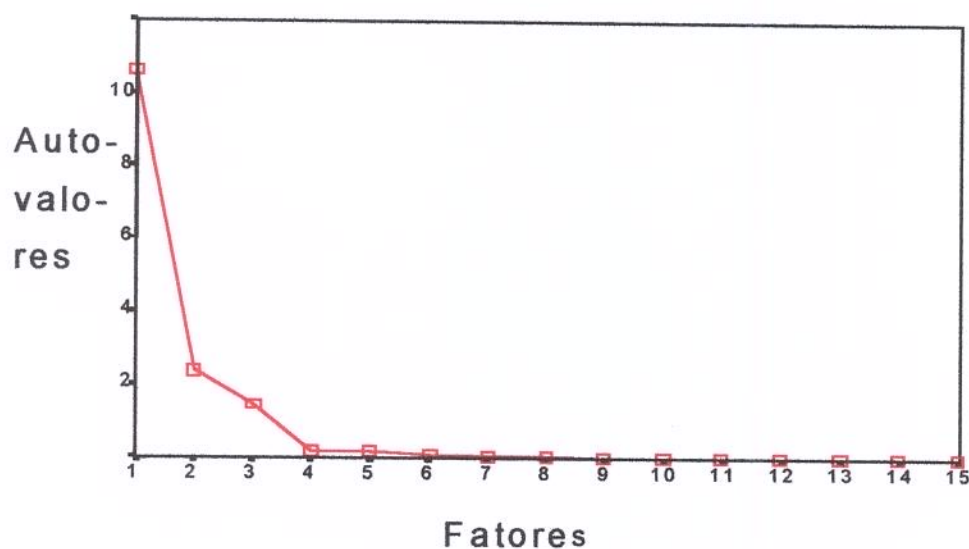
Anexo 28 – Composição de triacilgliceróis da gordura de leite adulterada com óleo de milho.

Composição da gordura adulterada				
Ó. de Milho (%)	0	5	10	20
Leite (%)	100	95	90	80
T	M±dp	M±dp	M±dp	M±dp
C26	0,14±0,01	0,14±0,01	0,14±0,00	0,11±0,01
C28	0,45±0,01	0,42±0,01	0,43±0,01	0,33±0,01
C30	0,80±0,01	0,78±0,01	0,77±0,03	0,60±0,02
C32	1,53±0,03	1,47±0,02	1,50±0,06	1,15±0,02
C34	3,56±0,03	3,55±0,03	3,41±0,02	2,93±0,02
C36	8,5±0,2	8,10±0,07	7,71±0,02	6,7±0,2
C38	13,4±0,3	12,9±0,1	12,16±0,03	10,7±0,2
C40	11,7±0,1	11,23±0,08	10,56±0,08	9,34±0,09
C42	5,80±0,08	5,54±0,05	5,19±0,05	4,63±0,04
C44	4,93±0,05	4,56±0,04	4,29±0,02	3,83±0,05
C46	5,62±0,08	5,20±0,03	4,88±0,02	4,36±0,06
C48	7,8±0,2	7,18±0,03	6,80±0,02	6,14±0,04
C50	12,8±0,3	11,98±0,03	11,56±0,06	10,95±0,09
C52	15,6±0,2	16,3±0,1	17,45±0,03	19,8±0,1
C54	7,6±0,3	10,6±0,2	13,16±0,07	18,5±0,6

T - triacilglicerol

M±dp – média de 3 injeções ± desvio padrão

Anexo 29 – Gráfico mostrando a importância dos fatores gerados.



Anexo 30 – Composição completa dos três fatores.

