



ALINE LISBÔA MEDINA

**“RÁPIDA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS E TRANSESTERIFICAÇÃO DE
TRIACILGLICERÓIS DE AMOSTRAS CÁRNEAS
ASSISTIDOS POR MICRO-ONDAS”**

CAMPINAS

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALINE LISBÔA MEDINA

**“RÁPIDA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS E TRANSESTERIFICAÇÃO DE
TRIACILGLICERÓIS DE AMOSTRAS CÁRNEAS
ASSISTIDOS POR MICRO-ONDAS”**

Orientador(a): Profa. Dra. Neura Bragagnolo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciências.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA ALINE LISBOA MEDINA
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. NEURA BRAGAGNOLO

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

Medina, Aline Lisbôa
M468r Rápida extração de lipídios e transesterificação de triacilgliceróis de amostras cárneas assistidos por micro-ondas / Aline Lisboa Medina. -- Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Neura Bragagnolo.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Micro-ondas. 2. Extração. 3. Transesterificação. 4. Lipídios. 5. Validação. I. Bragagnolo, Neura. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Fast lipid extraction and triacylglycerides transesterification of meat samples by microwave assisted process.

Palavras-chave em inglês:

Microwave

Extraction

Transesterification

Lipids

Validation

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Neura Bragagnolo

Antonio Marsaioli Junior

Marcelo Antonio Morgano

Monica Roberta Mazalli

Sueli Regina Baggio

Data da defesa: 11-06-2013

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

Banca examinadora

Profa. Dra. Neura Bragagnolo

Orientadora

Prof. Dr. Antonio Marsaioli Junior

Membro titular

Instituto de Tecnologia de Alimentos (GEPC/ITAL)

Dr. Marcelo Antonio Morgano

Membro titular

Instituto de Tecnologia de Alimentos (CCQA/ITAL)

Prof. Dra. Monica Roberta Mazalli

Membro titular

Universidade de São Paulo (FZEA/USP)

Dra. Sueli Regina Baggio

Membro titular

Instituto de Tecnologia de Alimentos (CCQA/ITAL)

Profa. Dra. Inar Alves de Castro

Membro suplente

Universidade de São Paulo (FCF/USP)

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado

Membro suplente

Universidade Estadual de Campinas (FEA/UNICAMP)

Prof. Dr. Marco Aurelio Zezzi Arruda

Membro suplente

Universidade Estadual de Campinas (IQ/UNICAMP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela força, sabedoria e coragem para alcançar meus objetivos.

À minha família, especialmente aos meus pais, João e Delires, pelo amor acima de tudo e pelo incentivo à minha formação, não medindo esforços para que minhas escolhas fossem realizadas. Com certeza tudo o que consegui até o momento é porque tive pais maravilhosos me apoiando.

Ao meu noivo Masor, pelo amor, por acreditar, incentivar e me acompanhar nessa etapa da minha vida, tornando mais fácil e tranquilo seguir em frente.

À Profa. Dra. Neura Bragagnolo pela orientação durante a execução da minha tese de doutorado, o qual contribuiu para meu crescimento profissional, e pela amizade durante o tempo de trabalho.

Ao Prof. Dr. Marco Aurelio Zezzi Arruda e ao Prof. Dr. Antonio Marsaioli Jr. pelas contribuições e parceria durante o desenvolvimento da tese, assim como ao Dr. Marcelo Ancelmo Oseas da Silva e ao Dr. Herbert de Sousa Barbosa pela ajuda técnica e pelo aprendizado durante o desenvolvimento de parte do trabalho no Laboratório do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica (Instituto de Química – Unicamp).

Aos meus amigos do Laboratório de Química de Alimentos (FEA – Unicamp), pela convivência, amizade e aprendizado: Prof. Dra. Adriana Mercadante, Adria Bentes, Ana Augusta Xavier, Bruno Chacon, Debora Venâncio, Elisângela Madalozzo, Eliseu Rodrigues, Fabiane Petry, Fabíola Lima, Fernanda Mandelli, Hugo Souza, Jéssica Grigoletto, Karla Martins, Kleidson Lobato, Liliam

Mariutti, Lizziane Vissotto, Lucas Magalhães, Marcella Marques, Mery Yovana, Naira Rodrigues, Poliana Gurak, Regiane Palhares, Renan Chisté, Renata Sancho, Sarah Gurgel, Rosemar Santana, Viviane Miranda e Walkíria Ribeiro.

Aos membros, titulares e suplentes, da banca de tese de doutorado pelas contribuições, críticas e sugestões.

À Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP e ao Departamento de Ciência de Alimentos pela estrutura para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo auxílio financeiro.

RESUMO GERAL

O uso da energia de micro-ondas tem sido explorado para extração de compostos e para aceleração de reações químicas em diferentes amostras. Os métodos convencionais utilizados para extração de lipídios possuem limitações, como longo tempo, grande volume de solventes, e ainda a possibilidade de degradação dos compostos de interesse. Neste estudo foram desenvolvidos, com o uso de delineamento composto central rotacional, novos métodos de extração de lipídios e de transesterificação de triacilgliceróis em carnes, assistidos por micro-ondas. As condições utilizadas no procedimento para extração de lipídios foram: 300 mg de amostra, 54 °C e 15 minutos. O método de extração de lipídios em carnes assistido por micro-ondas resultou na obtenção de teores de lipídios sem diferença estatística do método de Folch. Além disso, não foi observada alteração na composição de ácidos graxos e formação de produtos de oxidação lipídica durante a extração, o que permite o uso do método sem a possibilidade de alteração química dos compostos. Para a transesterificação dos triacilgliceróis foram desenvolvidos dois métodos, sendo que no primeiro, a transesterificação é realizada no lipídio previamente extraído e no segundo método, a transesterificação é realizada diretamente nas amostras de carne. Em ambos os métodos foi excluído o uso de trifluoreto de boro, utilizado em metodologias convencionais como catalizador da reação. Nesse estudo, o hidróxido de sódio em metanol a 0,5 % foi utilizado como catalizador, sendo a reação acelerada pela energia de micro-ondas. Para a transesterificação dos triacilgliceróis da amostra de lipídios foram necessários 5 minutos de irradiação a 60 °C enquanto que na transesterificação direta de triacilgliceróis da amostra de carne, 30 minutos a 60 °C porém, no último caso, não é necessária a etapa da extração dos lipídios. Com o uso da energia de micro-ondas foi possível desenvolver métodos precisos e exatos para a extração de lipídios e obtenção de ésteres metílicos de ácidos graxos em carne.

Palavras-chave: micro-ondas, extração de lipídios, transesterificação, ácidos graxos, validação.

ABSTRACT

Microwave energy has been used for compound extractions and for accelerating chemical reactions in different samples. The conventional methods used for lipid extraction has limitations like long time required, large solvent volume, and the possibility of compound degradation. In this study were developed, with response surface method, new methods for microwave-assisted lipid extraction and microwave-assisted triacylglycerols transesterification from meat. The parameters used in this procedure were: 300 mg of sample, 54 °C and 15 minutes. The microwave-assisted lipid extraction method resulted in lipid content with no difference when compared to the Folch method. Furthermore, no oxidation products were observed during the extraction, enabling the use of this method with no chance of chemical alteration of the compounds. For the triacylglycerols transesterification were developed two methods, being the first one a lipid transesterification with a lipid previously extracted, and a second method that allows a direct sample transesterification. In both methods it was excluded the use of boron trifluoride, originally used in conventional methods as a reaction catalyst. In this study, methanol sodium hidroxide (0,5 %) was used as catalyst, with the reaction being accelerated by the microwave energy. For lipid transesterification it was necessary 5 minutes of irradiation at 60 °C, and for direct transesterification, 30 minutes at 60 °C, however, in the latter case, it is not necessary the lipid extraction step to obtain the fatty acids methyl esters. It can be concluded that the use of microwave energy provides accurate and precise methods, faster, with less solvent volumes and sample mass when compared to conventional methods.

Key-words: microwave, extraction, transesterification, lipids, fatty acids.

ÍNDICE

RESUMO GERAL	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUÇÃO GERAL	1
 CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	 7
1. Lipídios.....	9
1.1. Teores de lipídios e ácidos graxos em produtos cárneos.....	10
1.2. Oxidação de lipídios	13
1.2.1. Etapas da oxidação lipídica	14
1.3. Extração de lipídios	16
1.3.1. Extração de lipídios de acordo com Folch et al. (1957).....	17
1.3.2. Extração de lipídios de acordo com Bligh & Dyer (1959)	18
1.3.3. Soxhlet	19
2. Energia de micro-ondas	20
2.1. Extração assistida por micro-ondas.....	23
2.1.1. Fatores que influenciam a extração assistida por micro-ondas. 27	
2.1.1.1. Solvente extrator.....	27
2.1.1.2. Temperatura	29
2.1.1.3. Potência.....	30
2.1.1.4. Tempo de extração	30
2.1.1.5. Natureza da matriz.....	31
3. Análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa.....	32
3.1. Esterificação assistida por micro-ondas	36
4. Referências	38

CAPÍTULO II – RÁPIDA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DE CARNES ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	59
Resumo	61
1. Introdução	62
2. Materiais e métodos	64
2.1. Amostras	64
2.2. Reagentes	64
2.3. Determinação de umidade	65
2.4. Solvente extrator	65
2.5. Parâmetros de permissividade dielétrica dos solventes	66
2.6. Delineamento estatístico experimental	66
2.7. Determinação do teor de lipídios segundo Folch et al (1957)	67
2.8. Determinação do teor de lipídios por extração assistida por micro-ondas	67
2.9. Determinação dos ácidos graxos	68
2.10. Produtos oriundos da oxidação lipídica	69
2.10.1. Dienos conjugados	69
2.10.2. Teor de Peróxidos	69
2.10.3. Compostos voláteis	69
2.11. Validação da MAE	71
2.12. Análise estatística	72
3. Resultados e discussões	72
3.1. Umidade	72
3.2. Solvente extrator e parâmetros de permissividade dielétrica	73
3.3. Otimização da extração de lipídios assistida por micro-ondas	75
3.4. Produtos oriundos da oxidação lipídica	81
3.5. Validação da MAE	83

3.6. Aplicação.....	84
4. Conclusões	88
5. Agradecimentos	89
6. Referências	89

CAPÍTULO III – RÁPIDA TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS	93
RESUMO.....	95
1. Introdução	96
2. Materiais e métodos.....	98
2.1. Amostra	98
2.2. Reagentes	98
2.3. Determinação de umidade.....	98
2.4. Extração de lipídios	98
2.5. Determinação dos ácidos graxos	99
2.5.1. Esterificação segundo Joseph & Ackman (1992)	99
2.5.2. Transesterificação assistida por micro-ondas	99
2.5.3. Análise cromatográfica	100
2.6. Delineamento estatístico experimental	101
2.7. Validação da transesterificação assistida por micro-ondas	101
2.8. Análise estatística.....	102
3. Resultados e discussões	102
3.1. Otimização do método	102
3.2. Validação com material de referência certificado	111
4. Conclusão	112
5. Agradecimentos	112
6. Referências	112

CAPÍTULO IV – TRANSESTERIFICAÇÃO DIRETA DE TRIACILGLICERÓIS DE CARNE DE FRANGO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA GASOSA.....	117
Resumo	119
1. Introdução	120
2. Materiais e métodos.....	122
2.1 Amostras	122
2.2 Reagentes.....	122
2.3. Determinação de umidade.....	123
2.4. Determinação dos ácidos graxos	123
2.4.1. Esterificação segundo Joseph & Ackman (1992)	123
2.4.2. Transesterificação direta assistida por micro-ondas	124
2.4.3. Análise cromatográfica	124
2.5. Delineamento estatístico experimental	125
2.6. Validação da transesterificação assistida por micro-ondas	126
2.7. Análise estatística.....	126
3. Resultados e discussões	126
4. Conclusão	137
5. Agradecimentos	137
6. Referências.....	137
 CONCLUSÃO GERAL	 143

INTRODUÇÃO GERAL

As técnicas de preparação de amostras são de extrema importância para a realização de análises em laboratório. É nessa etapa que obtém-se seletivamente os compostos de interesse que serão analisados eliminando os interferentes.

A extração é o primeiro passo para a purificação, identificação e quantificação de compostos. Diferentes métodos de extração, como por solventes ou com refluxo em altas temperaturas, são utilizados há muitos anos. As técnicas convencionais são laboriosas, consomem tempo e envolvem alto consumo de solventes, podendo degradar compostos em função das altas temperaturas que podem estar sendo empregadas. As tecnologias de extração devem ser versáteis, simples, seguras e de baixo custo. Recentemente algumas tecnologias como a extração com fluído supercrítico, extração acelerada por solvente e extração por ultrassom, tem sido desenvolvidas para diferentes compostos, porém, podem apresentar custo relativamente alto (Kaufmann & Christen, 2002).

A extração assistida por micro-ondas (microwave assisted extraction, MAE) é uma técnica cujo seu uso tem sido evidenciado e muito utilizado nos últimos anos. A MAE utiliza a energia de micro-ondas combinada com solventes para a extração de compostos de interesse em diferentes matrizes. A temperatura e a pressão podem causar migração seletiva dos compostos para o solvente de maneira mais rápida e com recuperação similar ou melhores do que dos métodos convencionais, com as vantagens da redução de tempo e de consumo de solventes (Spigno & Favieri, 2009). Na literatura encontram-se muitos trabalhos

com aplicações da MAE, como antocianinas, pectina, polissacarídeos, dentre outros, porém, não foram reportados trabalhos de extração de lipídios em carnes assistida por micro-ondas (Sun et al., 2007; Wang et al., 2007; Tanongkankit et al., 2013; Zhao et al., 2013).

A análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa é um dos principais métodos utilizados para a separação e identificação desses compostos. Entretanto, é necessária, além da extração de lipídios da amostra, a etapa de esterificação dos ácidos graxos previamente a análise cromatográfica. Diferentes técnicas de esterificação estão disponíveis na literatura. Porém, em alguns casos, são necessários longo tempo de reação ou a utilização de reagentes de alto custo e toxicidade, como o trifluoreto de boro, para a obtenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (De La Fuente et al., 2006).

Durante as últimas duas décadas, a irradiação de micro-ondas tem sido utilizada para substituir o aquecimento convencional no desenvolvimento de várias reações químicas (Jiao et al., 2012; Rao et al., 2013; Theocharis & Andlauer, 2013). As reações assistidas por micro-ondas tem apresentado significativa aceleração, alto rendimento e obtenção de produtos com alta pureza (Hoz et al., 2005). Estudos onde as micro-ondas são utilizadas para a esterificação de ácidos graxos para análises cromatográficas também já foram reportados, porém, ainda utilizando compostos como tolueno ou trifluoreto de boro para a reação (Jeyashoke et al., 1998; Zara et al., 2012).

De acordo com o exposto, o presente trabalho teve como objetivos o desenvolvimento de métodos de extração de lipídios e transesterificação de triacilgliceróis de amostras cárneas assistidos por micro-ondas. Para atingir os

objetivos foi utilizado planejamento fatorial e validação. A validação foi realizada avaliando-se parâmetros de precisão e exatidão, através da comparação dos resultados obtidos pelo método otimizado com os resultados do método convencional utilizando amostras de carne e material de referência certificado. Para o método da extração de lipídios foi avaliado também a formação de compostos de oxidação lipídica. Adicionalmente, desenvolveram-se dois métodos de esterificação de ácidos graxos assistida por micro-ondas, sendo o primeiro através da transesterificação de lipídios previamente extraídos da amostra, e o segundo método, pela transesterificação direta da amostra, ambos sem a utilização de trifluoreto de boro na reação.

REFERÊNCIAS

De La Fuente, M.A., Luna, P., & Juárez, M. (2006). Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(9), 917-926.

Hoz, A., Diaz-Ortiz, A., Moreno, A. (2005). Microwave in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chemical Society Reviews*, 34, 164–178.

Jeyashoke, N., Krisnangkura, K., & Chen, S. (1998). Microwave induced rapid transmethylation of fatty acids for analysis of food oil. *Journal of Chromatography A*, 818, 133–137.

Jiao, J., Fu, Y., Zu, Y., Luo, M., Wang, W., Zhang, L., & Li, J. (2012). Enzyme-assisted microwave hydro-distillation essential oil from *Fructus forsythia*, chemical constituents, and its antimicrobial and antioxidant activities. *Food Chemistry*, 134, 235-243.

Kaufmann B, & Christen P. 2002. Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurized solvent extraction. *Phytochemical Analysis*, 13, 105–113.

Rao, T.S.C., Saha, S., Raolji, G.B., Patro, B., Risbood, P., Difilippantonio, M.J., Tomaszewski, J.E., & Malhotra, S.V. (2013). Microwave assisted Westphal condensation and its application to synthesis of sempervirine and related compounds. *Tetrahedron Letters*, 54(6), 487-490.

Spigno, G., De Faveri, D.M. (2009). Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of Food Engineering*, 93, 210–217.

Sun, S., Liao, X., Wang, Z., Hu, X., Chen, F. (2007). Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography – mass spectrometry. *European Food Research and Technology*, 225:511–523.

Tanongkankit, Y., Sablani, S.S., Chiewchan, N., & Devahastin, D. (2013). Microwave-assisted extraction of sulforaphane from white cabbages: Effects of

extraction condition, solvent and sample pretreatment. *Journal of Food Engineering*, 117, 151–157.

Theocharis, G., & Andlauer, W. (2013). Innovative microwave-assisted hydrolysis of ellagitannins and quantification as ellagic acid equivalents. *Food Chemistry*, 138(4), 2430-2434.

Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., Hu, X. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 693–700.

Zara, R.F., Bonafé, E.G., Martin, C.A., Souza, N.E., Muniz, E.C., & Visentainer, J.V. (2012). Preparation of fame by microwave irradiation using boron trifluoride as a catalyst. *American Journal of Analytical Chemistry*, 3, 288-294.

Zhao, B., Zhang, J., Guo, X., & Wang, J. (2013). Microwave-assisted extraction, chemical characterization of polysaccharides from *Lilium davidii* var. *unicolor* Salisb and its antioxidant activities evaluation. *Food Hydrocolloids*, 31(2), 346-356.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Lipídios

Os lipídios são compostos orgânicos que tem como principais características a baixa solubilidade em água, solubilidade em solventes orgânicos, contendo uma cadeia carbônica na molécula, e que estão presentes ou são derivados de organismos vivos. Dentre os lipídios incluem-se os ácidos graxos e seus derivados e substâncias relacionadas biossinteticamente ou funcionalmente a estes compostos (Gurr & James, 1971; Christie, 1982). São macronutrientes importantes para o crescimento e desenvolvimento de todos os organismos, não só pelo alto valor energético, mas também pela sua função estrutural e metabólica (Jump et al., 2005). Além disso, também desempenham papel importante na qualidade dos alimentos, pois contribuem com atributos como textura, gosto e aroma (Kolakowska & Sikorski, 2003).

O conteúdo total e a composição de lipídios em alimentos podem variar muito. A quantidade total, assim como a composição dos ácidos graxos consumidos pela população, têm recebido atenção crescente por órgãos públicos de saúde. As recomendações de ingestão diárias de lipídios são de que não se deve ultrapassar 30 % do consumo energético total, e mais da metade desta deve ser representada por ácidos graxos insaturados (FAO/WHO, 2003). O consumo de gorduras totais, ácidos graxos saturados (saturated fatty acid, SFA) e ácidos graxos *trans* estão fortemente relacionados com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Ácidos graxos *trans* são mais preocupantes que os SFA, já que

aumentam o nível de lipoproteínas de baixa densidade (*low-density lipoprotein*, LDL) e diminuem o nível de lipoproteínas de alta densidade (*high-density lipoprotein*, HDL) (Parodi, 2009). Essa condição contribui para o aumento da razão LDL/HDL, que é considerada um importante indicador do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Martin et al., 2007). Entretanto, estudos têm demonstrado os efeitos biológicos benéficos dos ácidos graxos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acid*, PUFA), como redução do nível de colesterol sanguíneo, redução no risco de doenças cardíacas, efeitos anti-inflamatórios e antitrombóticos (Ruiz-Rodriguez et al., 2010). Dentre os PUFA importantes, os ácidos graxos n-3 (ômega 3) e n-6 (ômega 6) são considerados essenciais, na medida em que não são sintetizados pelo organismo humano, devendo ser obtidos exclusivamente através da dieta (Schmitz & Ecker, 2008). O consumo mínimo recomendado de PUFA (ácidos graxos n-3 e n-6) para evitar o desenvolvimento e prevenção de doenças, de acordo com estudos epidemiológicos, é estimado em 6 a 11 % (FAO, 2010).

1.1. Teores de lipídios e ácidos graxos em produtos cárneos

Valores de lipídios em carne suína, bovina e de frango variam, em geral, de 1,5 a 2,6 g/100g, dependendo do corte avaliado (Bragagnolo & Rodriguez-Amaya, 2002; Bragagnolo & Rodriguez-Amaya, 2003; Castro et al., 2011). As carnes e seus derivados podem contribuir com quase metade do consumo dos SFA, além de serem as maiores fontes de ácido graxo monoinsaturado (*monounsaturated*

fatty acid, MUFA), e similares ao grupo dos cereais como fonte de PUFA n-3 e n-6 (Woods & Fearon, 2009).

Os ácidos graxos na carne são principalmente de cadeia média à longa, com 12 a 22 átomos de carbono na molécula. Pequenas quantidades de ácidos graxos de cadeia curta também estão presentes, como os de 8 e 10 carbonos. Espécies ruminantes e não ruminantes diferem nas proporções de PUFA nos tecidos devido à mudanças causadas pela digestão. Em suínos e aves (não ruminantes), os ácidos graxos da dieta são incorporados diretamente no tecido adiposo, e em bovinos (ruminantes), são extensivamente transformados a MUFA e SFA no rúmem do animal através da biohidrogenação por micro-organismos, onde apenas uma pequena porção, cerca de 10 % de ácido linoleico da dieta, torna-se disponível para a incorporação em tecidos (Wood et al., 2007; Wood et al., 2008). É por essa razão que, em bovinos, os PUFA são encontrados em menores proporções do que em suínos e frangos (Mourot & Hermier, 2001; Chilliard et al., 2008).

Fatores internos, tais como idade, peso, sexo, genótipo e castração têm influência principalmente sobre a quantidade de lipídios nesses alimentos. Dentre esses fatores, a genética é muito importante. A reprodução seletiva acarreta mudanças não só em relação a alterações no teor de lipídios totais, mas também na distribuição da gordura, que permite produzir animais com baixo teor de gordura subcutânea, sem diminuição da gordura intramuscular, o que é muito importante para as características organolépticas da carne (Canovas et al., 2009).

Os principais ácidos graxos comumente encontrados em carne bovina, de frango e suína, em sistemas de produção convencionais, estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Principais ácidos graxos (mg/100g) em carnes bovina (coxão mole), de frango (coxa) e suína (lombo)

Ácidos graxos	Carne bovina*	Carne de frango*	Carne suína**
Ac. Mirístico (14:0)	99 ± 9	29 ± 3	63 ± 4
Ac. Palmítico (16:0)	958 ± 61	1097 ± 124	801 ± 13
Ac. Esteárico (18:0)	498 ± 46	302 ± 22	310 ± 32
Ac. Oleico (18:1n-9)	1108 ± 118	1366 ± 77	1298 ± 105
Ac. Linoleico (18:2n-6)	35 ± 24	728 ± 94	287 ± 91
Ac. Linolênico (18:3n-3)	32 ± 10	25 ± 4	10 ± 1
Ac. Araquidônico (20:4n-6)	21 ± 5	46 ± 3	58 ± 0.0
Ac. Docosapentaenóico (22:5n-3)	0.1	23 ± 3	6. ± 0.0
Ac. Docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3)	0.1	14 ± 1	2 ± 0.0

Fonte: *Almeida et al., 2006; **Bragagnolo & Rodriguez-Amaya, 2002.

Em bovinos, suínos e frango, o ácido oleico (18:1n-9) é o principal ácido graxo insaturado na carne. Os músculos também contêm proporções significativas de ácidos graxos de cadeia longa (20-22) que são formados a partir do ácido linoleico (18:2n-6) e ácido linolênico (18:3n-3), pela ação das enzimas $\Delta 5$ e $\Delta 6$ dessaturase e elongase. O ácido araquidônico (20:4n-6) e ácido

eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) são produtos importantes e que possuem várias funções metabólicas, incluindo a produção de eicosanóides, que participam de sistemas de inflamação e imunidade (Wood et al., 2008). Quanto aos SFA, o ácido mirístico (14:0) e o ácido palmítico (16:0) têm sido significativamente associados ao risco de desenvolvimento de doença cardíaca coronariana, uma vez que aumentam o teor de colesterol total no sistema sanguíneo em humanos (FAO/WHO, 2003).

Os ácidos graxos na carne são encontrados em duas classes de lipídios, neutros (triacilgliceróis) e polares (fosfolipídios). Os lipídios neutros são a principal forma de lipídio (>90 %) encontrada no tecido adiposo (função de armazenamento), e os lipídios polares (função estrutural e metabólica), são constituintes de membranas celulares, que contribuem com 10 a 40 % do total de ácidos graxos do músculo. Os fosfolipídios possuem alta concentração de PUFA, sendo que o ácido linoleico (18:2n-6) é um dos principais ácidos graxos, presente em altas proporções (Wood et al., 2007).

1.2. Oxidação de lipídios

Durante o processamento e armazenamento de alimentos, os compostos lipídicos podem ser oxidados, sendo os ácidos graxos insaturados os principais alvos (Laguerre et al., 2007). O fenômeno de oxidação lipídica depende de mecanismos reacionais diversos e extremamente complexos, os quais estão relacionados com a estrutura lipídica e o meio onde esta se encontra. O número e a natureza das ligações duplas presentes, o tipo de interface entre os lipídios e o

oxigênio (fase lipídica contínua, dispersa ou em emulsão), a exposição à luz e ao calor, irradiação, a presença de pró-oxidantes, como íons metálicos, fotossensibilizadores (hemoglobina, riboflavina, clorofila) ou de antioxidantes, são fatores determinantes para a estabilidade oxidativa dos lipídios (Laguerre et al., 2007; McClements & Decker, 2010). Tais fatores, capazes de romper a barreira eletroquímica entre o oxigênio e as moléculas de ácido graxo insaturado constituem iniciadores da oxidação lipídica (Rosenthal, 1985; Kanner & Rosenthal, 1992).

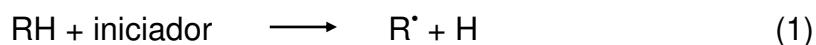
A oxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis tornando os alimentos impróprios para consumo, além de também provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos insaturados, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos potencialmente tóxicos (Ramalho & Jorge, 2006).

1.2.1. Etapas da oxidação lipídica

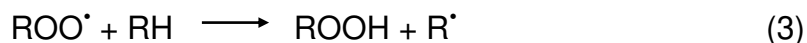
A oxidação lipídica é constituída de três fases principais: a iniciação, a propagação e a terminação (Lima & Abdalla, 2001; Laguerre et al., 2007), estando associadas à reação do oxigênio com compostos lipídicos insaturados.

O mecanismo de iniciação envolve a liberação do átomo de hidrogênio ligado ao carbono adjacente à ligação dupla do ácido graxo (RH), por exemplo, em função da interação de um iniciador (luz, calor, metais, irradiação, fotossensibilizador), resultando na formação de radical carbonila ($R^{\bullet}$) (equação 1)

(Ramalho & Jorge, 2001; McClements & Decker, 2010). O radical formado é estabilizado por um rearranjo molecular, que forma um dieno conjugado, ou seja, duas ligações duplas intercaladas por uma ligação simples. Esses compostos são os primeiros produtos de oxidação formados, porém ainda não acarretam em alterações organolépticas e físicas (Lima & Abdalla, 2001).



Na propagação, o radical carbonila pode reagir com oxigênio molecular formando novas espécies radicalares (equação 2), como radical peroxila ($\text{ROO}^{\bullet}$), que também pode abstrair um átomo de hidrogênio de outras moléculas de lipídios insaturados (equação 3), formando o hidroperóxido (ROOH). Os hidroperóxidos são compostos instáveis e, portanto, sua mensuração é limitada às fases iniciais da oxidação lipídica (Kamal-Eldin & Pokorný, 2005; McClements & Decker, 2010).



O processo de oxidação continua com a transformação dos hidroperóxidos em compostos não radicalares estáveis que podem ser de baixo e de alto peso molecular (produtos secundários de oxidação) (equações 4, 5 e 6). A decomposição de hidroperóxidos envolve a quebra de ligações duplas adjacentes ao grupo hidroxila, levando à formação de hidrocarbonetos, aldeídos, álcoois e cetonas voláteis, todos compostos de baixo peso molecular. Os compostos de alto

peso molecular formados são não voláteis incluindo aldeídos, triacilgliceróis oxidados e seus polímeros (Kamal-Eldin & Pokorný, 2005; Laguerre et al., 2007).



1.3. Extração de lipídios

A análise de lipídios em alimentos, em muitos casos, para propósitos quantitativos e qualitativos, requer a etapa preliminar de extração. O método de extração “ideal” deve ser quantitativo, não destrutivo, ser realizado em pouco tempo e com pouco consumo de solvente. Esse procedimento é difícil de alcançar, considerando que lipídios dividem-se em lipídios neutros (triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e esteróis), facilmente solúveis em solventes orgânicos apolares, como *n*-hexano, e lipídios polares (fosfolipídios e glicolipídios), que são difíceis de serem liberados dos outros componentes dos tecidos. Os lipídios polares interagem por ligações hidrofóbicas, forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e ligações iônicas. Portanto, os solventes utilizados para a extração de lipídios devem apresentar alta solubilidade para todos os compostos lipídicos e serem suficientemente polares para removerem os lipídios de seus sítios de ligação em membranas celulares e outros componentes celulares a que possam estar ligados (Smedes & Askland, 1999).

Algumas amostras requerem cuidados especiais para a obtenção da fração lipídica, pois fatores como co-extração dos componentes não-lipídicos e a oxidação indesejada podem influenciar a qualidade final da fração lipídica (Brum et al., 2009). Um grande número de métodos está disponível para a extração de lipídios de amostras biológicas. A maioria deles utiliza solventes orgânicos, normalmente em misturas como clorofórmio e metanol. Esses métodos produzem grande quantidade de resíduos com solventes tóxicos. O interesse na extração de lipídios e a falta de automação nos métodos convencionais de extração tem levado a pesquisa contínua nesse tópico. Além disso, a necessidade de análises rápidas e fáceis tem promovido o desenvolvimento de novas técnicas (Sahena et al., 2009). Os procedimentos clássicos idealizados por Soxhlet em 1879, com refluxo do solvente por muitas horas podem favorecer reações de oxidação e hidrólise, comprometendo resultados analíticos posteriores, como a quantificação de certos componentes lipídicos. Alguns dos procedimentos de extração mais versáteis e efetivos, que superam as dificuldades mencionadas acima, são os métodos de Folch et al. (1957), procedimento que utiliza clorofórmio-metanol, e Bligh & Dyer, uma versão simplificada do método anterior. Dependendo do tipo de tecido que será analisado, a escolha do método de extração influencia significativamente o resultado final (Smedes, 1999).

1.3.1. Extração de lipídios de acordo com Folch et al. (1957)

O uso de um único solvente não é recomendável para a extração dos lipídios de tecidos animais. A mistura de solventes ideal para extração da matéria

lipídica de tecidos deve ser suficientemente polar para removê-la das associações com as membranas celulares ou com lipoproteínas, e também apolar para remoção de lipídios neutros, sem que ocorra reação química. Folch et al. (1957) levaram em consideração as características intrínsecas das amostras e desenvolveram um método utilizando uma mistura de clorofórmio e metanol, apresentando capacidade de extração de lipídios neutros e lipídios polares eficientemente. A água endógena dos tecidos é um componente ternário do sistema, auxiliando na extração, sendo que após homogeneização da amostra com os solventes, ocorre também a adição de solução de cloreto de potássio, visando uma melhor separação das fases. A insolubilidade dos lipídios em água torna possível sua separação das proteínas, carboidratos e da água nos tecidos (Brum et al., 2009). Após a obtenção do extrato lipídico, o mesmo tem seu solvente evaporado com quantificação realizada de forma gravimétrica (Folch et al., 1957).

Apesar de algumas desvantagens, como a toxidez dos solventes usados, a indesejável extração dos contaminantes não-lipídicos da fase orgânica, o longo tempo de extração e o fato de ser um método extremamente laborioso, o método de Folch et al. (1957) é largamente utilizado (Rossato et al., 2009; Enser et al., 1998; Baggio & Bragagnolo, 2006; Sancho et al., 2011).

1.3.2. Extração de lipídios de acordo com Bligh & Dyer (1959)

O método de Bligh & Dyer (1959) é uma simples adaptação do método descrito por Folch et al. (1957). Foi desenvolvido levando em consideração

propósitos econômicos (com redução do volume de solvente) para extração de lipídios em tecidos como músculo de peixe, que contem relativamente poucos lipídios e alta proporção de água, sendo também bastante utilizado para a extração de lipídios em leite e derivados (Nakajima et al., 1992; Wada e Fang, 1992; Antonopoulou et al., 1996; Cruz et al., 2009). O procedimento reconhece a importância da água na extração dos lipídios de muitas amostras, desenvolvendo papel importante na purificação e separação do extrato lipídico.

A principal vantagem do método descrito por Bligh e Dyer é a redução da razão solvente/amostra (1 parte de amostra para 3 partes de solvente clorofórmio:metanol 1:2, v/v), sendo capaz de recuperar acima de 95 % de lipídios totais da amostra (Bligh & Dyer, 1959). Por outro lado, assim como no método de Folch et al (1957), o procedimento pode acarretar em perda de lipídios da fase orgânica para a fase aquosa. Lipídios de maior polaridade, como fosfolipídios, podem ser perdidos durante a separação de fases (Shahidi & Wanasundara, 2002).

1.3.3. Soxhlet

Nos últimos 126 anos, a extração por Soxhlet tem sido uma das técnicas de extração convencional mais utilizada em diferentes amostras (Boer, 1988; Lam & Proctor, 2001; Zaidul et al., 2007), sendo aplicada com os seguintes propósitos: etapa de extração para o isolamento de constituintes e modelo bem estabelecido para a comparação de novas técnicas de extração alternativas. Uma das principais desvantagens da extração por Soxhlet é o tempo de extração, que pode

ser de 8 a 24 horas, o que resulta do consumo considerável de tempo e energia. O longo tempo torna o processo laborioso e limita o número de amostras que podem ser processadas. O uso de grande volume de solventes orgânicos requer uma etapa adicional de recuperação e subsequente evaporação para concentração do extrato, prejudicial ao meio ambiente (Mandal et al., 2007).

As mais notáveis vantagens que o método de Soxhlet apresenta são: a amostra está sempre em contato com o solvente, havendo uma constante renovação do mesmo; é um método simples que não requer treinamento especializado e que possibilita a extração de uma quantidade maior de óleo em relação a outros métodos, sem a necessidade de filtração do extrato após o término da extração, pois a amostra esteve envolta em um cartucho durante todo o procedimento (Luque De Castro & García-Ayuso, 1998).

2. Energia de micro-ondas

Desde a II Guerra Mundial que a energia de micro-ondas tem sido utilizada, sendo que sua primeira aplicação comercial foram os fornos domésticos. A energia de micro-ondas é uma radiação eletromagnética com frequência situada no intervalo compreendido entre 0,3 a 300 GHz, e com comprimentos de onda que se estendem entre 1 mm e 1 m (Camel, 2000). No espectro eletromagnético (figura 2), as radiações de micro-ondas estão localizadas na região entre a radiação infravermelha e ondas de rádio. As bandas de frequências permitidas para aplicações em eletrotermia (energia elétrica utilizada para produzir calor) são restritas, a fim de evitar interferências nas faixas de frequência utilizadas em

telecomunicações, operando em quatro faixas: 915 ± 25 , 2.450 ± 13 , 5.800 ± 74 e 22.125 ± 125 MHz. Os fornos de micro-ondas comerciais fabricados para uso doméstico ou para laboratórios empregam micro-ondas na frequência de 2.450 MHz (Lidström et al., 2001).

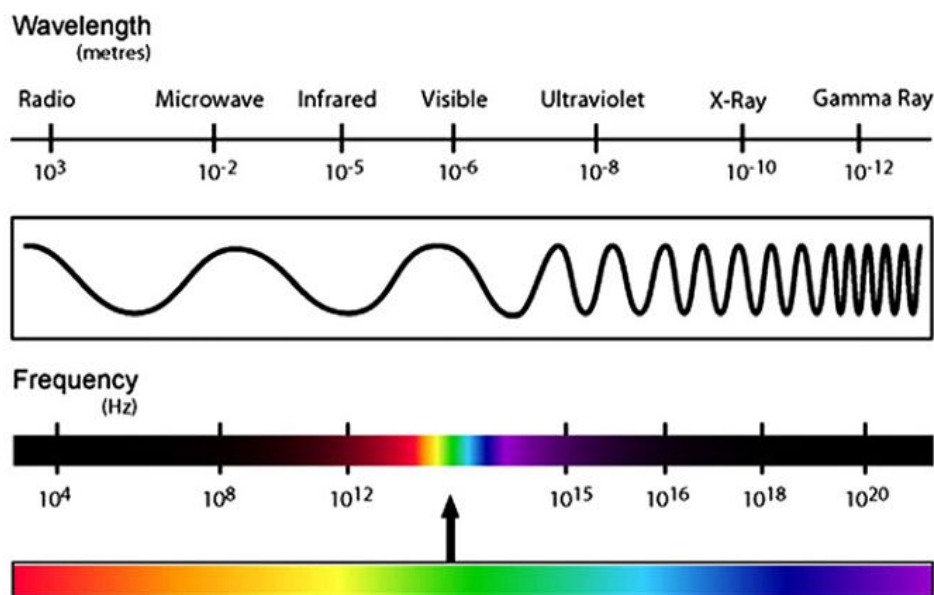


Figura 2 – Espectro eletromagnético.

Fonte: Motasemi & Ani, 2012

O princípio do aquecimento com energia de micro-ondas baseia-se no efeito direto exercido nas moléculas por condução iônica e rotação dipolar. Em muitas aplicações, estes dois mecanismos atuam simultaneamente. A condução iônica consiste na migração eletroforética de íons quando um campo eletromagnético é aplicado. A resistência da solução para este fluxo de íons irá resultar em atrito e, assim, a solução é aquecida. Na rotação dipolar ocorre um realinhamento dos dipolos da molécula, que se orientam em direção ao campo eletromagnético aplicado. A 2.450 MHz os dipolos se alinham $4,9 \times 10^9$ vezes por

segundo, o que força o movimento molecular, resultando na liberação de energia térmica para o meio (Zheng et al., 2009).

Os mecanismos acima indicam claramente que apenas os materiais dielétricos ou os solventes com dipolos permanentes podem ser aquecidos sob a influência das micro-ondas. A eficiência do aquecimento sobre a energia de micro-ondas depende do fator de dissipação ($\tan \delta$), que mensura a habilidade do solvente em absorver a energia de micro-ondas e passá-la em forma de calor para as moléculas ao redor. O fator de dissipação é dado pela equação 7:

$$\tan \delta = \varepsilon'' / \varepsilon' \quad (7)$$

onde ε'' é a perda dielétrica, que indica a eficiência da conversão da energia de micro-ondas em calor, e ε' é a constante dielétrica, que mensura habilidade em absorver a energia de micro-ondas (Zuloaga et al., 1999). De acordo com a capacidade de dissipação da energia das micro-ondas, os materiais se classificam em: condutores, que refletem toda a radiação que incide sobre os mesmos (por exemplo, os metais), isolantes, que são transparentes às micro-ondas, ou seja, não interagem com essas radiações, e dielétricos, que absorvem a energia das micro-ondas incidentes sobre os mesmos (figura 3) (Haque, 1999).

As vantagens do processo de aquecimento pelo emprego de micro-ondas em relação ao convencional estão relacionadas ao fato de que as micro-ondas proporcionam o aquecimento sem condução ou convecção, havendo transferência de energia com rapidez, ocorrendo em todo material, além do alto nível de

segurança, controle e automação proporcionado, redução do tamanho do equipamento e de desperdícios (Jones et al., 2002).

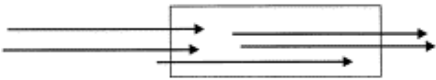
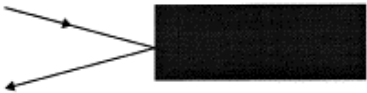
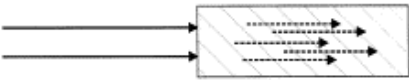
	Tipo de material	Penetração
	Transparente (não aquece)	Transmissão total
	Condutor (não aquece)	Nenhuma
	Absorvedor (aquece)	Parcial a total absorção

Figura 3 – Interação das micro-ondas com os materiais, adaptado de Haque (1999)

2.1. Extração assistida por micro-ondas

O uso da energia de micro-ondas para o tratamento de amostras tem atraído interesse nos últimos anos. Inicialmente foi utilizada para digestão de amostras (Abu-Samra et al., 1975), sendo que, em estudos recentes, várias aplicações têm sido reportadas sobre o uso das micro-ondas para extração de compostos orgânicos e organometálicos de diversas matrizes. O desenvolvimento de sistemas comerciais de micro-ondas específicos para extração tem feito aumentar o interesse nessa técnica (Camel, 2000). A extração assistida por micro-ondas (microwave assisted extraction, MAE) é um processo de extração que combina a energia de micro-ondas e extração com solventes para extrair

compostos de interesse. A temperatura e a pressão podem causar uma migração seletiva dos compostos para o solvente que os rodeia, ocorrendo de forma mais rápida e com melhor reprodutibilidade do que quando comparado com os métodos convencionais de extração. Dentre os estudos realizados com a aplicação da MAE estão, por exemplo, a extração de saponinas de ginseng (Kwon et al., 2003), fenóis totais de chá preto (Spigno & Faveri, 2009), flavonoides de plantas (Gao et al., 2006), metais de solos e peixes (Lu et al., 2003; Khajeh, 2009), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Pena et al., 2006), antocianinas de milho roxo (Yang & Zhai, 2010) e pectina de maçã (Wang et al., 2007). Alguns estudos de extração de lipídios já foram realizados utilizando um equipamento chamado “focused microwave-assisted Soxhlet extractor” (FMASE), que utiliza os princípios da extração por Soxhlet, sendo o processo de aquecimento acelerado pela utilização das micro-ondas (García-Ayuso, et al., 1999; García-Ayuso, et al., 2002; Priego-Capote & Luque de Castro, 2002).

Atualmente, um equipamento de MAE concebido para fins de laboratório é mais seguro para operar e oferece ao usuário várias maneiras de controlar o processo de extração, como sensores para controle de temperatura e pressão. Na figura 4 é apresentado um sistema extrator de micro-ondas (Camel, 2000).