Variáveis	Fatores		
	1	2	3
C50	- 0,970	0,0714	0,0694
C28	0,960	0,147	0,113
C30	0,960	0,251	0,04207
C26	0,948	0,07457	0,123
C32	0,943	0,320	0,003410
C34	0,881	0,452	0,03357
C42	0,812	0,534	0,122
C52	- 0,768	- 0,578	- 0,217
C44	0,768	0,623	- 0,0319
C36	0,751	0,572	0,186
C48	- 0,0573	0,973	0,120
C46	0,615	0,782	- 0,0241
C54	- 0,417	- 0,760	-0,465
C40	- 0,0707	- 0,0266	0,972
C38	0,165	0,300	0,909

Anexo 31 – Teste t, mostrando as diferenças significativas entre os 3 fatores.

		Igualdade de variâncias		Test t de igualdade de médias						
		F	Sig	t	df	Sig (2 t)	Dif. Média.	Dif. erro padrão	95% dif. Int. confiança	
									Baixo r	Alto r
Escore F1	Variância assumida	45,425	0,000	1,995	253	0,047	0,4036	0,2023	0,0051	0,8021
	Não assumida			5,546	252,5	0,000	0,4036	0,0728	0,2603	0,5469
Escore F2	Variância assumida	3,126	0,078	11,238	253	0,000	1,8718	0,1665	1,5438	2,1998
	Não assumida			15,718	42,377	0,000	1,8718	0,1191	1,6315	2,1120
Escore F3	Variância assumida	0,823	,385	7,211	253	0,000	1,3393	0,1857	0,9735	1,7051
	Não assumida			7,152	32,331	0,000	1,3393	0,1873	0,9580	1,7206

Anexo 32 – Análise das variáveis (step wise)

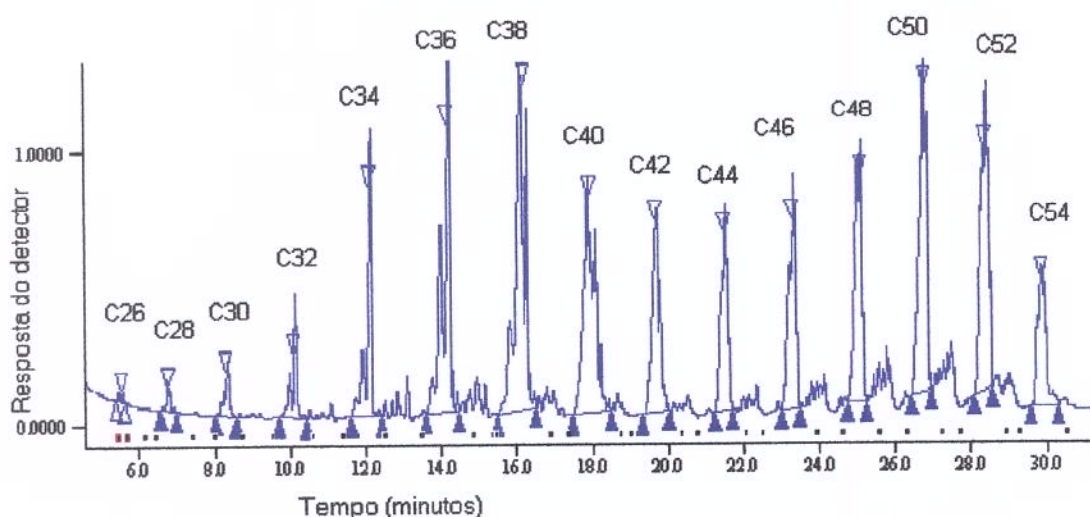
Etapas	Tolerância	F	Lamba de Wilks
Escore F2	1,000	126,303	
Escore do F2	0,897	168,998	0,830
Escore do F3	0,897	86,523	0,667
Escore do F2	0,886	173,745	0,814
Escore do F3	0,890	88,953	0,652
Escore do F1	0,984	8,078	0,497

Anexo 33 - Classificação dos resultados

Produto analisado			Predição dos grupos		Total
			Leite	Leite adulterado	
Dados	Contagem	Leite	226	2	228
		Leite adulterado	9	18	27
%		Leite	99,1	0,9	100,0
		Leite adulterado	33,3	66,7	100,0