O efeito da energia de micro-ondas é fortemente dependente da natureza do solvente e da matriz. Basicamente, a matriz a ser analisada é imersa em um solvente extrator, sendo submetida à irradiação de micro-ondas, que atravessam pelo solvente e penetram na estrutura da matriz. A eficiência da absorção é relacionada às propriedades dielétricas do solvente e da matriz, sendo o material sólido extraído e então removido (por exemplo, com filtração) resultando num

extrato, da mesma maneira como em outros processos convencionais de extração (Bélanger & Paré, 2006; Zheng et al., 2009).

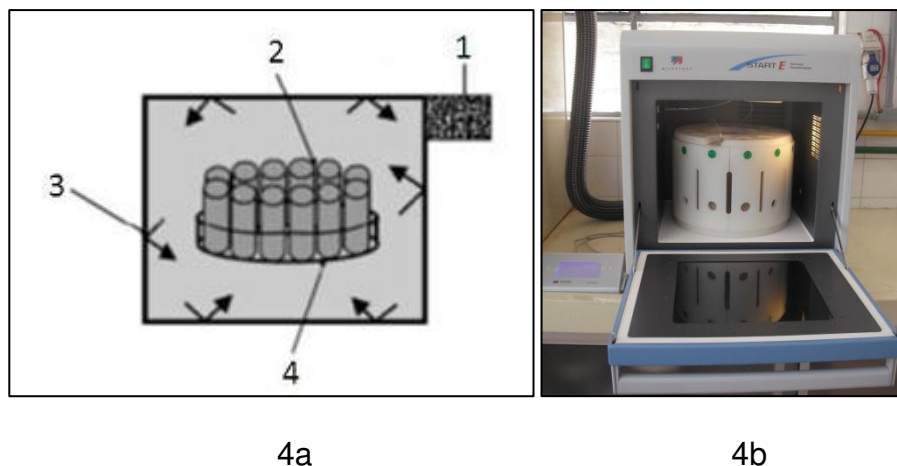


Figura 4. (4a) Esquema do sistema extrator de micro-ondas: (1) magnetron; (2) frascos para extração; (3) energia de micro-ondas na cavidade interna; (4) rotor para os frascos de extração. (4b) Foto de sistema extrator de micro-ondas.

Uma extração bem sucedida requer a preservação de todos os compostos originais. É imperativo, portanto, controlar a potência, a temperatura e o tempo de exposição para evitar a degradação dos compostos (Nóbrega et al., 2002). Devido aos muitos fatores que influenciam a MAE, a otimização dos protocolos de extração é de extrema importância. Diferentes parâmetros são estudados na otimização das extrações, dentre eles a composição e o volume do solvente extrator, a temperatura e o tempo de extração, além das características da matriz, incluindo o teor de água (Xiong et al., 2000; Pena et al., 2006; Khajeh, 2009; Hayat et al., 2009; Talebpour et al., 2009; Zheng et al., 2009; Yang & Zhai, 2010).

Com o objetivo de estudar os danos celulares nas matrizes provocados em experimentos com MAE, as amostras podem ser examinadas por microscopia

eletrônica de varredura (scanning electron microscopy, SEM) (Sun et al., 2007; Yan et al., 2010). A SEM em amostras que passaram por MAE mostra que a superfície celular é praticamente destruída, o que sugere que o tratamento com micro-ondas afeta a estrutura da célula devido ao aumento brusco da temperatura e, conseqüentemente, pelo aumento da pressão interna. Mudanças destrutivas nas células dos tecidos de framboesa devido à MAE foram observadas com SEM. Essas mudanças provocaram um aumento considerável no rendimento de extração de antocianinas dessa matriz (Sun et al., 2007). Além disso, a migração dos íons provocada pelas micro-ondas aumenta a penetração do solvente na matriz, facilitando a liberação dos constituintes. Esse mecanismo da MAE baseado na exposição dos analitos ao solvente é diferente da extração que utiliza calor e refluxo, que depende de uma série de permeações e solubilizações para extração do analito da matriz (Mandal et al., 2007).

Em estudos onde a MAE de diferentes compostos é realizada, normalmente, os resultados são comparados com os resultados obtidos pela extração com os métodos convencionais ou inovativos, como por exemplo, a extração com Soxhlet (Hao et al., 2002; Hemwimon et al., 2007), extração por fluído supercrítico, ultrassom e agitação magnética (Hao et al., 2002, Beejmohun et al., 2007; Hayat et al., 2009). Na maioria das vezes, MAE leva vantagens ou então apresenta resultados equivalentes comparados às técnicas clássicas em função do menor consumo de solventes, rapidez, recuperação, principalmente de compostos ligados que não são facilmente liberados nas técnicas convencionais. Além disso, essa técnica é adequada para análises de rotina, sendo que os

solventes utilizados nas técnicas clássicas podem ser adaptáveis à MAE ou então substituídos.

2.1.1. Fatores que influenciam a MAE

2.1.1.1. Solvente extrator

A escolha correta do solvente é fundamental para a obtenção de um processo de extração ótimo, e é ditada pela solubilidade do composto a ser extraído, pela interação entre o solvente e a matriz e pelas propriedades de absorção das micro-ondas pelo solvente. Preferencialmente o solvente deve ter alta seletividade com o composto de interesse, excluindo compostos indesejáveis (Letellier et al., 1999).

É comum o desenvolvimento de alguma técnica com MAE utilizando o mesmo solvente da extração convencional. Entretanto, solventes ótimos para a MAE podem não ser os mesmos utilizados nos procedimentos convencionais. Alfaro et al. (2003) observaram que a MAE de óleo essencial de gengibre utilizando hexano apresentou menor rendimento do que na extração com hexano em Soxhlet. Por outro lado, o uso de etanol na MAE forneceu significativo aumento no rendimento da extração quando comparado com a extração em Soxhlet com etanol. Isso pode ser explicado devido às diferenças nas propriedades dielétricas dos solventes, já que o hexano é transparente às micro-ondas e, portanto, não aquece sob o efeito da irradiação, enquanto o etanol apresenta boa capacidade de absorção das micro-ondas e, portanto, aquece

rapidamente, influenciando no processo de extração. Assim, as propriedades dielétricas do solvente extrator frente às micro-ondas desenvolvem papel importante na MAE.

Na maioria das vezes, o solvente escolhido possui uma alta constante dielétrica, absorvendo fortemente a energia de micro-ondas, como por exemplo, a água. Para propósitos particulares, solventes com baixa constante dielétrica podem ser utilizados. Isso permite a extração de solutos em um solvente que praticamente não aquece sob o efeito das micro-ondas, evitando a degradação de compostos termolábeis. Em casos onde necessita o aquecimento, a matriz pode ser utilizada para a absorção da energia e transferir o calor para o solvente de baixa constante dielétrica. O aquecimento ainda pode ser realizado adicionando água à matriz (processo chamado de pré-lixiviação) ou até mesmo ao solvente (Hemwimon, 2007). A adição de Weflon (material inerte de teflon impregnado com carbeto de silício, estável a 350 °C) também pode ser utilizado para absorver as micro-ondas e transferir o calor à amostra e ao solvente, mostrando-se eficiente (Camel, 2000).

O volume do solvente também influi na eficiência das extrações. O solvente deve ser suficiente para que a amostra fique totalmente imersa durante a irradiação. Maior volume de solvente demonstrou ser efetivo na extração de isoflavonas de soja, onde foram atingidos valores máximos com o volume de 25 mL de solvente (Hao et al., 2002; Rostagno et al., 2007). Porém, na MAE, uma maior razão de volume de solvente para massa de amostra pode não gerar melhores rendimentos devido à distribuição e exposição não uniforme das micro-ondas. Durante a MAE de isoflavonas da planta *Radix puerariae*, por exemplo, a

extração foi eficiente ao utilizar o menor volume de solvente em relação à amostra (2,5 mL) (Guo et al., 2001), sendo que o mesmo também acontece na extração de metilmercúrio em sedimentos aquáticos, cujo volume do solvente não é influente no processo e, portanto, utiliza-se o menor valor para a extração (Vazquez et al., 1997).

2.1.1.2. Temperatura

A temperatura é de extrema importância para atingir alta eficiência na extração, sendo que valores elevados normalmente aumentam a extração, como resultado do aumento da difusividade do solvente para partes internas da matriz, bem como o aumento da dessorção dos componentes da matriz. Em altas temperaturas, enquanto a tensão superficial e a viscosidade do solvente diminuem, aumenta o umedecimento e a penetração do solvente na amostra (Mandal et al., 2007).

Hemwimon et al. (2007) verificaram que, ao aumentar a temperatura de 60 para 120 °C, houve um aumento significativo na eficiência da extração de antraquinonas, o que pode ser causado pela diminuição de interações moleculares causadas pelo solvente, aumentando a movimentação molecular, causando o aumento da solubilidade. Também pode ter causado o rompimento das células da matriz, que como resultado, aumentam a disponibilidade dos compostos para a extração com o solvente. Entretanto, durante a extração de compostos termolábeis, a temperatura deve ser estritamente controlada para evitar a degradação dos analitos.

2.1.1.3. Potência

Alta potência gera rápido e intenso aumento da temperatura, que consequentemente influencia na eficiência da extração. Entretanto, baixa potência pode romper a estrutura celular de maneira mais branda, fazendo com que os constituintes celulares sejam arrastados seletivamente durante a MAE. A potência deve ser escolhida corretamente para evitar o excesso de temperatura, que pode causar degradação dos solutos e excesso de pressão no interior do frasco (Mandal et al., 2007).

Durante a extração de ácidos fenólicos de cascas de citros (Hayat et al., 2009), os resultados obtidos demonstraram que a potência influencia no processo, porém, é dependente dos outros parâmetros da extração. Quando a potência é selecionada durante a irradiação, o valor será o máximo a ser alcançado no processo. Entretanto, ao selecionar também a temperatura da extração, o equipamento varia os valores de potência, não ultrapassando o valor selecionado, para manter a temperatura conforme a programação.

2.1.1.4. Tempo de extração

Como em outras técnicas de extração, o tempo é um parâmetro que dever ser levado em consideração. Geralmente, ao aumentar o tempo de extração, a quantidade de analitos extraída também aumenta, embora possa resultar em degradação quando são extraídos compostos termolábeis (Camel, 2000; Mandal et al., 2007). De acordo com o estudo que comparou o tempo de extração de

saponinas de *Radix Astragali*, ao variar de 1 a 12 minutos, os resultados demonstram que os maiores rendimentos de extração foram obtidos com até 5 minutos a 70 °C, sendo que, acima de 5 minutos os compostos foram decompostos em função do maior tempo de irradiação (Yan et al., 2010). O mesmo fenômeno foi observado na extração de antocianinas em framboesas (Sun et al., 2007), onde o tempo ótimo de extração foi de 12 minutos, sendo que acima desse valor, houve decréscimo na extração dos compostos.

O estudo da otimização do tempo no método de extração é vital, já que o mesmo pode variar dependendo da matriz utilizada. As propriedades dielétricas do solvente também influenciam o tempo de irradiação. Solventes como água, etanol e metanol podem aquecer rapidamente e se o tempo de extração for longo, ocorre o risco da degradação de compostos termolábeis (Mandal et al., 2007). Alguns trabalhos conseguiram realizar extrações com tempo de 40 segundos e 1 minuto cujos resultados, demonstraram a eficiência na MAE (Guo et al., 2001; Li et al., 2004).

2.1.1.5. Natureza da matriz

As características da matriz como a natureza do material e o tamanho da partícula irão afetar a recuperação de compostos. O teor de água da matriz é de extrema importância, já que as moléculas de água são polares e, portanto, absorvem energia de micro-ondas de maneira eficiente, convertendo-a em calor, o que resulta em um aumento da temperatura e da pressão no interior da matriz. Como consequência, a estrutura celular é rompida e o fluxo dos constituintes da

matriz para o solvente é facilitado (Bélanger & Paré, 2006; Zheng et al., 2009). Alguns estudos realizaram a imersão de amostras secas no solvente ou em água antes da MAE para aumentar a percentagem de extração (Pan et al., 2000; Pan et al., 2001; Li et al., 2004; Talebi et al., 2004). Durante a extração de pesticidas clorados utilizando iso-octano, o aquecimento do sistema só foi obtido em função da água adicionada ao solvente, já que as micro-ondas só são absorvidas levemente pelo iso-octano (Onuska & Terry, 1993).

O tamanho da partícula da matriz também pode provocar efeito na recuperação dos compostos. Quanto menor a partícula, maior pode ser a extração em função da área superficial, que promove melhor contato entre o solvente e a matriz. Além disso, partículas pequenas permitem ou facilitam a penetração das micro-ondas. Esse fenômeno foi observado durante a extração de artemisina por MAE, onde quanto menor o tamanho da partícula, maior a extração do composto (Hao et al., 2002). Uma das desvantagens da partícula de tamanho pequeno é, em alguns casos, a dificuldade da separação do solvente após a irradiação. Normalmente, etapas de centrifugação e/ou filtração são necessárias para obter uma separação que seja satisfatória (Mandal et al., 2007).

3. Análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa (gas chromatography, GC) é um procedimento de rotina para a análise de ácidos graxos. A derivação das amostras é necessária para formar compostos com características adequadas para serem analisados, ou seja, através da introdução de grupos específicos, diminuindo o ponto de ebulição,

possibilitando sua volatilidade em menor temperatura durante a análise (Bonato, 2006). Nesse sentido, a esterificação dos ácidos graxos para ésteres metílicos de ácidos graxos (fatty acid methyl esters, FAME) são utilizados quase que universalmente para análise de ácidos graxos em GC (Shantha & Napolitano, 1992).

Os métodos de esterificação mais comuns usados para análise em GC envolvem a transesterificação e a esterificação para formação de FAMES (Shanta e Napolitano, 1992; Brondz, 2002; Meier et al., 2006). O termo transesterificação é utilizado na literatura quando o método envolve uma catálise (ácida ou básica), havendo uma dupla troca de triacilgliceróis em ésteres de ácidos graxos (figura 5). O processo pode ser reversível, mas na presença de excesso de álcool o equilíbrio da reação é deslocado de modo que a reação seja completa. O termo esterificação é empregado na literatura quando o método envolve uma catálise (ácida ou básica), por promover a reação entre os ácidos graxos com álcoois gerando ésteres de ácidos graxos (Wright et al., 1944, Freedman et al., 1986, Gutnikov, 1995).

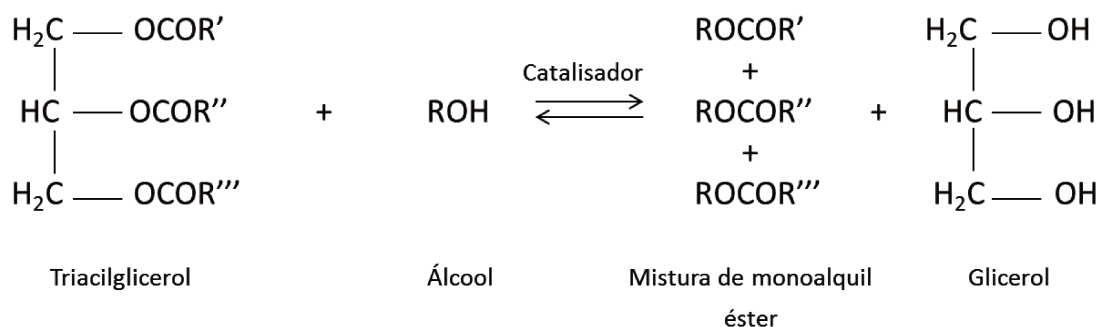


Figura 5. Transesterificação de triacilgliceróis gerando ésteres metílicos e glicerol.

A transesterificação de triacilgliceróis pode ser realizada de duas maneiras, através da transesterificação do lipídio extraído da amostra ou através da transesterificação direta na amostra, sem extração prévia dos lipídios. Na transesterificação direta há economia de tempo de análise e solventes, pois ocorre a síntese de ésteres de ácidos graxos por extração e derivação simultâneas. A diminuição na manipulação da amostra contribui para diminuir o erro experimental. O teor de água dos alimentos, a quantidade de amostra, a escolha dos reagentes (catalisador) e as condições do processo são fatores decisivos na eficiência das reações (Carrapiso & Garcia, 2000). O método de preparação da amostra para análise em GC mais utilizado é a extração do lipídio seguido da conversão em ésteres metílicos de ácidos graxos, sendo adotado como método oficial (AOAC, 1997) que, embora tenha mais etapas de preparação do que a esterificação direta, apresentou resultado preciso e exato (Mazalli & Bragagnolo, 2007).

São encontrados na literatura diferentes métodos para formação de FAME utilizando catálise básica ou ácida. Em condições ácidas, os FAME são obtidos pelo aquecimento dos triacilglicerídios com excesso de metanol na presença do catalizador, que pode ser o trifluoreto de boro (BF_3), ácido clorídrico em metanol (HCl) ou ácido sulfúrico (H_2SO_4) em metanol. Dentre os catalizadores ácidos, o HCl em metanol tem sido pouco utilizado para esterificação devido seu rendimento médio e baixa capacidade de metilação, portanto, requerendo longos tempos de reação. Por outro lado, em método utilizando H_2SO_4 em metanol e aquecimento, a reação é completada rapidamente, porém este método não pode ser recomendado para a metilação de PUFA devido ao poder oxidante do ácido

sulfúrico (Rogozinski, 1964; Ruiz-Rodrigues, 2010). Um dos métodos mais utilizados com o catalizador HCl é o proposto por Jham et al. (1982), e com H_2SO_4 por Hartman & Lago (1973).

O ácido de Lewis, BF_3 , na forma de complexo coordenado com metanol, é um poderoso catalizador ácido para a esterificação de ácidos graxos (Metcalf & Schmitz, 1961) sendo utilizado em métodos clássicos como os propostos por Metcalf et al. (1966), Bannon et al. (1982) e Joseph e Ackman (1992). O BF_3 é extremamente reativo, e na presença de metanol pode ser excelente para promover metilação de lipídios de modo similar aos outros ácidos em metanol com adição das vantagens conferidas pela eletropolaridade extrema do BF_3 (Morrison & Smith, 1964). Necessita de pouco tempo para reação, entretanto, alguns estudos reportam danos irreversíveis na coluna cromatográfica (Brondz, 2002). É um reagente tóxico, de alto valor comercial e sensível à umidade, podendo produzir artefatos a partir de ácidos graxos insaturados quando utilizado em altas concentrações (50 %) (Lough, 1964; Ruiz Rodriguez, 2010).

O hidróxido de potássio (KOH), o hidróxido de sódio (NaOH) e o metóxido de sódio (CH_3ONa) são os catalizadores mais comuns utilizados na catálise básica. A catálise básica é mais rápida que a catálise ácida, entretanto, requer condições anidras, que podem ser difíceis de serem alcançados em amostras biológicas. A catálise básica pode ser realizada a temperaturas de 60 ou 70 °C com alta conversão em FAMES (98 %) (Terigar et al., 2010).

Os métodos que empregam KOH ou NaOH são muito utilizados devido à facilidade no preparo e ao custo relativamente menor quando comparado com o CH_3ONa (ISO 5509, 1978; Vicente et al., 2004; Xie et al., 2006;). A combinação de

catalizadores, como KOH e BF_3 , ou NaOH e BF_3 , ambos em metanol, também pode ser utilizada, envolvendo duas etapas. A catálise básica irá transformar ácidos graxos em sais carboxílicos e, após, a catálise ácida, provocada pelo BF_3 , permite a esterificação para a análise cromatográfica (Joseph e Ackman, 1992; Ruiz-Rodriguez et al., 2010).

3.1. Esterificação assistida por micro-ondas

Como alternativa de energia estimulante, a irradiação de micro-ondas, em função do rápido aquecimento produzido pela irradiação, pode ser utilizada para aceleração de diferentes reações químicas (Marquez et al., 2006; Vass et al., 2006; Yamashita et al., 2010; Yadav et al., 2007; Foucourt et al., 2010). Processos de transesterificação assistida por micro-ondas têm sido realizados em muitos compostos orgânicos para estudo e síntese de biodiesel, sendo que a reação pode ser conduzida à pressão atmosférica e próxima ao ponto de ebulição do metanol (Azcan & Danisman, 2007; Perin et al., 2008; Patil et al., 2011). Ainda, a derivação de ácidos graxos de óleos comestíveis para a análise em GC também já foi reportada utilizando CH_3ONa em metanol com a utilização da irradiação de micro-ondas para acelerar o processo (Jeyashoke et al., 1998).

A interação das micro-ondas com os componentes da reação (triacilglicerídios e metanol) resultam em grande redução da energia de ativação devido ao aumento do fenômeno de polarização, com os fenômenos de rotação dipolar e condução iônica (Perreux & Loupy, 2001). O teor esterificado é dependente do meio e do mecanismo de reação. Metanol é um material que

absorve fortemente a energia de micro-ondas e, em geral, causa um superaquecimento, onde a reação se completa de forma mais rápida (Mingos, 2005). O metanol atua como solvente extrator e também como reagente para a transesterificação (Mulbry et al., 2009). Seus dipolos reorientam-se rapidamente sob o efeito da irradiação de micro-ondas, que destroem a estrutura celular para extração do óleo na matriz. A solubilidade do metanol é aumentada sob o efeito das micro-ondas, permitindo a reação de transesterificação (Mandal et al., 2007).

As reações de transesterificação podem ser realizadas a diferentes temperaturas, de acordo com os diferentes parâmetros e também com o material a ser esterificado. Em geral, a velocidade da transesterificação pode ser acelerada com o aumento da temperatura. Em um estudo realizado com diferentes temperaturas, variando de 30 a 90 °C com catálise ácida em metanol, os resultados mostraram que o rendimento e a velocidade da conversão do óleo em FAME sofreu efeito significativo com o aumento da temperatura, provavelmente em função da difusividade do metanol no óleo, aumentando o rendimento do processo (Zhang et al., 2010). Normalmente, em reações de transesterificação para produção de biodiesel, o tempo máximo de reação é de 2 horas, permanecendo relativamente constante durante o aumento do tempo da reação. Entretanto, o excesso do tempo de reação pode levar a uma redução do rendimento devido à reversão da reação de transesterificação, resultando em perda de ésteres bem como a formação de sais de ácido graxo pela reação de saponificação (Duz et al., 2010).

Durante o processo, o teor do catalizador representa um parâmetro crítico para obtenção de alto rendimento de conversão. Experimentos utilizando

diferentes concentrações de catalizadores mostram que o rendimento aumenta até determinada concentração, e começa a diminuir com catalizadores mais concentrados. A possível explicação seria que teores elevados de catalizadores iniciam reações de saponificação, que, por serem irreversíveis, não permitem a esterificação completa dos ácidos graxos na amostra (Hsiao et al., 2010).

4. Referências

Abu-Samra, A., Morris, J.S., & Koirtiyohann, S.R. (1975). Wet ashing of some biological samples in a microwave oven. *Analytical Chemistry*, 47, 1475–1477.

Alfaro, M.J., Bélanger, J.M.R., Padilla, F.C., & Paré, J.R.J. (2007). Influence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes (MAP™) extraction of ginger (*Zingiber officinale*). *Phytochemical Analysis*, 18, 275–282.

Almeida, J.C., Perassolo, M.S., Camargo, J.L., Bragagnolo, N., & Gross, J.L. (2006). Fatty acid composition and cholesterol content of beef and chicken meat in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42, 109-117.

Antonopoulou, S., Semidalas, C.E., Koussissis, S., & Demopoulos, C.A. (1996). Platelet-activating factor (PAF) antagonists in foods: a study of lipids with paf or anti-paf-like activity in cow's milk and yogurt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3047–3051.

AOAC (1997). Association of Official Analytical Chemists. Official methods of the analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16. ed. Washington: AOAC.

Azcan, N., & Danisman, A. (2007). Alkali catalyzed transesterification of cottonseed oil by microwave irradiation. *Fuel*, 86, 2639–2644.

Baggio, S.R., & Bragagnolo, N. (2006). Cholesterol oxide, cholesterol, total lipid and fatty acid contents in processed meat products during storage. *LWT*, 39, 513–520.

Bannon, C.D., Craske, J.D., Hai, N.T., Harper, N.L., & O'rourke, K.L. (1982). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. *Journal of Chromatography*, 217, 63-69.

Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M., & Mesnard, F. (2007). Microwave-assisted Extraction of the Main Phenolic Compounds in Flaxseed. *Phytochemical Analysis*, 18, 275-282.

Bélanger, J. M. R., & Paré, J. R. J. (2006). Applications of microwave-assisted processes (MAP™) to environmental analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 86, 1049-1058.

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 37, 911–917.

Boer, J. (1988). Chlorobiphenyls in bound and non-bound lipids of fishes; comparison of different extraction methods. *Chemosphere*, 17, 1803–1810.

Bonato, P.S. (2006). Cromatografia gasosa. Em: Collins, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S. (Eds.), Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da Unicamp, pp. 203-270.

Bragagnolo, N., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2002). Simultaneous determination of total lipid, cholesterol and fatty acids in meat and backfat of suckling and adult pigs. *Food Chemistry*, 79, 255-260.

Bragagnolo, N., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2003). New data on the total lipid, cholesterol and fatty acid composition of raw and grilled beef *longissimus dorsi*. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 53, 312-319.

Brondz, I. (2002). Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 456, 1–37.

Brum, A.A.S., Arruda, L.F., & Regitano-D'Arce, M.A.B. (2009). Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, 32, 849-854

Camel, V. (2000). Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples. *Trends Analytical Chemistry*, 19, 229-248.

Canovas, A., Estany, J., Tor, M., Pena, R. N., & Doran, O. (2009). Acetyl-CoA carboxylase and stearoyl-CoA desaturase protein expression in subcutaneous adipose tissue is reduced in pigs selected for decreased backfat thickness at constant intramuscular fat content. *Journal of Animal Science*, 87, 3905-3914.

Carrapiso, A.I., & García, C. (2000). Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification. *Lipids*, 35, 1167-1177.

Castro, W. F., Mariutti, L. R. B., & Bragagnolo, N. (2011). The effects of colorifico on lipid oxidation, colour and vitamin E in raw and grilled chicken patties during frozen storage. *Food Chemistry*, 124, 126-131.

Chilliard, Y., Bauchart, D., Lessire, M., Schmidely, P., & Mourot, J. (2008). Qualité des produits: modulation par l'alimentation des animaux de la composition en acides gras du lait et de la viande. *INRA Productions Animales*, 21, 95-106.

Christie, W.W. (1982). *Lipid Analysis*. Pergamon Press, New York.

Cruz, A.G., Sant'Ana, A.S., Macchione, M.M., Teixeira, A.M., & Schmidt, F.L. (2009). Milk drink using whey butter cheese (*queijo manteiga*) and acerola juice as a potential source of vitamin C. *Food and Bioprocess Technology*, 2, 368-373.

Duz, M.S., Saydut, A., & Ozturk, G. (2011). Alkali catalyzed transesterification of safflower seed oil assisted by microwave irradiation. *Fuel Processing Technology*, 92(3), 308-313.

Enser, M., Hallett, K.G., Hewett, B., Fursey, G.A.J., Wood, J.D., & Harrington, G. (1998). Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Science*, 49, 329-341.

FAO (2010). Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Roma, Itália.

FAO/OMS (2003). Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. In: Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. WHO Technical Report Series n°. 916. World Health Organization, Geneva.

Folch, J., Lees, M., & Stanley, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

Foucourt, A., Dubouilh-Benard, C., Chosson, E., Corbière, C., Buquet, C., Iannelli, M., Leblond, B., Marsais, B., & Besson, T. (2010). Microwave-accelerated Dimroth rearrangement for the synthesis of 4-anilino-6-nitroquinazolines. Application to an efficient synthesis of a microtubule destabilizing agent. *Tetrahedron*, 66, 4495-4502.

Freedman, B., Butterfield, R.O., & Pryde, E.H. (1986). Transesterification kinetics of soy- bean oil. *Journal of American Oil Chemists Society*, 63, 1375-1380.

Gao, M., Song, B., & Liu, C. (2006). Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from *Saussurea medusa* Maxim cultured cells. *Biochemical Engeneering Journal*, 32, 79-83.

García-Ayuso, L. E., Velasco, J., Dobarganes, M. C., & Luque de Castro, M. D. (1999). Accelerated extraction of the fat content in cheese using a focused microwave-assisted Soxhlet device. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 47, 2308-2315.

García-Ayuso, L. E., Velasco, J., Dobarganes, M. C., & Luque de Castro, M. D. (2002). Fast quality monitoring of oil from prefried and fried foods by focused microwave-assisted Soxhlet extraction. *Food Chemistry*, 76, 241-248.

Guo, Z., Jin, Q., Fan, G., Duan, Y., Qin, C., & Wen, M. (2001). Microwave-assisted extraction of effective constituents from a Chinese herbal medicine *Radix puerariae*. *Analytica Chimica Acta*, 436, 41–47.

Gurr, M.I., & James, A.T. (1971). *Lipid Biochemistry and Introduction*. Cornell University Press, Ithaca.

Gutnikov, G.J. (1995). Fatty acid profiles of lipid samples. *Journal of Chromatography B*, 671, 71-89.

Hao, J., Han, W., Huang, S., Xue, B., & Deng, X. (2002). Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. *Separation and Purification Technology*, 28, 191–196.

Haque, K. E. (1999). Microwave energy for mineral treatment processes — A brief review. *International Journal of Mineral Processing*, 57, 1-24.

Hartman, L., & Lago, R.C.A. (1973). Rapid preparation of fatty acids methyl esters. *Laboratory Practice*, 22, 475-476.

Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., & Xia, W. (2009). Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity *in vitro*. *Separation and Purification Technology*, 70, 63-70.

Hemwimon, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2007). Microwave-assisted extraction of antioxidative anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Separation and Purification Technology*, 54, 44-50.

Hsiao, M., Lin, C., Chang, Y., & Chen, Y. (2010). Ultrasonic mixing and closed microwave irradiation-assisted transesterification of soybean oil. *Fuel*, 89, 3618–3622.

ISO 5509 (1978). International Organization For Standardization. Animal and vegetable fats and oils: preparation of methyl esters of fatty acids. London: International Organization for Standardization.

Jeyashoke, N., Krisnangkura, K., & Chen, S. (1998). Microwave induced rapid transmethylation of fatty acids for analysis of food oil. *Journal of Chromatography A*, 818, 133–137.

Jham, G. N., Teles, F. F. F., & Campos, L. G. (1982). Use of aqueous HCl/MeOH as esterification reagent for analysis of fatty acids derived from soybean lipids. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 59, 132-133.

Jones, D.A., Lelyveld, T.P., Mavrofidis, S.D., Kingman, S.W., & Miles, N.J. (2002). Microwave heating applications in environmental engineering—a review. *Resources, Conservation and Recycling*, 34, 75–90.

Jump, D. B., Botolin, D., Wang, Y., Xu, J., Christian, B., & Demeure, O. (2005). Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. *Journal of Nutrition*, 135, 2503-2506.

Kamal-Eldin, A., Pokorný, J. (2008). Lipid Oxidation Products and Methods Used for Their Analysis. Em: Kamal-Eldin, A., Pokorný, J. (Eds.), *Analysis of lipid oxidation*. AOCS Publishing.

Kanner, J., & Rosenthal, I. (1992). An assessment of lipid oxidation in foods. *Pure & Applied Chemistry*, 64, 1959-1964.

Khajeh, M. (2009). Optimization of microwave-assisted extraction procedure for zinc and copper determination in food samples by Box-Behnken design. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 343-346.

Kolakowska, A., & Sikorski, Z. E. (2003). The role of lipids in food quality. Em: Sikorski, Z.E., Kolakowska, A. (Eds.), *Chemical and Functional Properties of Food Lipids*. Boca Ratón: CRC Press.

Kwon, J., Belanger, J. M. R., Pare, J. R. J., & Yaylayan, V. A. (2003). Application of the microwave-assisted process (MAPTM) to the fast extraction of ginseng saponins. *Food Research International*, 36, 491–498.

Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244–282.

Lam, H.S., & Proctor, A. (2001). Rapid methods for milled rice surface total lipid and free fatty acid determination. *Cereal Chemistry*, 78, 498-499.

Letellier, M., Budzinski, H., Charrier, L., Capes, S., & Dorthe, A.M. (1999). Optimization by factorial design of focused microwave assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment. *Journal of Analytical Chemistry*, 364, 228-37.

Li, H., Chen, B., Zhang, Z., & Yao, S. (2004). Focused microwave assisted solvent extraction and HPLC determination of effective constituents in *Eucommia ulmoides* Oliv. *Talanta*, 63, 659-665.

Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B., & Westman, J. (2001). Microwave assisted organic synthesis – a review. *Tetrahedron*, 57, 9225-9283.

Lima, E.M., & Abdalla, D.S.P. (2001). Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 37, 293-303.

Lough, A.K. (1964). The production of methoxy-substituted fatty acids as artefacts during the esterification of unsaturated fatty acids with methanol containing boron trifluoride. *Biochemical Journal*, 90, 4c-5c.

Lu, A., Zhang, S., Shan, S., Wang, S., & Wang, S. (2003). Application of microwave extraction for the evaluation of bioavailability of rare earth elements in soils. *Chemosphere*, 53, 1067–1075.

Luque De Castro, M. D., & García-Ayuso, L. E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytical Chimica Acta*, 369, 1-10.

Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). Microwave assisted extraction – an innovative and promising extraction tool for medicinal plant research. *Pharmacognosy Reviews*, 1, 7-18.

Marquez, H., Loupy, A., Calderon, O., & Pérez, E.R. (2006). An eco-friendly protocol for synthesis of thiourea derivatives: 1-benzoyl-3-benzylguanidine and 1-benzoyl-3-benzyl-O-ethylisourea. A possible non-purely thermal microwave assisted reaction. *Tetrahedron*, 62, 2616-2621.

Martin, C. A., Milinsk, M. C., Visentainer, J. V., Matsushita, M., & De-Souza, N.E. (2007). Trans fatty acid-forming processes in foods: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79, 343-350.

Mazalli, M.R., & Bragagnolo, N. (2007). Validation of two methods for fatty acids analysis in eggs. *Lipids*, 42, 483–490.

McClements, D.J., & Decker, E.A. (2010). Lipídeos. Em: Damodaran, S., Parkin, K.L., Fennema, O.R. (Eds.), *Química de Alimentos de Fennema*. Porto Alegre: Editora Artmed, pp. 132-178.

Meier, S., Mjøs, S.A., Joensen, H., & Grahl-Nielsen, O. (2006). Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues. *Journal of Chromatography A*, 1104, 291–298.

Metcalfe, L.D., & Schmitz, A. A. (1961). The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, 33, 363-364.

Metcalfe, L. D.; & Schmitz, A. A. & Pelka, J.R. (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, 38, 514-515.

Mingos, D.M.P. (2005). Theoretical aspects of microwave dielectric heating. In Tierney, J.P., & Lidström, P. (Eds.), *Microwave assisted organic synthesis* (pp 1-22). Boca Ratón: CRC Press.

Morrison, W.R., & Smith, L.M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol. *The Journal of Lipid Research*, 5, 600-608.

Motasemi, F., & Ani, F.N. (2012). A review on microwave-assisted production of biodiesel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 16(7), 4719-4733.

Mourot, J., & Hermier, D. (2001). Lipids in monogastric animal meat. *Reproduction Nutrition Development*, 41, 109-118.

Mulbry, W., Kondrad, S., Buyer, J., & Luthria, D.L. (2009). Optimization of an oil extraction process for algae from the treatment of manure effluent. *Journal of American Oil Chemists Society*, 86, 909–915.

Nakajima, H., Kaizu, Y.S.H., & Hirota, T. (1992). Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. *Journal of Food Science*, 57, 1327–1329.

Nóbrega, J.A., Trevizan, L.C., Araujo, G.C.L., & Nogueira, A.R.A. (2002). Focused-microwave-assisted strategies for sample preparation. *Spectrochimica Acta Part B*, 57, 1855–1876.

Onuska, F.I., & Terry, K. A. (1993). Extraction of pesticides from sediments using a microwave technique. *Chromatographia*, 36, 191-194.

Pan, X., Liu, H., Jia, G., & Shu, Y.Y. (2000). Microwave-assisted extraction of glycyrrhizic acid from licorice root. *Biochemical Engineering Journal*, 5, 173-177.

Pan, X., Niu, G., & Liu, H. (2001). Microwave-assisted extraction of tanshinones from *Salvia miltiorrhiza bunge* with analysis by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 922, 371–375.

Parodi, P. W. (2009). Has the association between saturated fatty acids, serum cholesterol and coronary heart disease been over emphasized? *Internatioanal Dairy Journal*, 19, 345-361.

Patil, P.D., Gude, V.G., Mannarswamy, A., Cooke, P., Munson-McGee, S., Nirmalakhandan, N., Lammers, P., & Deng, S. (2011). Optimization of microwave-assisted transesterification of dry algal biomass using response surface methodology. *Bioresource Technology*, 102, 1399-1405.

Pena, T., Pensado, L., Casais, C., Mejuto, C., Phan-Tan-Luu, R., & Cela, R. (2006). Optimization of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples. *Journal of Chromatography A*, 1121, 163-169.

Perin, G., Ivaro, G.A., Westphal, E., Viana, L.H., Jacob, R.G., Lenardão, E.J., & D'Oca, M.G.M. (2008). Transesterification of castor oil assisted by microwave irradiation. *Fuel*, 87, 2838–2841.

Perreux, L., & Loupy, A. (2001). A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. *Tetrahedron*, 57, 9199-9223.

Priego-Capote, F., & Luque de Castro, M. D. (2005). Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: a convincing alternative for total fat isolation from bakery products. *Talanta*, 65, 98-103.

Ramalho, V.C., & Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29, 755-760.

Rogozinski, M. (1964). A rapid quantitative esterification technique for carboxylic acids. *Journal of Gas Chromatography*, 2, 136-137.

Rosenthal, I. (1985). Photooxidation of foods, vol IV. Em: Frimer, A. (Ed.), Boca Raton: CRC Press Inc. pp. 145-163, 1985.

Rossato, L.V., Bressan, M.C., Rodrigues, E.C., Carolino, M.I.A.C.M., Bessa, R.J.B., & Alves, S.P.P. (2009). Composição lipídica de carne bovina de grupos genéticos taurinos e zebuínos terminados em confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 1841-1846.

Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2007). Microwave assisted extraction of soy isoflavones. *Analytica Chimica Acta*, 588, 274-282.

Ruiz-Rodriguez, A., Reglero, G., & Ibañez, E. (2010). Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 305–326.

Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Karim, A.A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A.N., & Omar, A.K.M. (2009). Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *Journal of Food Engineering*, 95, 240–253.

Sancho, R.A.S., Bragagnolo, N., Costa, G.G., Mariutti, L.R.B., & De Lima, F.A. (2011). Effect of annatto seed and coriander leaves as natural antioxidants in fish meatballs during frozen storage. *Journal of Food Science*, 76, 838-845.

Schmitz, G., & Ecker, J. (2008). The opposing effects of n-3 and n-6 fatty acids. *Progress in Lipid Research*, 47, 147–155.

Shahidi, F., & Wanasundara, P.K.J.P.D. (2002). Extraction and Analysis of Lipids. Em: Akoh, C.C., & Min, D.B. (Eds.), *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*, 2nd ed., New York: Marcel Dekker, Inc., 150-186.

Shantha, N.C., & Napolitano, G.E. (1992). Gas chromatography of fatty acids. *Journal of Chromatography A*, 624, 37–51.

Smedes, F. (1999). Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *Analyst*, 124, 1711–1718.

Smedes, F., & Askland, T.K. (1999). Revisiting the development of the Bligh and Dyer total lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin*, 38, 193–201.

Spigno, G., & Faveri, D. M. (2009). Microwave-assisted extraction of tea phenols: A phenomenological study. *Journal of Food Engineering*, 93, 210-217.

Sun, Y., Liao, X., Wang, Z., Hu, X., & Chen, F. (2007). Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins in red raspberries and identification of anthocyanin of extracts using high-performance liquid chromatography – mass spectrometry. *European Food Research Technology*, 225, 511–523.

Talebi, M., Ghassempour, A., Talebpour, Z., Rassouli, A., & Dolatyari, L. Optimization of the extraction of paclitaxel from *Taxus baccata* L. by the use of microwave energy. (2004). *Journal of Separation Science*, 27, 1130–1136.

Talebpour, Z., Ghassempour, A., Abbaci, M., & Aboul-Enein, H. Y. (2009). Optimization of microwave-assisted extraction for the determination of glycyrrhizin in menthazin herbal drug by experimental design methodology. *Chromatographia*, 70, 191-197.

Terigar, B.G., Balasubramanian, S., Lima, M., & Boldor, D. (2010). Transesterification of soybean and rice bran oil with ethanol in a continuous-flow microwave-assisted system: yields, quality, and reaction kinetics. *Energy fuels*, 24, 6609–6615.

Vass, A., Földesi, A., & Lóránd, T. (2006). Reactions of 3-isochromanone with aromatic aldehydes - microwave assisted condensations performed on solid basic inorganic supports. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 69, 179-187.

Vazquez, M.J., Carro, A.M., Lorenzo, R.A., & Cela, R. (1997). Optimization of methylmercury microwave-assisted extraction from aquatic sediments. *Analytical Chemistry*, 69, 221-225.

Vicente, G., Martínez, M., & Aracil, J. (2007). Optimisation of integrated biodiesel production. Part II: A study of the material balance. *Bioresource Technology*, 98, 1754–1761.

Wada, S., & Fang, K. (1992). The synergistic antioxidant effect of rosemary extract and α -tocopherol in sardine oil model system and frozen-crushed fish meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 16, 263–274.

Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., & Hu, X. (2007). Optimization of pectin extraction assisted by microwave from apple pomace using response surface methodology. *Journal of Food Engineering*, 78, 693-700.

Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes, S.I., & Whittington, F.M. (2008). Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78, 343–358.

Wood, J.D., Enser, M., Richardson, R.I., & Whittington, F.M. (2007). Em: Chow, C.K (ed.), Fatty acids in foods and their health implications, 3rd ed. CRC Press, pp. 87-107.

Woods, V.B., & Fearon, A.M. (2009). Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review. *Livestock Science*, 126, 1–20.

Wright, H. J., Segur, J. B., Clark, H. V., Coburn, S. K., Langdon, E. E., & DuPuis, R. N. (1944). A report on ester interchange. *Oil & Soap*, 21, 145-148.

Xie, W., Peng, H., & Chen, L. (2006). Transesterification of soybean oil catalyzed by potassium loaded on alumina as a solid-base catalyst. *Applied Catalysis A: General*, 300, 67–74.

Xiong, G., He, X., & Zhang, X. (2000). Microwave-assisted extraction or saponification combined with microwave-assisted decomposition applied in pretreatment of soil or mussel samples for the determination of polychlorinated biphenyls. *Analytica Chimica Acta*, 413, 49–56.