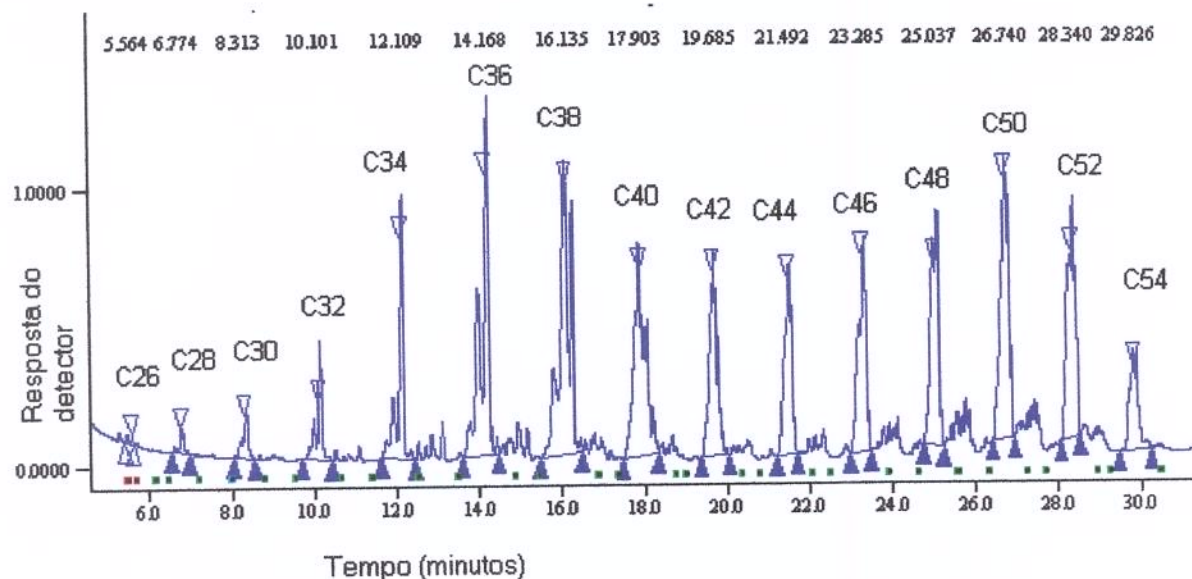
Anexo 34 – Predição dos resultados nos três percentuais de adulteração.

Produto analisado		Predição dos grupos		Total
		Leite puro	Leite adulterado	
Leite puro	Produto	226		228
	Total	226		228
Leite + 5% óleo de soja	Produto	3		3
	Total	3		3
Leite + 10% óleo de soja	Produto		3	3
	Total		3	3
Leite + 20% óleo de soja	Produto		3	3
	Total		3	3
Leite + 5% óleo de girassol	Produto	3		3
	Total	3		3
Leite + 10% óleo de girassol	Produto		3	3
	Total		3	3
Leite + 20% óleo de girassol	Produto		3	3
	Total		3	3
Leite + 5% óleo de milho	Produto	3		3
	Total	3		3
Leite + 10% óleo de milho	Produto		3	3
	Total		3	3
Leite + 20% óleo de milho	Produto		3	3
	Total		3	3



Anexo 35 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite integral tipo longa vida em embalagem “tetrapak”, marca P.