Yadav, J.S., Reddy, B.V.S., Venugopal, C., & Padmavani, B. (2004). InCl₃/SiO₂-catalyzed α -amination of 1,3-dicarbonyl compounds under microwave irradiation. *Tetrahedron Letters*, 45, 7507-7509.

Yamashita, H., Mitsukura, Y., & Kobashi, H. (2010). Microwave-assisted acylation of aromatic compounds using carboxylic acids and zeolite catalysts. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 327, 80-86.

Yan, M., Liu, W., Fu, Y., Zu, Y., Chen, C., & Luo, M. (2010). Optimisation of the microwave-assisted extraction process for four main astragalosides in *Radix Astragali*. *Food Chemistry*, 119, 1663–1670.

Yang, Z., & Zhai, W. (2010). Optimization of microwave-assisted extraction of anthocyanins from purple corn (*Zea mays* L.) cob and identification with HPLC–MS. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 11, 470-476.

Zaidul, I.S.M., Norulaini, N.A.M., Omar, A.K., M, & Smith Jr., R.L. (2007). Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction of palm kernel oil from palm kernel. *Journal of Food Engineering*, 79, 1007–1014.

Zhang, S., Zu, Y., Fu, Y., Luo, M., Zhang, D., & Efferth, T. (2010). Rapid microwave-assisted transesterification of yellow horn oil to biodiesel using a heteropolyacid solid catalyst. *Bioresource Technology*, 101, 931–936.

Zheng, X., Wang, X., Lan, Y., Shi, J., Xue, S. J., & Liu, C. (2009). Application of response surface methodology to optimize microwave-assisted extraction of silymarin from milk thistle seeds. *Separation and Purification Technology*, 70, 34-40.

Zuloaga, O., Etxebarria, N., Fernandez , L.A., & Madariaga, J.M. (1999). Optimization and comparison of microwave assisted extraction and Soxhlet extraction for the determination of polychlorinated biphenyls in soil samples using an experimental design approach. *Talanta*, 50, 345-57.

CAPÍTULO II

RÁPIDA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DE CARNES ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

Aline Lisbôa Medina, Marcelo Ancelmo Oseas da Silva, Herbert de Sousa
Barbosa, Marco Aurélio Zezzi Arruda, Antonio Marsaioli Jr., Neura Bragagnolo

Artigo em preparação a ser submetido para publicação no periódico *Talanta*.

RÁPIDA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS DE CARNES ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

Aline Lisbôa Medina^a, Marcelo Ancelmo Oseas da Silva^b, Herbert de Sousa Barbosa^b, Marco Aurélio Zezzi Arruda^b, Antonio Marsaioli Jr.^c, Neura Bragagnolo^a

^aDepartamento de Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

^bInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica – INCTBio, Departamento de Química Analítica – Instituto de Química – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

^cInstituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, São Paulo.

Resumo

Um novo método de extração de lipídios assistida por micro-ondas (MAE) em carne foi desenvolvido e validado, utilizado carne de filé de frango, planejamento estatístico experimental e material de referência certificado. A fim de verificar o efeito das micro-ondas na extração de lipídios, foram realizadas avaliações na composição de ácidos graxos e de compostos formados durante a oxidação lipídica: dienos conjugados, peróxidos e os compostos voláteis, hexanal, pentanal e propanal. A validação através da comparação com o método de Folch e pela utilização de material de referência certificado de carnes homogeneizadas (SRM 1546, NIST) mostrou que o método é preciso e exato. Não houve alteração da composição de ácidos graxos e formação de produtos oriundos da oxidação

lipídica. O método otimizado foi aplicado em carnes com diferentes teores de lipídios (coxa de frango, sobrecoxa de frango, pernil suíno, lombo suíno, lagarto bovino e cupim bovino). Os resultados demonstraram que a MAE pode ser utilizada para extração e estudo de lipídios em amostras de carne, sem o risco de alteração química dos compostos durante o processo, possibilitando automação, precisão, exatidão, maior rapidez, com redução no tempo de extração, menor custo, redução da quantidade de amostra utilizada e no consumo de solventes e, portanto, menor geração de resíduos em laboratório.

Palavras-chave: ácidos graxos, validação, dienos, peróxidos, compostos voláteis, material de referência certificado.

1. Introdução

Os processos tradicionais de extração de lipídios consomem tempo, são laboriosos e utilizam grande quantidade de solventes. As tecnologias de extrações devem ser versáteis, relativamente simples e seguras, além de baixo custo [1]. Em vista disso é desejável o desenvolvimento de novos processos de extração que melhoram as limitações impostas pelos métodos convencionais.

A extração assistida por micro-ondas (microwave assisted extraction, MAE) é uma tecnologia com potencial para extração de compostos de diversos materiais, através da ação da energia de micro-ondas associada a solventes. Como vantagens, essa tecnologia, passível de automação, diminui o tempo de extração e reduz o consumo de solventes orgânicos, com consequente redução

de resíduos em laboratórios e redução dos custos no preparo da amostra, além de melhorar a eficiência na extração [2,3,4].

O mecanismo da MAE é baseado no impacto das micro-ondas nas moléculas por condução iônica e rotação dipolar. A condução iônica é a migração eletroforética dos íons causada pelo campo elétrico aplicado. A solução é aquecida devido à resistência da solução à fricção ao fluxo de íons. A rotação dipolar leva ao realinhamento de moléculas polares quando um campo eletromagnético é aplicado. Na frequência de 2,45 GHz, os dipolos alinham-se aleatoriamente $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo, resultando em rápido aquecimento. Além das micro-ondas aquecerem o solvente ou a mistura de solventes, também interagem diretamente com as moléculas de água livre presente nos materiais, ocasionando um rápido acúmulo de pressão no interior das células, levando à ruptura das células e a liberação dos compostos no solvente [5].

Diferentes compostos já foram obtidos através da MAE, como saponinas [3,6], compostos fenólicos [7,8,9], lignina [10], pectina [11], hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [12] e ácidos orgânicos [13].

O objetivo desse estudo foi desenvolver e validar um método de MAE de lipídios de carne, e investigar se a MAE gera compostos de oxidação lipídica em função da energia aplicada durante a extração. Para o estudo dos efeitos dos parâmetros da extração e otimização do processo foi aplicado um delineamento composto central rotacional (DCCR) utilizando carne de frango. Além da composição de ácidos graxos, foram investigados os compostos de oxidação lipídica, dentre eles, os dienos conjugados, os peróxidos e os aldeídos voláteis. A validação do método foi realizada através da precisão e da exatidão, através da

comparação dos resultados obtidos em carne de frango por MAE com o método de acordo com Folch et al. [14] e utilizando material de referência certificado de carne homogeneizada. O método validado foi então aplicado em coxa de frango, sobrecoxa de frango, pernil suíno, lombo suíno, lagarto bovino e cupim bovino, carnes que apresentam diferentes teores de lipídios.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostras

Foram utilizados 600 g das seguintes carnes, filé de frango, coxa de frango, sobrecoxa de frango, pernil suíno, lombo suíno, lagarto bovino e cupim bovino, adquiridas no comércio de Campinas, SP. Após a retirada da gordura superficial, as amostras foram homogeneizadas individualmente em multiprocessador (Philco, Brasil) por 1 minuto até a obtenção de uma pasta homogênea. Alíquotas foram tomadas para análise. A amostra de filé de frango foi utilizada para desenvolvimento e validação do método. As demais amostras de carne foram utilizadas para aplicação do método otimizado e validado. O material de referência certificado de carnes homogeneizadas SRM 1546 foi obtido da NIST (Gaithersburg, MD, USA).

2.2. Reagentes

O complexo trifluoreto de boro em metanol 13-15 % (BF_3), a mistura de padrões contendo ésteres metílicos dos ácidos graxos de 4:0 a 24:0, o éster metílico do ácido undecanóico (99 % CG), o éster metílico do ácido tricosanóico

(99 % CG), 2-heptanona (99 % CG), hexanal (98 % CG), pentanal (97 % CG) e propanal (97 % CG) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O hexano grau cromatográfico HPLC para injeção das amostras em cromatógrafo gasoso foi adquirido da JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Os reagentes grau P.A. clorofórmio, metanol, hexano, acetato de etila, isopropanol, iso-octano, hidróxido de sódio (NaOH) e cloreto de sódio (NaCl), cloreto de bário, sulfato ferroso, ácido clorídrico, tiocianato de amônio foram obtidos da marca Synth (Diadema, SP, Brasil).

2.3. Determinação de umidade

O teor de umidade foi determinado através do método da AOAC [15].

2.4. Solvente extrator

Foram realizados testes com a amostra de filé de frango para a substituição do solvente extrator do método convencional, clorofórmio:metanol (2:1, v/v). Os solventes, bem como as misturas de solventes, foram hexano, acetato de etila, isopropanol, isooctano, acetato de etila:isopropanol (7:3, v/v), hexano:isopropanol (3:1, v/v), acetato de etila:metanol (2:1, v/v), acetato de etila:metanol (4:1, v/v), acetato de etila:metanol (9:1, v/v) e hexano:metanol (3:1, v/v). Nessa etapa foram realizadas avaliações preliminares da extração lipídica assistida por micro-ondas primeiramente com o solvente clorofórmio:metanol (2:1, v/v) na tentativa de obter o mesmo teor extraído pelo método de Folch [14]. Com as condições da MAE a seguir, foram obtidos, com esse solvente, o teor de lipídios desejado: 400 mg de amostra, 5 mL de solvente, 10 minutos e 50 °C a 400 W. Essas condições foram

utilizadas como parâmetro para a avaliação dos outros solventes e misturas descritos acima, na tentativa de substituição do clorofórmio:metanol (2:1, v/v).

2.5. Parâmetros de permissividade dielétrica dos solventes

As propriedades dielétricas (constante dielétrica e perda dielétrica) dos solventes e misturas descritos acima (item 2.4) também foram determinadas. Os parâmetros de permissividade dielétrica foram obtidos em sistema de medidas HP 85070B (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) conectado ao analisador de redes HP 8752C (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) com leituras em uma varredura de frequência de 201 pontos de 300 MHz a 6 GHz. A calibração foi realizada utilizando o método de 3 pontos (curto-circuito, ar e água a 25 °C).

2.6. Delineamento estatístico experimental

A otimização da extração dos lipídios utilizando a MAE foi realizada através de um delineamento experimental considerando as seguintes variáveis: massa de amostra, tempo de irradiação e temperatura (Tabela 1). As faixas das variáveis independentes foram selecionadas baseadas em experimentos realizados anteriormente. Foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), 2^3 com 3 pontos centrais e 6 pontos axiais, totalizando 17 ensaios realizados de forma aleatória de acordo com a ordem das análises arranjadas pelo software Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, EUA).

Tabela 1 – Variáveis e valores utilizados no DCCR

Variáveis	Nível				
	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Massa da amostra (mg)	230	300	400	500	670
Tempo de irradiação (min)	2	5	10	15	18
Temperatura (°C)	30	36	45	54	60

2.7. Determinação do teor de lipídios segundo Folch et al. [14]

A determinação do teor dos lipídios foi realizada segundo o método proposto por Folch et al. [14] que utiliza como solvente extrator a mistura de clorofórmio:metanol (2:1, v/v).

2.8. Determinação do teor de lipídios por extração assistida por micro-ondas

A extração assistida por micro-ondas foi realizada com o sistema extrator de micro-ondas Start-E (Milestone, Sorisole, Itália). Os parâmetros da extração (peso de amostra, tempo de irradiação e temperatura) foram utilizados de acordo com o planejamento experimental, sendo a potência programada para alcançar o valor máximo de 400 W. A amostra foi pesada em tubo extrator de teflon e em seguida foi adicionado 5 mL do solvente extrator. Após o período de irradiação, os frascos foram resfriados automaticamente por 10 minutos, sendo o conteúdo do tubo filtrado com papel filtro qualitativo. Ao extrato foram adicionados 3,5 mL de água, ocorrendo separação de fases pela centrifugação a 3000 *g* (Alegre 64R Centrifuge, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) por 5 minutos a 10 °C. A porção lipídica foi separada e o solvente removido com fluxo de nitrogênio. O teor dos lipídios extraídos foi determinado gravimetricamente.

2.9. Determinação dos ácidos graxos

Uma alíquota de lipídios (25 mg) extraídos por MAE foram metilados de acordo com o método de Joseph e Ackman [16]. Os metil ésteres de ácidos graxos foram separados em cromatógrafo gasoso (GC-2010, Shimadzu) equipado com detector de ionização em chama, injetor split (1/50) e coluna CP-SIL 88 (Chromopack, 100 m x 0,25 mm x 0,20 μ m). As condições cromatográficas foram: temperatura do detector a 260 °C, temperatura do injetor a 250 °C, temperatura inicial da coluna a 120 °C durante 8 minutos, aumentando 20 °C por minuto até 160 °C, aumentando 3 °C por minuto até 195 °C, mantendo-se nesta temperatura por 10 minutos, aumentando 3 °C por minuto até 210 °C, aumentando 35 °C por minuto até 220 °C, mantendo-se nesta temperatura por 3 minutos, aumentando 20 °C por minuto até 240 °C, mantendo-se nesta temperatura por 5 minutos, totalizando 46 minutos [17]. O volume de injeção foi de 1 μ L através da técnica *hot needle* por 5 segundos. O gás de arraste foi o hidrogênio com velocidade linear de 40 cm/s e o gás make-up, nitrogênio a 30 mL/min.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos padrões de metil ésteres de ácidos graxos com os tempos de retenção de metil ésteres de ácidos graxos da amostra. A quantificação foi realizada por padronização interna, utilizando-se os ésteres metílicos dos ácidos graxos undecanóico e tricosanóico, sendo os ácidos graxos calculados em mg/100g de amostra ou de carne de acordo com o método da AOCS [18].

2.10. Produtos oriundos da oxidação lipídica

2.10.1. Dienos conjugados

Os dienos conjugados (DC) foram mensurados de acordo com método descrito na IUPAC 2.505 com modificações de acordo com Dimakou [19]. A absorbância foi medida a 232 nm utilizando espectrofotômetro UV-VIS (Agilent, Santa Clara, CA). O teor de dienos conjugados foi calculado utilizando a massa molecular relativa (280 g.mol⁻¹) e absortividade molar (e = 26,000) do ácido linoleico de acordo com a equação 1:

(1)

$$DC(g.kg^{-1}) = 1,0769 \times Abs_{232\text{ nm}} / \text{Concentração da amostra no solvente (g.L}^{-1}\text{)}$$

2.10.2. Teor de Peróxidos

Para determinação do teor de peróxidos foi utilizado o método 74A:1991 do IDF [20], calculados pela medida da absorbância a 510 nm utilizando espectrofotômetro UV-VIS (Agilent, Santa Clara, CA), com curva de calibração de 9 pontos preparada com cloreto férrico, com concentrações variando de 0,5 a 40 µg/mL.

2.10.3. Compostos voláteis

O preparo das amostras para análise dos compostos voláteis hexanal, pentanal e propanal foi realizado de acordo com Ulberth e Roubicek [21] com modificações no peso da amostra. Uma porção lipídica de 25 mg (o método usa 1 g de amostra) foi adicionada ao vial de 10 mL juntamente com o padrão interno 2-

heptanona (0,1 µg/mL). Os vials foram selados com tampas de alumínio magnetizadas e septos de silicone cobertos de Teflon, sendo aquecidos à temperatura de 60 °C e agitados a 250 rpm por 1 h em incubador do injetor automático antes da injeção.

As análises cromatográficas foram realizadas baseadas no método descrito por Shahidi e Pegg [22] com modificações nas temperaturas iniciais e finais da corrida cromatográfica. Foi utilizado cromatógrafo gasoso acoplado a um detector espectrômetro de massas com fonte de ionização EI e analisador de m/z quadrupolo GCMS-QP2010 Ultra e injetor automático AOC-5000 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Os compostos foram separados em coluna capilar RTX-Wax (Restek, 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm). A programação de temperatura da coluna foi: 30 °C por 8 minutos, aumentando a 10 °C por minuto até 115 °C, mantendo-se nesta temperatura por 4 minutos, aumentando a 30 °C por minuto até 200 °C, mantendo-se nesta temperatura por 2 minutos, totalizando 23 minutos. Hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo constante de 1,2 mL/min. Foram injetados 1 mL de compostos voláteis presentes no headspace dos vials, com o injetor operando no modo split na razão 1:7 com temperatura de 180 °C. A temperatura da interface foi mantida a 210 °C. A aquisição dos dados foi realizada no modo de monitoramento de íon selecionado (SIM) de acordo com a tabela 2. Todas as análises foram realizadas com energia de ionização de 70 eV.

Os compostos foram identificados pela comparação dos espectros de massas dos padrões e da amostra, com os contidos na biblioteca de espectros de massa Wiley Registry of Mass Spectral Data [23] e pela comparação dos tempos de retenção dos padrões dos compostos com os tempos de retenção da amostra.

A quantificação foi realizada comparando a área dos picos das amostras com a área do pico do padrão interno 2-heptanona, sendo os resultados expressos em ng/g de lipídios.

Tabela 2 – Massas e tempos de retenção dos compostos voláteis selecionadas na análise em modo SIM

Composto	Massas (m/z)	Tempo de retenção (min)
Propanal	28, 29, 57 e 58	2,0
Pentanal	28, 29, 44, 57 e 58	5,1
Hexanal	44, 56 e 72	7,8

2.11. Validação da MAE

A validação do método de MAE de lipídios em filé de frango foi realizada através da comparação dos resultados obtidos com o método otimizado com o método convencional proposto por Folch et al. [14] (7 extrações com 10 replicatas) e pela utilização de material de referência certificado de carnes homogeneizadas (SRM 1546, NIST) (3 extrações com 10 replicatas). Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente quanto à precisão e exatidão. O método com a condição otimizada foi aplicado em diferentes carnes (coxa de frango, sobrecoxa de frango, pernil suíno, lombo suíno, lagarto bovino e cupim bovino), podendo ser avaliado quanto à robustez.

2.12. Análise estatística

O planejamento estatístico e a análise estatística dos dados foram realizados utilizando o software Statistica 7.0. Os resultados obtidos e as médias foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,1$).

3. Resultados e discussões

3.1. Umidade

Os teores de umidade das amostras de carnes variaram de 70,1 a 76,9 g/100g (tabela 3), indicando que grande parte da energia de micro-ondas poderá ser absorvida pelas moléculas de água durante a MAE. A eficiência da absorção da energia de micro-ondas é relacionada à umidade do material. As moléculas de água absorvem de maneira eficiente e convertem a energia de micro-ondas em calor, resultando em um aumento da temperatura e da pressão no interior da matriz. Como consequência, a estrutura celular é rompida e o fluxo dos constituintes da matriz para o solvente é facilitado [24,25]. Em função das propriedades dielétricas da água pode-se esperar o rápido aquecimento e consequentemente a eficiência da extração poderá ser evidenciada. Esse mecanismo é diferente da extração realizada pelo método convencional proposto por Folch et al. [14], que depende de uma série de permeações e solubilização para obter os compostos de interesse no solvente extrator.

Como o efeito das micro-ondas é fortemente dependente das propriedades dielétricas, em alguns casos, a extração de compostos é realizada com solventes contendo pequenas proporções de água [26,27], ou com a amostra sendo imersa em água previamente à extração [28,29], com o objetivo de facilitar o aquecimento

da matriz e assim, aumentar a transferência de massa do composto desejado para o solvente extrator. Essa etapa, a princípio, não é necessária para a extração dos lipídios das carnes, já que apresentam alto teor de umidade.

Tabela 3 – Teor de umidade (g/100g) nas carnes de frango, suína e bovina.

Amostras	Umidade (g/100g)
Carne de frango	
Filé	75,14 ± 0,24
Coxa	76,91 ± 0,06
Sobrecoxa	76,95 ± 0,16
Carne suína	
Pernil	72,85 ± 0,69
Lombo	72,86 ± 0,06
Carne bovina	
Lagarto	76,23 ± 0,15
Cupim	70,16 ± 0,35

3.2. Solvente extrator e parâmetros de permissividade dielétrica

Os solventes comportam-se distintamente na MAE e no método convencional de extração. No método convencional, a extração dos compostos depende principalmente da solubilidade do composto no solvente, da transferência de massa e da força de interações soluto/matriz. Sobre a influência das micro-ondas, o aquecimento desenvolve um papel importante na eficiência da extração. Portanto, o sucesso da MAE também é determinado pelas propriedades dielétricas dos solventes extratores.

As propriedades dielétricas dos materiais são definidas em função da constante dielétrica (ϵ') e da perda dielétrica (ϵ''). A constante dielétrica e a perda

dielétrica dos solventes à frequência de 2450 MHz são apresentadas na tabela 4, bem como a recuperação dos lipídios extraídos quando comparados à extração pelo método convencional. Os solventes clorofórmio:metanol (2:1, v/v), acetato de etila:metanol (2:1, v/v) e acetato de etila:metanol (4:1, v/v) apresentaram altos valores de ϵ' , indicando bons meios para absorção de energia de micro-ondas, e os valores de ϵ'' indicam conversão eficiente da energia de micro-ondas absorvida na forma de calor. Ao realizar as extrações de lipídios utilizando o sistema extrator de micro-ondas esses solventes foram os que resultaram em teores de lipídios semelhantes ao obtidos com o método convencional.

Tabela 4 – Parâmetros de permissividade dielétricas e recuperação dos lipídios extraídos

Solvente	Constante dielétrica (ϵ')	Perda dielétrica (ϵ'')	Recuperação de lipídios (%)*
Clorofórmio:metanol (2:1, v/v)	10,6	5,3	100
Hexano	2,3	0,6	10
Isopropanol	4,8	4,5	0
Isooctano	2,2	0,5	6,2
Acetato de etila	6,8	1,4	50
Hexano:isopropanol (3:1, v/v)	2,8	1,0	8,7
Hexano:clorofórmio (3:1, v/v)	2,8	0,5	3,7
Acetato de etila:isopropanol (7:3, v/v)	8,4	2,9	0
Acetato de etila:metanol (2:1, v/v)	13,0	3,6	100
Acetato de etila:metanol (4:1, v/v)	10,3	1,7	100
Acetato de etila:metanol (9:1, v/v)	8,2	0,9	75

*obtida em relação à extração convencional.

Solventes como hexano e isso-octano que possuem baixos valores de ϵ' e ϵ'' não foram eficientes na extração dos lipídios, possivelmente em função de suas características e das condições de extração estudadas, como temperaturas abaixo do ponto de ebulição dos solventes e tempo de extração relativamente curtos, contrariando alguns estudos que indicam que esses solventes seriam indicados para extrações de compostos termolábeis, utilizando baixas temperaturas [2, 30].

Visando o uso de solventes com menor toxicidade, a mistura acetato de etila:metanol (2:1, v/v) foi escolhida como o solvente para extração dos lipídios, resultando em eficiência comparada à do clorofórmio:metanol (2:1, v/v).

3.3. Otimização da extração de lipídios assistida por micro-ondas

O teor de lipídios do filé de frango realizado pelo método convencional foi de 2,18 g/100g. A matriz com os ensaios e a resposta para extração de lipídios por MAE encontram-se na tabela 5. O ensaio cujo teor de lipídios apresentou semelhança com a extração convencional foi o ensaio 6. Os pontos centrais apresentaram uma variação pequena, com coeficiente de variação de 1,9 %, indicando boa repetibilidade do processo de extração.

A tabela 6 apresenta os coeficientes de regressão para a extração de lipídios assistida por micro-ondas. Verifica-se que foram significativos os termos lineares para massa da amostra (m), tempo de extração (t) e interação massa da amostra e tempo de extração (m.t) ($p < 0,1$). A equação do modelo está apresentada abaixo (equação 2). Considerando somente os termos significativos, a tabela 7 apresenta a análise de variância para a MAE. O coeficiente de determinação para a MAE foi de 80 %. O modelo é significativo e adequado para

descrever os resultados através da superfície de resposta, como fica evidente pelo valor do F calculado (16,22).

$$y = 1,72 - 0,15 m + 0,16 t + 0,09 m t \quad (2)$$

Tabela 5 – Matriz do DCCR para a extração de lipídios em filé de frango assistida por micro-ondas.

Ensaio	Variáveis			Lipídios (g/100g)
	Temperatura (°C)	Massa da amostra (mg)	Tempo (min)	
1	36	300	5	1,95
2	54	300	5	1,55
3	36	500	5	1,38
4	54	500	5	1,35
5	36	300	15	2,07
6	54	300	15	2,15
7	36	500	15	1,74
8	54	500	15	1,97
9	30	400	10	1,58
10	60	400	10	1,86
11	45	230	10	1,92
12	45	670	10	1,45
13	45	400	2	1,40
14	45	400	18	1,75
15	45	400	10	1,8
16	45	400	10	1,66
17	45	400	10	1,75

Tabela 6 – Coeficientes de regressão do DCCR para MAE.

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(7)	p-valor
Média	1,72	0,07	21,99	<0,0001
(1)Temperatura (L)	0,02	0,03	0,69	0,5089
Temperatura (Q)	0,01	0,04	0,48	0,6449
(2)Massa (L)	-0,15	0,03	-4,10	0,0045
Massa (Q)	0,00	0,04	0,17	0,8646
(3)Tempo (L)	0,16	0,03	4,53	0,0026
Tempo (Q)	-0,03	0,04	-0,78	0,4608
1L, 2L	0,06	0,04	1,34	0,2198
1L,3L	0,09	0,04	1,91	0,0966
2L,3L	0,03	0,04	0,67	0,5221

Tabela 7 – Análise de variância para a superfície de resposta do modelo quadrático para a extração de lipídios em filé de frango assistida por micro-ondas.

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal
Regressão	0,76	3	0,25	16,22
Resíduos	0,20	13	0,01	
Total	0,97	16		

% variação explicada (R^2) = 78,92 %

$F_{3; 13; 0,1} = 2,56$

Como apenas os parâmetros massa da amostra e tempo de extração foram significativos, foi possível gerar apenas 1 superfície de resposta (figura 1). Os teores de lipídios obtidos foram na faixa de 1,35 a 2,15 g/100g. A análise da superfície de resposta indica que o maior teor de lipídio extraído foi alcançado quando o utilizou-se tempo acima de 15 minutos e massa de amostra menor que 300 mg.

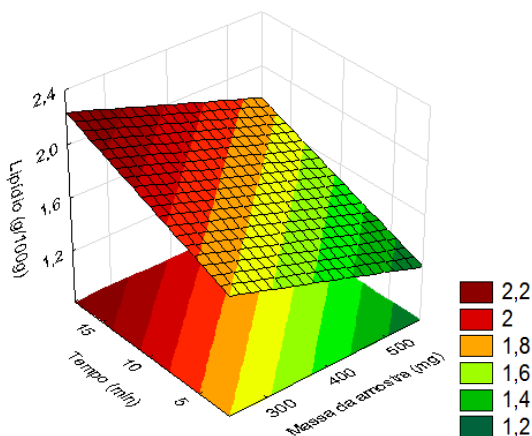


Figura 1 – Superfície de resposta para extração de lipídios em filé de frango assistida por micro-ondas (g/100g) em função do tempo de extração e da massa da amostra.

O teor de lipídio extraído aumentou com o tempo de extração. Observa-se que em tempos maiores de extração, mesmo com variações na massa da amostra (figura 1) ou com temperaturas menores (tabela 5) houve uma eficiente extração dos lipídios. Porém, a extração ideal foi obtida no tempo de 15 minutos.

Observa-se que nos ensaios com maior massa de amostra as extrações não foram eficientes. Possivelmente, com maior massa as temperaturas e os tempos máximos utilizados para extração exaustiva dos lipídios não foram suficientes, sendo necessário alterar as condições a serem utilizadas durante a irradiação, como maior tempo e/ou temperatura. Nas condições estudadas, foi possível determinar a massa ideal, 300 mg, para garantir a eficiência da extração dos lipídios.

Normalmente, o aumento da temperatura de extração favorece a solubilidade dos compostos. Isso ocorre porque em altas temperaturas diminuem as interações intermoleculares com o solvente, aumentando a mobilidade celular e

consequentemente, aumentando a solubilidade. O aumento da temperatura também pode causar rompimento celular e, como resultado, tornam os compostos celulares mais disponíveis para extração pelo solvente. Além disso, em altas temperaturas a viscosidade do solvente diminui e a difusividade aumenta, portanto, a eficiência da extração também aumenta [31]. Por outro lado, com o aumento da temperatura pode ocorrer a oxidação dos lipídios. Embora a temperatura não seja significativa neste estudo, é possível observar através da tabela 5 que a melhor extração foi obtida com temperaturas maiores. Desta forma, a temperatura de 54 °C foi escolhida como a temperatura ótima.

Realizou-se, então, uma validação utilizando a condição otimizada (300 mg de amostra, 54 °C e 15 minutos) a fim de comparar o valor predito com o valor prático. A análise em triplicata resultou em $2,11 \pm 0,05$ g/100g de lipídios totais, sendo este valor muito próximo ao valor predito pela equação do modelo de 2,05 g/100g. Uma boa correlação entre estes resultados confirma a validade do modelo e que a condição escolhida é adequada para extração dos lipídios.

Para verificar se a MAE acarretou em alterações no teor de ácidos graxos dos lipídios extraídos, foi realizada a comparação da composição de ácidos graxos provenientes de lipídios do método de extração convencional e do MAE, cujos resultados são apresentados na tabela 8. Os ácidos graxos majoritários na amostra são o oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6), palmítico (16:0) e esteárico (18:0), respectivamente. Ao comparar os métodos de extração, nenhum ácido graxo apresentou diferença estatística. De maneira geral, a MAE não alterou a composição dos ácidos graxos das amostras avaliadas.

Tabela 8 – Teores de ácidos graxos de filé de frango (mg/100g) extraídos segundo o método de Folch (1957) e MAE.

Ácido graxo	Folch	MAE
10:0	0,29 ± 0,02 ^a	0,23 ± 0,00 ^a
12:0	2,21 ± 0,10 ^a	2,34 ± 0,23 ^a
14:0	10,98 ± 0,55 ^a	10,44 ± 1,17 ^a
15:0	2,05 ± 0,11 ^a	1,94 ± 0,19 ^a
16:0	408,03 ± 15,82 ^a	415,02 ± 33,47 ^a
17:0	3,33 ± 0,07 ^a	3,31 ± 0,31 ^a
18:0	133,19 ± 8,53 ^a	113,34 ± 7,16 ^a
20:0	1,60 ± 0,06 ^a	1,78 ± 0,17 ^a
22:0	0,94 ± 0,05 ^a	0,90 ± 0,10 ^a
14:1n-5	2,49 ± 0,15 ^a	2,42 ± 0,25 ^a
16:1n-6	81,80 ± 5,83 ^a	80,14 ± 7,48 ^a
17:1n-7	7,54 ± 0,25 ^a	8,89 ± 1,04 ^a
18:1n-9 ^t	2,88 ± 0,16 ^a	3,35 ± 0,06 ^a
18:1n-9	628,05 ± 30,10 ^a	626,57 ± 32,94 ^a
18:2n-6	471,43 ± 20,91 ^a	459,18 ± 24,31 ^a
18:3n-6	3,31 ± 0,11 ^a	3,55 ± 0,42 ^a
20:1n-9	4,32 ± 0,11 ^a	4,49 ± 0,42 ^a
18:3n-3	25,02 ± 0,69 ^a	25,19 ± 2,86 ^a
20:2n-6	6,42 ± 0,20 ^a	6,87 ± 0,59 ^a
20:3n-6	7,30 ± 0,26 ^a	8,50 ± 0,31 ^a
22:1n-9	0,30 ± 0,01 ^a	0,38 ± 0,04 ^a
20:3n-3	0,45 ± 0,03 ^a	0,47 ± 0,03 ^a
20:4n-6	45,31 ± 3,06 ^a	47,99 ± 1,78 ^a
20:5n-3	1,54 ± 0,04 ^a	1,72 ± 0,15 ^a
24:1n-9	0,80 ± 0,05 ^a	0,81 ± 0,06 ^a
22:6n-3	3,58 ± 0,07 ^a	3,35 ± 0,39 ^a

Letras iguais na mesma linha não apresentam diferença estatística entre as extrações ($p < 0,1$). Os ácidos graxos 8:0, 13:0, 15:1n-5, 18:2n-6(9^t,12^t), 19:0, 21:0, 22:2n-6 e 24:0 não foram detectados.

3.4. Produtos oriundos da oxidação lipídica

A oxidação lipídica em alimentos é um processo de degradação que diminui a qualidade sensorial e nutritiva do produto, formando compostos tóxicos indesejáveis, que torna os alimentos menos aceitáveis ou inaceitáveis ao consumo. Os principais componentes envolvidos na oxidação lipídica são ácidos graxos insaturados e oxigênio, sendo afetada por fatores internos e externos, como teor e atividade de pró e antioxidantes, irradiação, temperatura, presença de metais, sensibilizadores naturais, superfície de contato com o oxigênio e atividade de água. Durante as etapas iniciais da oxidação ocorre a formação de radicais, formando intermediários instáveis como dienos conjugados e hidroperóxidos que, durante a propagação da oxidação, degradam-se produzindo compostos de baixo peso molecular, responsáveis pelo *off flavor* [32,33]. A carne de frango, em particular, é sensível à oxidação lipídica em função do alto teor de lipídios insaturados. Os teores obtidos para dienos conjugados, peróxidos e compostos voláteis dos lipídios extraídos pela MAE e pelo método convencional são apresentados na tabela 9. De acordo com Kiokias et al. [34] atinge-se o estágio inicial de oxidação lipídica quando os valores de dienos conjugados obtidos apresentam-se acima de 5 g/kg. Já para peróxidos, é considerado alimento com baixa oxidação lipídica aqueles que atingem valores de até 10 meqO₂/kg [35]. Os teores de dienos e peróxidos encontrados em ambos os métodos de extração estão abaixo dos índices sugeridos na literatura.

Tabela 9 – Produtos oriundos da oxidação lipídica de lipídios de carne filé de frango segundo o método de Folch (1957) e MAE.

Compostos	Folch	MAE
Dienos (g/kg de lipídio)	1,05 ± 0,02 ^b	0,70 ± 0,06 ^a
Peróxidos (meqO ₂ /kg de lipídio)	1,81 ± 0,19 ^a	2,03 ± 0,10 ^b
Compostos voláteis (ng/g de lipídio)		
Hexanal	2,49 ± 0,04 ^b	0,48 ± 0,01 ^a
Pentanal	ND	ND
Propanal	ND	ND

Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística entre as extrações ($p < 0,1$).

ND = Não detectado.

Dos aldeídos analisados, apenas o hexanal foi detectado, obtendo-se baixos teores em ambos os métodos. De maneira geral, verifica-se que em ambos processos de extração foi encontrado um baixo teor de hexanal quando comparado a diferentes trabalhos [36,37]. Propanal é o principal marcador da oxidação de ácidos graxos da família n-3, enquanto pentanal e hexanal são marcadores da oxidação de ácidos graxos da família n-6 [38]. Na amostra analisada, o ácido linoleico é o ácido graxo poli-insaturado mais abundante, o que explica a formação de hexanal presente nos lipídios extraídos.

Esses resultados mostram que a MAE, nas condições utilizadas, não promoveu oxidação lipídica na amostra quando comparada ao método convencional. Desta forma, a mesma pode ser utilizada para extração e estudo de lipídios.

3.5. Validação da MAE

A validação da MAE foi avaliada levando em consideração os parâmetros de precisão e exatidão, através da comparação dos resultados obtidos com o método desenvolvido com o método convencional utilizando filé de frango e de padrão de referência certificado de carnes homogeneizadas (SRM 1546, NIST).

A precisão do procedimento é apresentada na tabela 10. As replicatas (n=10) de cada extração apresentaram coeficiente de variação (CV) menor que 8 %, o que é aceitável no nível de concentração estudado [39].

Tabela 10 – Teores de lipídios em filé de frango e repetitividade através da extração assistida por micro-ondas

Extração	Teor de lipídios* (g/100g)	Repetitividade** (CV %)
1	2,13 ± 0,11	5,16
2	2,14 ± 0,14	6,54
3	2,14 ± 0,13	6,07
4	2,14 ± 0,16	7,47
5	2,14 ± 0,13	6,07
6	2,13 ± 0,18	8,45
7	2,13 ± 0,16	7,51

*Média ± desvio padrão de 10 repetições; **CV = coeficiente de variação de 10 repetições.

Ao comparar os dois métodos de extração, verificou-se que não existe diferença estatística nos resultados tanto de lipídios como no teor de ácidos graxos (tabela 8). Os resultados da extração de lipídios e ácidos graxos utilizando padrão de referência de carnes homogeneizadas (SRM 1546, NIST) são apresentados na tabela 11, assim como os resultados declarados na certificação.

Como podem ser visualizados, os resultados obtidos estão em concordância com os valores certificados. Desta maneira, a extração de lipídios por MAE demonstrou ser um método exato e preciso podendo ser utilizado para a determinação da composição de ácidos graxos.

Tabela 11 – Teores de lipídios e de ácidos graxos extraídos por MAE do material de referência certificado (SRM 1546, NIST) e valor declarado no certificado do material de referência (SRM 1546, NIST).

	MAE	SRM 1546
Lipídios (g/100g)	20,80 ± 1,60	21,00 ± 1,40
Ácidos graxos (mg/100g)		
10:0	16,84 ± 1,90	17,10 ± 3,20
12:0	12,87 ± 0,55	13,30 ± 2,80
14:0	259,05 ± 30,97	253,00 ± 10,00
16:0	4513,39 ± 246,70	4560,00 ± 390,00
18:0	2210,73 ± 53,76	2170,00 ± 290,00
20:0	34,95 ± 3,80	31,50 ± 6,30
16:1n-7	683,75 ± 67,19	683,00 ± 66,00
18:1n-9	8724,39 ± 214,14	8200,00 ± 960,00
18:2n-6	1976,26 ± 13,29	1960,00 ± 200,00
18:3n-3	121,78 ± 14,68	141,00 ± 35,00
20:1n-9	163,03 ± 17,14	156,00 ± 23,00
20:4n-6	79,80 ± 6,51	56,00 ± 25,00

3.6. Aplicação

O método otimizado e validado foi aplicado em carnes de diferentes teores de lipídios. A tabela 12 apresenta os teores de lipídios extraídos nas amostras pelo método convencional e por MAE, que variaram de 1 a 5 %. Os resultados

mostram que não houve diferença entre ambas as extrações, o que indica que a MAE é capaz de extrair teores variáveis de lipídios, como também demonstrou o material de referência certificado, com 20 % de lipídios.

Os ácidos graxos extraídos pelo método convencional e pela MAE são apresentados nas tabelas 13 a 14. Com exceção de alguns ácidos graxos, a maioria não apresentou diferença estatística ao comparar os métodos de extração. Essa diferença foi gerada em ácidos graxos minoritários, onde pequenas variações nos teores já acarretam em diferença estatística. Contudo, o teor de ácidos graxos das amostras avaliadas não foi alterado.

Tabela 12 – Teores de lipídios (g/100g) extraídos pelo método de Folch (1957) e MAE em amostras de carne de frango, suína e bovina.

Amostra	Folch	MAE
Frango		
Coxa	2,06 ± 0,22 ^a	2,10 ± 0,15 ^a
Sobrecoxa	2,48 ± 0,19 ^a	2,48 ± 0,22 ^a
Suína		
Pernil	3,56 ± 0,26 ^a	3,57 ± 0,27 ^a
Lombo	3,36 ± 0,20 ^a	3,21 ± 0,31 ^a
Bovina		
Lagarto	1,15 ± 0,08 ^a	1,15 ± 0,08 ^a
Cupim	5,41 ± 0,15 ^a	5,35 ± 0,43 ^a

Letras diferentes na mesma linha apresentam diferença estatística entre as extrações ($p < 0,1$).

Tabela 13 – Teores de ácidos graxos (mg/100g) de carnes de frango extraídos pelo método de Folch (1957) e MAE.

Ácidos graxos	Amostras			
	Coxa		Sobrecoxa	
	Folch	MAE	Folch	MAE
12:0	0,77 ± 0,05 ^a	0,80 ± 0,06 ^a	0,80 ± 0,08 ^a	1,03 ± 0,02 ^a
14:0	11,58 ± 1,07 ^a	11,42 ± 0,64 ^a	12,99 ± 1,08 ^a	13,95 ± 1,35 ^a
15:0	1,48 ± 0,15 ^a	1,37 ± 0,03 ^a	2,04 ± 0,21 ^a	2,24 ± 0,28 ^a
16:0	401,20 ± 37,70 ^a	411,23 ± 24,02 ^a	479,89 ± 49,90 ^a	509,68 ± 13,57 ^a
17:0	2,38 ± 0,21 ^a	2,21 ± 0,04 ^a	3,13 ± 0,15 ^a	4,02 ± 0,32 ^a
18:0	123,10 ± 8,97 ^a	124,13 ± 10,68 ^a	144,69 ± 17,99 ^a	147,34 ± 10,34 ^a
20:0	1,29 ± 0,049 ^a	1,10 ± 0,10 ^a	1,31 ± 0,10 ^a	2,11 ± 0,20 ^b
22:0	0,74 ± 0,08 ^a	0,63 ± 0,14 ^a	0,60 ± 0,07 ^a	0,67 ± 0,08 ^a
14:1n-5	3,74 ± 0,32 ^a	3,71 ± 0,08 ^a	3,54 ± 0,43 ^a	4,25 ± 0,45 ^a
16:1n-7	107,67 ± 5,04 ^a	117,54 ± 1,57 ^a	117,73 ± 11,06 ^a	122,99 ± 4,19 ^a
17:1n-7	5,14 ± 0,43 ^a	5,19 ± 0,58 ^a	5,63 ± 0,35 ^a	7,62 ± 0,78 ^b
18:1n-9 _t	2,12 ± 0,15 ^a	1,90 ± 0,14 ^a	4,32 ± 0,24 ^a	4,03 ± 0,46 ^a
18:1n-9	657,41 ± 16,86 ^a	673,73 ± 36,72 ^a	770,07 ± 83,34 ^a	760,17 ± 88,00 ^a
18:2n-6	253,06 ± 27,88 ^a	249,32 ± 26,77 ^a	371,18 ± 32,38 ^a	393,65 ± 21,83 ^a
18:3n-6	2,35 ± 0,14 ^a	2,34 ± 0,10 ^a	2,95 ± 0,03 ^a	3,17 ± 0,31 ^a
18:3n-3	8,20 ± 0,58 ^a	8,77 ± 0,53 ^a	12,00 ± 0,52 ^a	10,45 ± 0,54 ^a
20:1n-9	5,37 ± 0,50 ^a	5,29 ± 0,59 ^a	6,11 ± 0,34 ^a	7,19 ± 0,75 ^a
20:2n-6	2,99 ± 0,11 ^a	3,29 ± 0,26 ^a	4,14 ± 0,14 ^a	4,62 ± 0,43 ^a
20:3n-6	7,33 ± 0,66 ^a	8,05 ± 0,77 ^a	12,73 ± 0,12 ^a	11,48 ± 1,33 ^a
20:4n-6	64,21 ± 1,89 ^a	61,58 ± 2,65 ^a	62,82 ± 5,80 ^a	62,29 ± 3,92 ^a
20:5n-3	2,40 ± 0,20 ^a	2,90 ± 0,30 ^a	3,22 ± 0,08 ^a	3,20 ± 0,34 ^a
22:6n-3	5,49 ± 0,13 ^a	5,18 ± 0,27 ^a	4,73 ± 0,02 ^a	5,90 ± 0,59 ^a
24:1n-9	1,06 ± 0,12 ^b	0,65 ± 0,03 ^a	1,27 ± 0,13 ^a	1,01 ± 0,08 ^a

Letras diferentes na mesma linha para o mesmo corte de carne não apresentam diferença estatística entre as extrações ($p < 0,1$). Os ácidos graxos 8:0, 10:0, 13:0, 15:1n-5, 18:2n-6(9_t,12_t), 19:0, 20:3n-3, 21:0, 22:1n-9, 22:2n-6 e 24:0 não foram detectados.