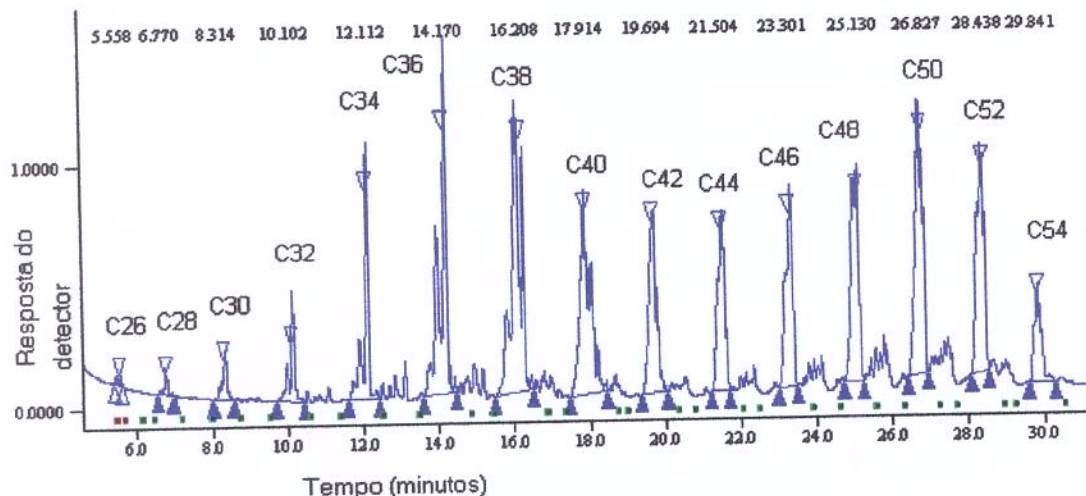
Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção “splitless”-2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min.



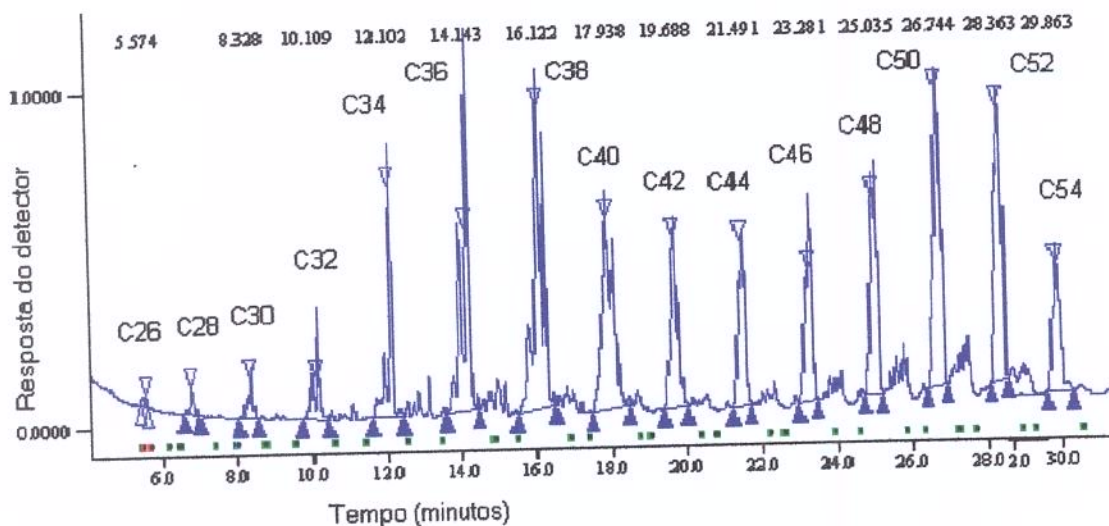
Anexo 36 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite tipo B comercial marca L.

Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção “splitless”-2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SECÃO CIRCULANTE