Tabela 14 – Teores de ácidos graxos (mg/100g) de carnes suína extraídos pelo método de Folch (1957) e MAE.

Ácidos Graxos	Amostras			
	Pernil		Lombo	
	Folch	MAE	Folch	MAE
10:0	2,67 ± 0,27 ^a	2,47 ± 0,31 ^a	1,85 ± 0,14 ^a	1,77 ± 0,20 ^a
12:0	4,41 ± 0,14 ^a	5,08 ± 0,62 ^a	3,59 ± 0,34 ^a	3,55 ± 0,09 ^a
14:0	55,02 ± 4,05 ^a	59,69 ± 7,44 ^a	29,10 ± 3,39 ^a	27,72 ± 0,52 ^a
15:0	1,25 ± 0,14 ^a	2,11 ± 0,23 ^b	1,35 ± 0,09 ^b	1,04 ± 0,06 ^a
16:0	934,43 ± 64,80 ^a	948,89 ± 27,33 ^a	852,65 ± 93,20 ^a	880,14 ± 90,13 ^a
17:0	4,10 ± 0,37 ^a	4,91 ± 0,48 ^a	5,11 ± 0,60 ^a	4,35 ± 0,22 ^a
18:0	330,98 ± 20,29 ^a	359,17 ± 45,15 ^a	358,45 ± 40,47 ^a	346,10 ± 4,81 ^a
20:0	3,04 ± 0,38 ^a	3,82 ± 0,05 ^a	3,90 ± 0,33 ^a	3,71 ± 0,44 ^a
14:1n-5	0,42 ± 0,01 ^a	0,39 ± 0,02 ^a	0,84 ± 0,05 ^a	0,91 ± 0,09 ^a
16:1n-7	98,31 ± 12,64 ^a	109,89 ± 12,45 ^a	52,65 ± 6,11 ^a	51,09 ± 1,59 ^a
17:1n-7	6,38 ± 0,40 ^a	6,50 ± 0,36 ^a	11,14 ± 1,36 ^a	11,54 ± 0,49 ^a
18:1n-9 ^t	4,74 ± 0,49 ^a	4,85 ± 0,08 ^a	6,33 ± 0,02 ^a	6,17 ± 0,06 ^a
18:1n-9	1350,66 ± 115,18 ^a	1275,04 ± 161,69 ^a	1429,74 ± 161,09 ^a	1432,95 ± 138,19 ^a
18:2n-6	883,56 ± 101,29 ^a	827,64 ± 81,14 ^a	1148,17 ± 132,08 ^a	1164,10 ± 62,00 ^a
18:3n-6	0,69 ± 0,08 ^a	0,74 ± 0,02 ^a	1,15 ± 0,08 ^a	1,06 ± 0,12 ^a
18:3n-3	58,05 ± 7,07 ^a	62,02 ± 4,19 ^a	44,38 ± 2,82 ^a	48,03 ± 5,78 ^a
20:1n-9	18,49 ± 1,23 ^a	19,15 ± 1,36 ^a	13,96 ± 0,33 ^a	13,54 ± 0,23 ^a
20:2n-6	8,59 ± 1,09 ^a	7,62 ± 0,70 ^a	15,50 ± 0,67 ^a	16,77 ± 1,97 ^a
20:3n-6	2,47 ± 0,20 ^a	2,63 ± 0,07 ^a	3,03 ± 0,28 ^a	3,06 ± 0,07 ^a
20:3n-3	3,63 ± 0,21 ^a	3,26 ± 0,36 ^a	3,02 ± 0,22 ^a	3,29 ± 0,37 ^a
20:4n-6	24,67 ± 2,48 ^a	22,51 ± 1,91 ^a	15,94 ± 0,96 ^a	15,39 ± 1,97 ^a
20:5n-3	1,19 ± 0,09 ^a	1,25 ± 0,13 ^a	1,14 ± 0,14 ^a	1,55 ± 0,14 ^a
22:6n-3	2,16 ± 0,01 ^b	1,88 ± 0,02 ^a	1,41 ± 0,11 ^a	3,04 ± 0,32 ^b

Letras diferentes na mesma linha para o mesmo corte de carne não apresentam diferença estatística entre as extrações ($p < 0,1$). Os ácidos graxos 8:0, 13:0, 15:1n-5, 18:2n-6(9^t,12^t), 19:0, 21:0, 22:0, 22:1n-9, 22:2n-6, 24:0 e 24:1n-9 não foram detectados.

Tabela 15 - Teores de ácidos graxos (mg/100g) de carnes bovina extraídos pelo método de Folch (1957) e MAE.

Ácidos Graxos	Amostras			
	Lagarto		Cupim	
	Folch	MAE	Folch	MAE
10:0	0,62 ± 0,06 ^a	0,67 ± 0,06 ^a	1,12 ± 0,11 ^a	1,59 ± 0,06 ^a
12:0	0,87 ± 0,05 ^a	0,91 ± 0,11 ^a	3,95 ± 0,26 ^a	3,21 ± 0,31 ^a
14:0	27,63 ± 3,55 ^a	25,26 ± 1,82 ^a	78,11 ± 1,37 ^a	79,40 ± 6,95 ^a
15:0	3,15 ± 0,08 ^a	2,95 ± 0,09 ^a	27,11 ± 2,42 ^a	25,24 ± 1,79 ^a
16:0	252,04 ± 18,55 ^a	232,96 ± 29,63 ^a	630,75 ± 24,32 ^a	616,26 ± 20,49 ^a
17:0	6,87 ± 0,13 ^a	6,52 ± 0,63 ^a	51,12 ± 0,60 ^a	48,65 ± 3,49 ^a
18:0	118,35 ± 13,45 ^a	107,70 ± 11,85 ^a	663,26 ± 78,72 ^a	622,43 ± 72,18 ^a
20:0	0,53 ± 0,06 ^a	0,49 ± 0,03 ^a	5,34 ± 0,13 ^a	4,36 ± 0,50 ^a
14:1n-5	5,90 ± 0,03 ^a	4,95 ± 0,21 ^a	5,60 ± 0,67 ^a	5,86 ± 0,75 ^a
16:1n-7	42,31 ± 3,69 ^a	34,00 ± 3,45 ^a	57,77 ± 6,49 ^a	57,04 ± 5,33 ^a
17:1n-7	8,82 ± 1,29 ^a	7,90 ± 0,28 ^a	14,69 ± 0,22 ^a	15,49 ± 1,74 ^a
18:1n-9 <i>t</i>	2,04 ± 0,02 ^a	1,86 ± 0,02 ^a	6,83 ± 0,79 ^a	6,36 ± 0,75 ^a
18:1n9	374,65 ± 57,25 ^a	352,15 ± 53,18 ^a	637,68 ± 49,68 ^a	652,86 ± 71,78 ^a
18:2n-6	21,26 ± 0,39 ^a	19,06 ± 2,02 ^a	35,87 ± 2,07 ^a	33,94 ± 3,82 ^a
18:3n-6	0,29 ± 0,02 ^a	0,31 ± 0,02 ^a	ND	ND
18:3n-3	6,38 ± 0,71 ^a	5,16 ± 0,43 ^a	20,00 ± 0,67 ^a	21,66 ± 2,70 ^a
20:1n-9	0,96 ± 0,06 ^b	0,72 ± 0,02 ^a	1,63 ± 0,19 ^a	1,95 ± 0,19 ^a
20:3n-6	4,22 ± 0,07 ^a	3,85 ± 0,27 ^a	ND	ND
20:4n-6	14,01 ± 0,11 ^b	11,26 ± 0,04 ^a	4,90 ± 0,43 ^a	5,19 ± 0,22 ^a
20:5n-3	6,18 ± 0,77 ^a	5,32 ± 0,49 ^a	2,19 ± 0,20 ^a	2,75 ± 0,30 ^a
22:6n-3	0,75 ± 0,07 ^a	0,64 ± 0,08 ^a	ND	ND

Letras diferentes na mesma linha para o mesmo corte de carne não apresentam diferença estatística entre as extrações ($p < 0,1$); Os ácidos graxos 8:0, 13:0, 15:1n-5, 18:2n-6(9*t*,12*t*), 19:0, 20:2n-6, 20:3n-3, 21:0, 22:0, 22:1n-9, 22:2n-6, 24:0 e 24:1n-9 não foram detectados; ND = não detectados.

4. Conclusões

Com este trabalho, foi possível o desenvolvimento e a validação de um método de extração de lipídios assistida por micro-ondas, verificando que os

teores encontrados não apresentam diferença estatística com os valores encontrados através do método convencional. A MAE também não induz a alterações de composição dos ácidos graxos, e não forma compostos de oxidação a níveis maiores que o método convencional.

Desta forma, a extração de lipídios assistida por micro-ondas é um método alternativo aos convencionais, preciso, exato e robusto, de melhor eficiência, possibilitando a extração de lipídios em mais de uma amostra simultaneamente, com maior rapidez (redução em 75 % no tempo de extração), menor custo, menos agressiva ao meio ambiente (redução de 95 % no consumo de solventes e substituição do clorofórmio por acetato de etila), menor quantidade de amostra e também menos laboriosa, já que grande parte do processo é realizado automaticamente pelo equipamento, quando comparados ao método convencional.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela assistência financeira.

6. Referências

- [1] Toschi, T.G., Bendini, A., Ricci, A., Lercker, G. Food Chem. 83, (2003), 551–555.
- [2] Paré, J.R.J., Bélanger, J.M.R., Stafford, S.S. Trends Analyt Chem 13 (1994) 176-184.

- [3] Kwon, J., Lee, G., Bélanger, J.M.R., Pare, J.R.J. *International Journal of Food Science and Technology* 38 (2003) 615–622.
- [4] Regueiro, J., Llompart, M., García-Jares, M., Cela, R. *J Chromatogr A* 1137 (2006) 1–7.
- [5] Zhang, F., Yang, Y., Su, P., Guo, Z.K. *Phytochem Anal* 20 (2009) 33–37.
- [6] Hu, Z., Cai, M., Liang, H. *Sep. Purif. Technol.* 61 (2008) 266–275.
- [7] Beejmohun, V., Fliniaux, O., Grand, E., Lamblin, F., Bensaddek, L., Christen, P., Kovensky, J., Fliniaux, M., Mesnard, F. *Phytochem Anal* 18 (2007) 275-282.
- [8] Sun, Y., Liao, X., Wang, Z., Hu, X., Chen, F. *Eur. Food Res. Technol.* 225 (2007) 511–523.
- [9] Terigar, B.G., Balasubramanian, S., Boldor, D., Xu, Z., Lima, M., Sabliov, C.M. *Bioresour Technol* 101 (2010) 2466–2471.
- [10] Li, M., Sun, S., Xu, F., Sun, R. *Food Chem* 134 (2012) 1392–1398.
- [11] Wang, S., Chen, F., Wu, J., Wang, Z., Liao, X., Hu, X. *J Food Eng* 78 (2007) 693–700.
- [12] Pena, T., Pensado, L., Casais, C., Mejuto, C., Phan-Tan-Luu, R., Cela, R. *J Chromatogr A* 1121 (2006) 163–169.
- [13] Papadakis, E.N., Polychroniadou, A. *Int Dairy J* 15 (2005) 165–172.
- [14] Folch, J., Lees, M., & Stanley, S. *The Journal of Biological Chemistry* 226 (1957) 497-509.
- [15] AOAC. Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of the analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 16. ed. Washington: AOAC, 1997.
- [16] Joseph, J.D., & Ackman, R.G. *J. AOAC Int* 75 (1992), 488-506.

- [17] Sancho, R.A.S., Bragagnolo, N., Costa, G.G., Mariutti, L.R.B., De Lima, F.A. J. Food Sci. 76 (2011) 838-845.
- [18] AOCS Official Method Ce 1b-89. In Firestone D (Ed). Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society (5th ed.). Champaign: American Oil Chemists' Society Press, 1997.
- [19] Dimakou, C., Kiokias, S., Tsaprouni, I., & Oreopoulou, V. Food Biophys 2 (2008) 38–45.
- [20] International IDF Standards, International Dairy Federation, IDF – Square Vergote 41, Brussels, Belgium, sec. 74A:1991, 1991.
- [21] Ulberth, F., Roubicek, D. Food Chem 46 (1993) 137-141.
- [22] Shahidi, F.; Pegg, R. B. Journal of Food Lipids 1 (1994) 177-186.
- [23] Wiley Registry of Mass Spectral Data, 9th ed., McLafferty, F.W. (Ed.). John Wiley and Sons, Inc., 2011.
- [24] Bélanger, J.M.R., Paré, J.R.J. Anal Bioanal Chem 86 (2006) 1049–1058.
- [25] Zheng, X., Wang, X., Lan, Y., Shi, J., Xue, S.J., Liu, C. Sep. Purif. Technol. 70 (2009) 34–40.
- [26] Pan, X., Niu, G., Liu, H. J Chromatogr A 922 (2001) 371–375 .
- [27] Talebi, M., Ghassempour, A., Talebpour, Z., Rassouli, A., Dolatyari, L. J Sep Sci 27 (2004) 1130–1136.
- [28] Pan, X., Liu, H., Jia, G., Shu, Y.Y. Biochem Eng J 5 (2000) 173-177.
- [29] Pan, X., Niu, G., Liu, H. Chem. Eng. Process. 42 (2003) 129–133.
- [30] Camel, V. Trends Analyt Chem 19 (2000) 229-248.
- [31] Hao, J., Han, W., Huang, S., Xue, B., Deng, X. Sep. Purif. Technol. 28 (2002) 191–196.

- [32] Kim, H.J., Min, D.B. In: Akoh, C.C., & Min, D.B. (Eds.), Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology (3rd Ed.). CRC Press, Boca Ratón, 2008, pp. 299-318.
- [33] Kolakowska, A., Sikorski, Z. E. In: Sikorski, Z.E., Kolakowska, A. (Eds.), Chemical and Functional Properties of Food Lipids. CRC Press, Boca Ratón, 2003, pp. 10-17.
- [34] Kiokias, S., Dimakou, C., & Oreopoulou, V. Food Chem 105 (2007) 94–100.
- [35] Codex Alimentarius Commission. Food Standards Programme. Codex Alimentarius for edible fats and oils. CODEX-STAN 210. Rome: FAO/WHO, 11, 1-13, 1999.
- [36] Elmore, J.S., Mottram, D.S., Enser, M., Wood, J.D. J Agric Food Chem 47 (1999) 1619–1625.
- [37] Kiokias, S., Dimakou, C., & Oreopoulou, V. Food Chem 114 (2009) 1278–1284.
- [38] Laguerre, M., Lecomte, J., Villeneuve, P. Prog Lipid Res 46 (2007) 244–282.
- [39] Horwitz, W., Kamps, L. R., Boyer, K. W. J Assoc Off Anal Chem 63 (1980) 1344-1354.

CAPÍTULO III

RÁPIDA TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

Aline Lisbôa Medina, Neura Bragagnolo

Artigo em preparação a ser submetido para publicação no periódico

LWT- Food Science and Technology

RÁPIDA TRANSESTERIFICAÇÃO DE TRIACILGLICERÓIS ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

Aline Lisbôa Medina^a, Neura Bragagnolo^a

^a Departamento de Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

RESUMO

Nesse estudo foi desenvolvido e validado um novo método de transesterificação de ácidos graxos de pernil suíno assistida por micro-ondas para análise por cromatografia gasosa, sem a utilização de trifluoreto de boro (BF_3). Um delineamento central composto rotacional foi utilizado para a avaliação do tempo de irradiação e da concentração de hidróxido de sódio em metanol, tendo como resposta os teores dos ácidos graxos 16:0, 18:0, 18:1n-9 e 18:2n-6. As condições ótimas do processo foram: 5 minutos de irradiação e 0,5 % de hidróxido de sódio em metanol. A validação foi realizada pela comparação entre o método otimizado e o método de Joseph & Ackman (1992) utilizando material de referência certificado e amostras de pernil suíno. Os teores de ácidos graxos do pernil suíno obtidos pela transesterificação assistida por micro-ondas não diferiram dos teores obtidos pelo método convencional. Os resultados obtidos para material de referência certificado mostraram-se semelhantes ao valor declarado. A transesterificação de ácidos graxos assistida por micro-ondas demonstrou ser exata e precisa, permitindo a reação sem BF_3 em menor tempo.

Palavras chave: pernil suíno, trifluoreto de boro, material de referência, validação.

1. Introdução

As técnicas cromatográficas, especialmente cromatografia gasosa (gas chromatography, GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) são muito utilizadas na análise de lipídios em alimentos. Na análise de ácidos graxos, GC desempenha um papel importante devido à excelente habilidade de separação de compostos de misturas complexas que envolvem isomeria geométrica e posicional (Ledoux et al., 2000).

A análise tradicional de ácidos graxos necessita da derivação para formar compostos voláteis a temperaturas menores. O procedimento mais utilizado é a transformação de ácidos graxos em ésteres metílicos. A esterificação de ácidos graxos pode ser conduzida por catálise alcalina com hidróxido de sódio (NaOH), hidróxido de potássio (KOH) ou metóxido de sódio (NaOCH₃) em metanol, ou por catálise ácida com ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico (H₂SO₄) ou trifluoreto de boro (BF₃) em metanol (De La Fuente et al., 2006). A grande maioria dos trabalhos na literatura utiliza o BF₃ como catalizador na forma de complexo com metanol (Sancho et al., 2011; Mazalli & Bragagnolo, 2007; Badiani et al, 2002). Entretanto, apresenta algumas desvantagens tais como ser um reagente tóxico, de alto custo e com vida de prateleira limitada. Além disso, seu uso pode resultar na produção de interferentes ou perda de ácidos graxos poli-insaturados. Por outro lado, o tempo de reação pode ser reduzido para evitar a formação desses interferentes (Zara et al., 2012; Fulk & Shorb, 1970).

Em análises de rotina o tempo é crítico, e os métodos de preparo de amostra para análise cromatográfica consomem tempo. As reações assistidas por micro-ondas apresentam maior rapidez, alto rendimento, alta pureza dos produtos

e as condições de reação são menos drásticas. O calor transferido é mais efetivo do que o aquecimento convencional e a reação pode ser completada em menor tempo (Lidström et al., 2001).

Recentemente o aquecimento por micro-ondas foi aplicado para a produção de biodiesel, provando que a transesterificação de diferentes óleos pode ser significativamente acelerada pelo aquecimento pelas micro-ondas (Azcan & Danisman, 2007, Perin et al., 2008, Patil et al., 2010). Alguns estudos já demonstram o uso da irradiação de micro-ondas para esterificação de ácidos graxos provenientes de óleos vegetais para análise em GC. Zara et al. (2012) reportam a transesterificação de óleo de soja com uso de BF_3 em apenas 60 segundos de irradiação, e Jeyashoke et al. (1998) utilizam metanol:tolueno com metóxido de sódio para realizar a transesterificação de óleo de farelo de arroz em menos de 40 segundos, sendo que ambos os métodos conseguem quantificar teores de ácidos graxos semelhantes aos utilizados em métodos convencionais.

O objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um método rápido de transesterificação de lipídios extraídos de pernil suíno assistida por micro-ondas para análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa. A otimização deste método foi realizada utilizando um delineamento composto central rotacional e a validação pela comparação entre o método otimizado e o método de Joseph & Ackman (1992) utilizando amostras de pernil suíno e material de referência certificado.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostra

A amostra de carne de pernil suíno (600 g) foi adquirida no comércio de Campinas, SP. Após a retirada da gordura superficial, a amostra foi homogeneizada em multiprocessador (Philco) por 1 minuto até a obtenção de uma pasta homogênea. O material de referência certificado de carnes homogeneizadas SRM 1546 foi obtido da NIST (Gaithersburg, MD, USA).

2.2. Reagentes

O complexo trifluoreto de boro em metanol 13-15 % (BF_3), a mistura de padrões contendo ésteres metílicos dos ácidos graxos 4:0 a 24:0, o éster metílico do ácido undecanóico (99 % GC) e o éster metílico do ácido tricosanóico (99 % GC) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O hexano grau cromatográfico HPLC para injeção das amostras em cromatógrafo gasoso foi adquirido da JT Baker (*Phillipsburg, NJ, USA*). Os reagentes grau P.A clorofórmio, metanol, iso-octano, hidróxido de sódio (NaOH) e cloreto de sódio (NaCl) foram obtidos da marca Synth (Diadema, SP, Brasil).