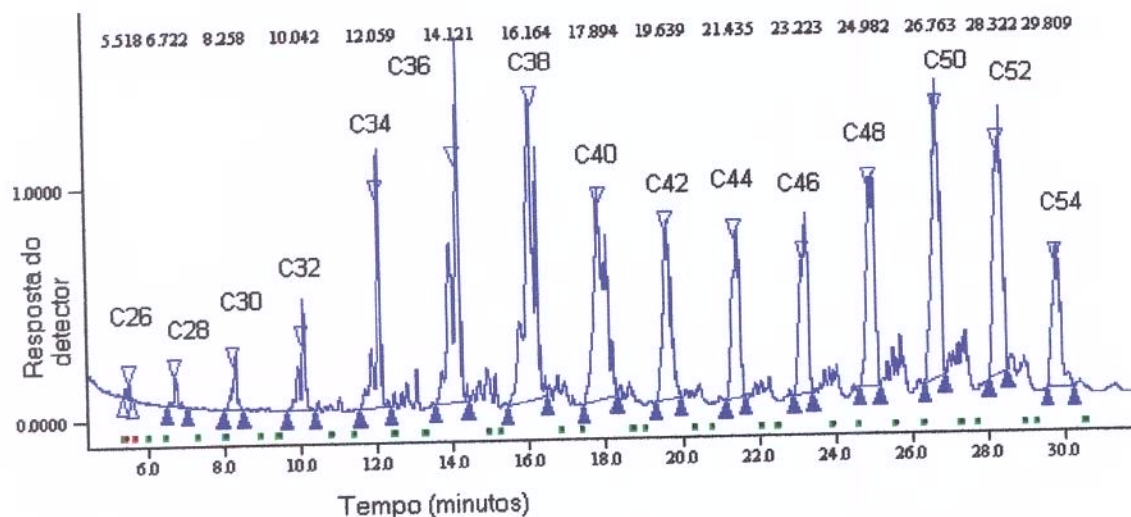


Anexo 37 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de leite tipo C comercial, marca L.
 Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção "splitless"-2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min.

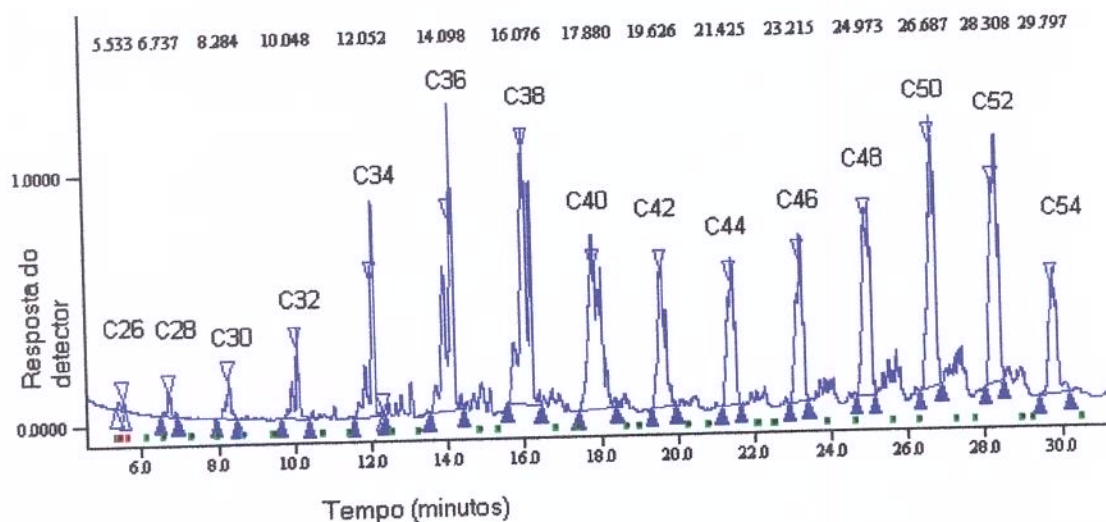


Anexo 38 – Perfil de triacilgliceróis de manteiga comercial, marca P.
 Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C 4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção "splitless"-2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



Anexo 39 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de queijo prato comercial marca L.
 Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)- 380°C a 200°C/min. Detector a 400°C. Injeção "splitless"- 2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min.



Anexo 40 – Perfil de triacilgliceróis de gordura de requeijão cremoso comercial, marca L.
 Coluna-95% metilfenilsilicone (30mx0,32mmx0,1µm)-210°C(1 min), 210-250°C (20°C/min) e 250-360°C (4°C/min). Injetor de 100°C (15 seg)-380°C (200°C/min). Detector a 400°C. Injeção "splitless"- 2 min. Velocidade linear de H₂ -2,1cm/min.