2.3. Determinação de umidade

O teor de umidade foi determinado através do método da AOAC (1997).

2.4. Extração de lipídios

Os lipídios foram extraídos segundo o método descrito por Folch et al. (1957).

2.5. Determinação dos ácidos graxos

2.5.1. Esterificação segundo Joseph & Ackman (1992)

Aproximadamente 25 mg de lipídio, obtido da extração de acordo com Folch et al. (1957) foi esterificada segundo o método de Joseph & Ackman (1992). Ao lipídio adicionou-se 1,5 mL de NaOH em metanol 2 % (m/v), ficando em banho de água a 100 °C por 5 minutos, sendo, após, resfriados a temperatura ambiente e adicionados de 2 mL de BF₃ em metanol, retornando a banho de água a 100 °C por 30 minutos. Foi adicionada à amostra, após resfriamento a temperatura ambiente, 5 mL de NaCl saturado (36 %, m/v) e 1 mL de iso-octano P.A, sendo agitados por 30 segundos, ocorrendo separação de fases. Separou-se a fase com iso-octano e repetiu-se a lavagem adicionando novamente 1mL de iso-octano, agitando em vortex e separando as fases. O extrato com os ésteres metílicos de ácidos graxos foi evaporado sob fluxo de nitrogênio, sendo diluído com 1 mL de hexano HPLC para injeção em cromatógrafo gasoso.

2.5.2. Transesterificação assistida por micro-ondas

O sistema extrator de micro-ondas Start-E (Milestone, Sorisole, Itália) foi utilizado para as reações de esterificação. Foram adicionados 5 mL de NaOH em metanol à 25 mg de lipídio em tubos de teflon, que foram submetidos a irradiação de micro-ondas a 60 °C com agitação magnética à 30 % e potência de 400 W. O tempo de irradiação e a concentração de NaOH foram determinados conforme o delineamento estatístico (item 2.5). Os tubos de teflon foram resfriados em banho de gelo e o extrato foi transferido para um tubo de ensaio. Foram adicionados 3 mL de água destilada e 1 mL de iso-octano, agitando-se em vortex por 30

segundos e centrifugando a 2500 g por 3 minutos a 10 °C. Separou-se a fase com iso-octano e repetiu-se a lavagem adicionando novamente 1 mL de iso-octano, seguida da agitação em vortex e centrifugação para separação de fases. O extrato com os ésteres metílicos de ácidos graxos foi evaporado sob fluxo de nitrogênio, sendo diluído com 1 mL de hexano HPLC para injeção em cromatógrafo gasoso.

2.5.3. Análise cromatográfica

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção dos picos da amostra com os padrões, sendo a quantificação realizada por padronização interna utilizando os ésteres metílicos dos ácidos undecanóico e tricosanóico e os resultados expressos em mg/100g de amostra (AOCS, 1997).

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com injetor split (1/50) a 250 °C, coluna capilar CP-SIL 88 (Chromopack, 100 m x 0,25 mm x 0,20 µm) e detector de ionização em chama a 260 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 120 °C durante 8 minutos, sendo programada para aumentar 20 °C por minuto até 160 °C, aumentando 3 °C por minuto até 195 °C, mantendo-se nesta temperatura por 10 minutos, aumentando 3 °C por minuto até 210 °C, aumentando 35 °C por minuto até 220 °C, mantendo-se nesta temperatura por 3 minutos, aumentando 20 °C por minuto até 240 °C, mantendo-se nesta temperatura por 5 minutos, totalizando 46 minutos (Sancho et al., 2011). O gás de arraste foi o hidrogênio a 40 cm/s e o gás make-up, nitrogênio a 30 mL/min. Foi injetado 1 µL através da técnica *hot needle* por 5 segundos.

2.6. Delineamento estatístico experimental

Os parâmetros utilizados para a otimização da transesterificação assistida por micro-ondas foram os seguintes: concentração de hidróxido de sódio (NaOH) em metanol (0,3 a 1,7 %) e tempo de irradiação (2 a 10 minutos), conforme tabela 1. Nesse estudo foi feito um delineamento composto central rotacional (DCCR) (2^2 adicionando-se 4 pontos centrais), compreendendo 11 ensaios que foram realizados de maneira aleatória de acordo com o software Statistica 7.0. Como respostas foram avaliados os teores dos ácidos graxos majoritários da amostra: ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1n-9) e ácido linoleico (18:2n-6).

Tabela 1 – Variáveis independentes e seus respectivos níveis utilizados no DCCR

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Tempo (minutos)	2	3	6	9	10
Concentração de NaOH em metanol (%)	0,3	0,5	1,0	1,5	1,7

2.7. Validação da transesterificação assistida por micro-ondas

A validação do método de transesterificação de ácidos graxos de lipídios extraídos do pernil suíno assistida por micro-ondas foi realizada através da comparação dos resultados obtidos pelo método otimizado com o método proposto por Joseph & Ackman (1992) e pela utilização de material de referência certificado de carnes homogeneizadas (SRM 1546). Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente quanto à precisão e exatidão.

2.8. *Análise estatística*

O planejamento estatístico e a análise estatística dos dados foram realizados utilizando o software Statistica 7.0. Os resultados obtidos e as médias foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,1$).

3. Resultados e discussões

3.1. *Otimização do método*

A matriz do DCCR contendo os resultados dos teores de ácidos graxos obtidos com a transesterificação assistida por micro-ondas dos lipídios de pernil suíno é apresentada na tabela 2. Os pontos centrais apresentaram uma variação pequena, com desvio padrão relativo variando entre 6 e 9 % para as respostas, indicando boa repetibilidade do processo. Através da esterificação segundo Joseph & Ackman (1992), foram encontrados os valores de 791,91 para 16:0, 304,28 para 18:0, 1349,19 para 18:1n-9 e 1148,17 para 18:2n-6 (todos em mg/100g). Pode-se observar pela matriz que os ensaios 1, 3, 5 e os pontos centrais apresentam valores muito próximos aos encontrados pelo método de Joseph & Ackman (1992).

A análise de regressão (tabela 3) indica que os parâmetros lineares do tempo (t) e quadráticos da concentração de NaOH (c^2) para todas as respostas (16:0, 18:0, 18:1n-9 e 18:2n-6) foram significativos na esterificação de ácidos graxos. Os coeficientes não significativos foram excluídos e o modelo foi reparametrizado, sendo as equações (3 a 6) para cada resposta, 16:0, 18:0, 18:1n-9 e 18:2n-6, apresentadas abaixo como y_1 , y_2 , y_3 e y_4 , respectivamente.

$$y_1 = 835,12 - 179,08 t - 320,62 c^2 \quad (3)$$

$$y_2 = 283,30 - 59,48 t - 113,70 c^2 \quad (4)$$

$$y_3 = 1445,71 - 293,28 t - 564,96 c^2 \quad (5)$$

$$y_4 = 1022,43 - 219,94 t - 370,65 c^2 \quad (6)$$

Tabela 2 – Matriz do DCCR para transesterificação de triacilgliceróis dos lipídios de pernil suíno assistida por micro-ondas

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes (mg/100g)			
	Tempo (min)	Conc. NaOH (%)	16:0	18:0	18:1n-9	18:2n-6
1	-1	-1	888,79	293,19	1487,63	1092,57
2	+1	-1	322,35	106,80	574,03	410,89
3	-1	+1	750,17	265,43	1339,73	943,95
4	+1	+1	207,83	70,59	368,14	257,97
5	-1,41	0	769,59	246,38	1264,80	934,16
6	+1,41	0	540,59	179,44	938,79	657,06
7	0	-1,41	237,87	44,70	333,55	398,33
8	0	+1,41	94,34	38,25	174,71	114,78
9	0	0	991,39	350,56	1771,59	1248,92
10	0	0	875,59	291,75	1491,59	1069,87
11	0	0	942,93	319,55	1638,50	1153,04

Considerando somente os termos significativos, a tabela 4 apresenta as análises de variância para a transesterificação dos triacilgliceróis. O coeficiente de determinação para todas as respostas foram 80,89 % para 16:0, 79,22 % para 18:0, 79,10 % para 18:1n-9 e 77,49 % para 18:2n-6.

Tabela 3 – Coeficientes de regressão do DCCR para os teores de ácidos graxos 16:0, 18:0, 18:1n-9 e 18:2n-6

	Ácidos graxos							
	16:0		18:0		18:1n-9		18:2n-6	
	Coeficiente	p-valor*	Coeficiente	p-valor*	Coeficiente	p-valor*	Coeficiente	p-valor*
Média	125,34	0,0008	36,60	0,0296	200,84	0,0030	151,54	0,0012
(1)Massa (L)	-24,36	0,0312	-5,85	0,2858	-43,16	0,0444	-30,84	0,0321
Massa (Q)	-6,66	0,5411	1,77	0,7555	-8,36	0,6890	-7,77	0,5756
(2)Volume (L)	17,01	0,1142	2,81	0,6010	28,91	0,1586	22,20	0,1067
Volume (Q)	-13,93	0,2132	-0,93	0,8689	-21,78	0,3066	-17,08	0,2298
(3)Tempo (L)	-1,10	0,9135	-6,86	0,2155	2,46	0,9000	2,15	0,8685
Tempo (Q)	-6,08	0,5762	9,16	0,1255	-12,15	0,5625	-8,97	0,5190
(4)Conc. NaOH (L)	-67,39	0,0000	-23,96	0,0006	-103,15	0,0001	-83,63	0,0000
Conc. NaOH (Q)	-1,35	0,9003	2,13	0,7079	-7,61	0,7154	-0,15	0,9910
1L,2L	7,87	0,5322	2,21	0,7360	6,65	0,7823	2,97	0,8520
1L,3L	-2,26	0,8562	-6,19	0,3537	-9,20	0,7029	-9,24	0,5641
1L,4L	19,66	0,1339	6,81	0,3095	37,17	0,1406	25,11	0,1333
2L,3L	-8,07	0,5219	-0,39	0,9516	-7,40	0,7587	-4,91	0,7580
2L,4L	-5,37	0,6685	-2,16	0,7414	-13,39	0,5802	-9,55	0,5514
3L,4L	-19,45	0,1378	1,48	0,8213	-38,60	0,1272	-27,71	0,1008

* Significância a $p < 0.1$

Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA) para os teores de ácidos graxos 16:0, 18:0, 18:1n-9 e 18:2n-6

Respostas	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal
16:0	Regressão	892041,51	2	446020,75	16,94
	Resíduos	210614,81	8	26326,85	
	Total	1102656,32	10		
18:0	Regressão	108237,47	2	54118,73	15,24
	Resíduos	28392,34	8	3549,04	
	Total	136629,81	10		
18:1n-9	Regressão	2661284,96	2	1330642,48	15,14
	Resíduos	703095,83	8	87886,97	
	Total	3364379,79	10		
18:2n-6	Regressão	1236301,23	2	618150,61	13,77
	Resíduos	359082,81	8	44885,35	
	Total	1595384,04	10		

$F_{2; 8; 0,1} = 3,11$

A partir da análise de variância (ANOVA), quatro superfícies de resposta foram geradas, que são apresentadas na figura 1. A análise de superfícies de todos os ácidos graxos estudados indicou tendência semelhante: foram obtidos os melhores teores dos ácidos graxos estudados com tempo de irradiação menor que 6 minutos e no intervalo de concentração de NaOH em metanol de 0,5 a 1,5 %.

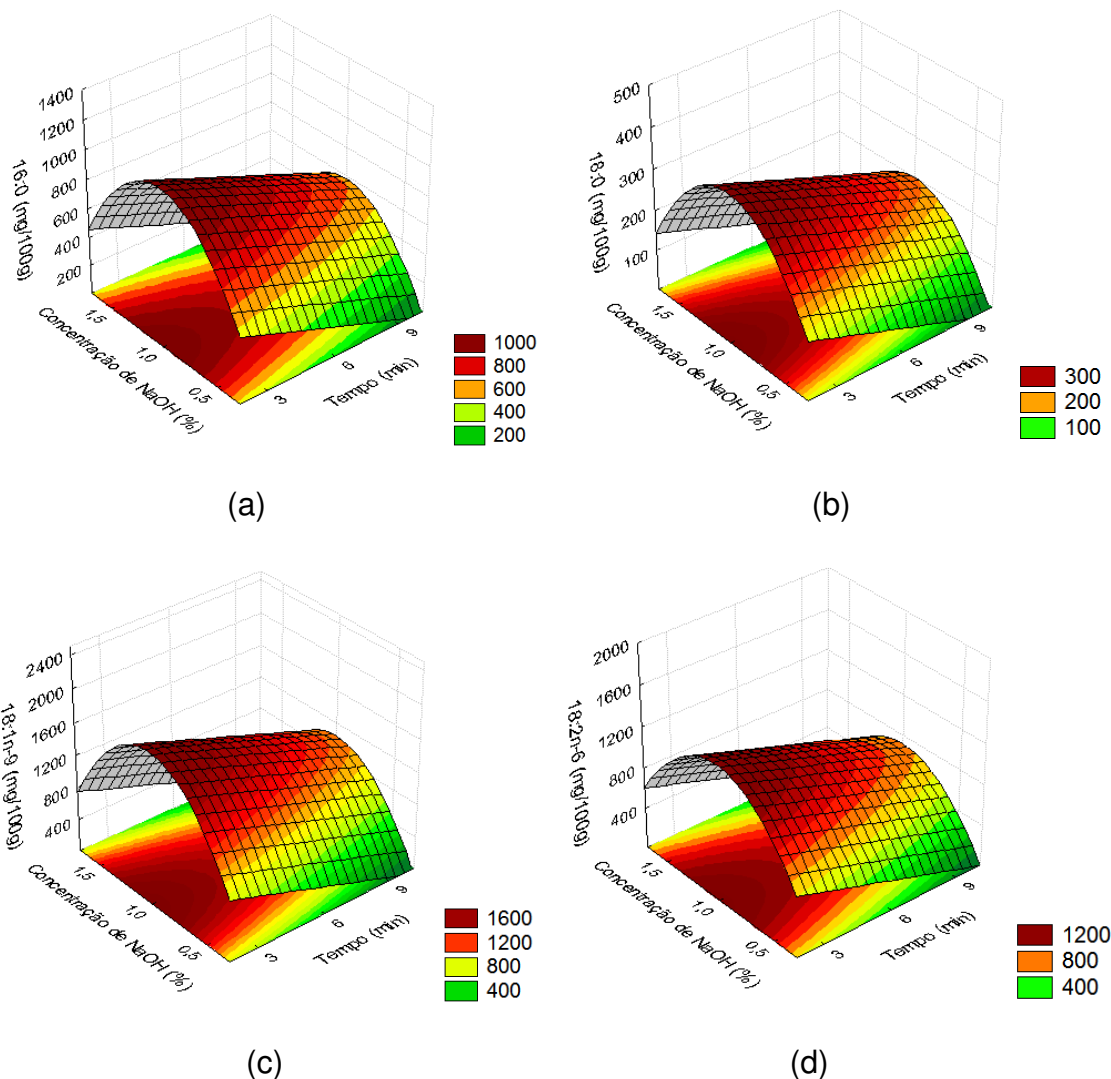


Figura 1 – Superfícies de resposta para a transesterificação dos ácidos graxos 16:0 (a), 18:0 (b), 18:1n-9 (c) e 18:2n-6 (d) de pernil suíno (mg/100g) assistida por micro-ondas em função da concentração de NaOH em metanol (%) e do tempo de irradiação (min)

O tempo de reação tem efeito significativo no teor dos ésteres metílicos de ácidos graxos. Em aquecimento convencional, o calor é transmitido para a reação através de convecção e condução, necessitando de longo tempo de reação. A irradiação de micro-ondas diminui a energia de ativação para que a reação

aconteça devido às moléculas polares e íons estarem continuamente se alterando em função do campo magnético (rotação polar e condução iônica). As mudanças no campo magnético causam rápida rotação das moléculas e aumentam o fluxo dos íons na solução, gerando calor devido à fricção (Lidström et al., 2001; Perreux & Loupy, 2001). As propriedades dielétricas do metanol (valores teóricos) como constante dielétrica (ϵ') e fator de dissipação (ϵ''), 32,6 e 21,4, respectivamente, indicam a forte absorção deste solvente quando submetido à energia de micro-ondas. Isso ocorre devido à presença do grupamento OH, fazendo com que seus dipolos reorientem-se rapidamente sob o efeito da irradiação, resultando em rápido aquecimento, acelerando a reação (Mingos, 2005; Gu et al., 2004). A umidade da amostra também auxilia na eficiência do aquecimento, e conseqüentemente, na reação, devido seu alto teor (72,85 g/100g). No presente estudo, o tempo de reação de até 6 minutos foi adequado para a completa transesterificação sobre o efeito das micro-ondas. Tempos acima de 6 minutos mostraram-se ineficientes e podem resultar em aquecimento prolongado da mistura reacional, com perda de ésteres metílicos de ácidos graxos e formação de subprodutos.

As superfícies de resposta mostram que com as concentrações entre 0,5 e 1,5 % obtêm-se maiores teores de ácidos graxos. Ao observar os ensaios individualmente (tabela 2), quando foram utilizadas concentrações maiores de 1 % de NaOH em metanol, e tempo superior a 6 minutos, foram obtidos baixos teores de ácidos graxos. Os teores próximos da esterificação de acordo com Joseph & Ackman (1992) foram alcançados ao utilizar baixa concentração de NaOH em

metanol e tempo próximo ao ponto central ou alta concentração de NaOH em metanol e curto tempo de reação.

A partir das análises realizadas, foram escolhidas as condições ótimas do processo de transesterificação assistida por micro-ondas, sendo realizada uma validação do método para comprovação, com os seguintes parâmetros: 5 mL da solução de NaOH (0,5 %) em metanol visando maior economia, combinada com tempo moderado de 5 minutos, além dos parâmetros fixos como a temperatura de 60 °C à 400 W, e 25 mg de lipídios. A validação foi realizada repetindo-se o processo nas condições mencionadas anteriormente (n=7 em triplicata), sendo os resultados (médias e desvio padrão, n=7) apresentados na tabela 5. Verifica-se que a condição otimizada da transesterificação assistida por micro-ondas não diferiu estatisticamente no teor de nenhum ácido graxo da amostra ao comparar com a esterificação segundo Joseph & Ackman (1992). Os ácidos graxos 8:0, 13:0, 15:1n-5, 18:2(9*t*,12*t*), 21:0, 22:0, 22:1n-9, 22:2n-6, 24:0 e 24:1n-9 não foram detectados na cromatografia gasosa em ambos métodos de esterificação. Na figura 2 é apresentado um cromatograma obtido por GC de ésteres metílicos de ácidos graxos de pernil suíno preparados através da reação de transesterificação assistida por micro-ondas.

Através dos resultados obtidos da validação pode-se afirmar que a transesterificação assistida por micro-ondas é exata, por não apresentar diferença estatística em nenhum teor de ácido graxo, e também precisa, já que os teores de todos os ácidos graxos apresentaram desvio padrão relativo menor que 12 %, sendo aceitável para a concentração estudada (Horwitz et al., 1980).

Tabela 5 – Teores de ácidos graxos (mg/100g) de pernil suíno obtidos pela transesterificação assistida por micro-ondas e segundo Joseph & Ackman (1992)

Ácidos graxos	Transesterificação assistida por micro-ondas	Esterificação segundo Joseph & Ackman (1992)
10:0	1,10 ± 0,09 ^a	1,02 ± 0,11 ^a
12:0	3,13 ± 0,33 ^a	3,33 ± 0,38 ^a
14:0	33,09 ± 0,84 ^a	34,27 ± 2,51 ^a
15:0	1,92 ± 0,19 ^a	1,52 ± 0,13 ^a
16:0	774,23 ± 65,26 ^a	791,91 ± 45,77 ^a
17:0	5,16 ± 0,36 ^a	5,11 ± 0,60 ^a
18:0	296,34 ± 10,17 ^a	304,28 ± 36,13 ^a
20:0	3,44 ± 0,32 ^a	3,90 ± 0,33 ^a
14:1n-5	0,42 ± 0,01 ^a	0,46 ± 0,03 ^a
16:1n-7	61,07 ± 1,56 ^a	61,97 ± 7,07 ^a
17:1n-7	7,22 ± 0,20 ^a	7,35 ± 0,81 ^a
18:1n-9 ^t	6,72 ± 0,55 ^a	6,33 ± 0,02 ^a
18:1n-9	1367,64 ± 91,99 ^a	1349,19 ± 113,91 ^a
18:2n-6	1088,17 ± 47,56 ^a	1148,17 ± 132,08 ^a
18:3n-6	1,75 ± 0,14 ^a	1,88 ± 0,03 ^a
18:3n-3	74,20 ± 6,50 ^a	72,20 ± 3,64 ^a
20:1n-9	14,15 ± 0,71 ^a	13,96 ± 0,33 ^a
20:2n-6	20,06 ± 1,32 ^a	19,01 ± 1,19 ^a
20:3n-6	5,07 ± 0,54 ^a	5,11 ± 0,58 ^a
20:3n-3	4,63 ± 0,55 ^a	4,36 ± 0,25 ^a
20:4n-6	42,65 ± 5,14 ^a	48,56 ± 1,28 ^a
20:5n-3	2,48 ± 0,29 ^a	2,72 ± 0,33 ^a
22:6n-3	4,33 ± 0,54 ^a	4,74 ± 0,05 ^a

Letras iguais na mesma linha não apresentam diferença estatística entre os métodos ($p < 0,1$).

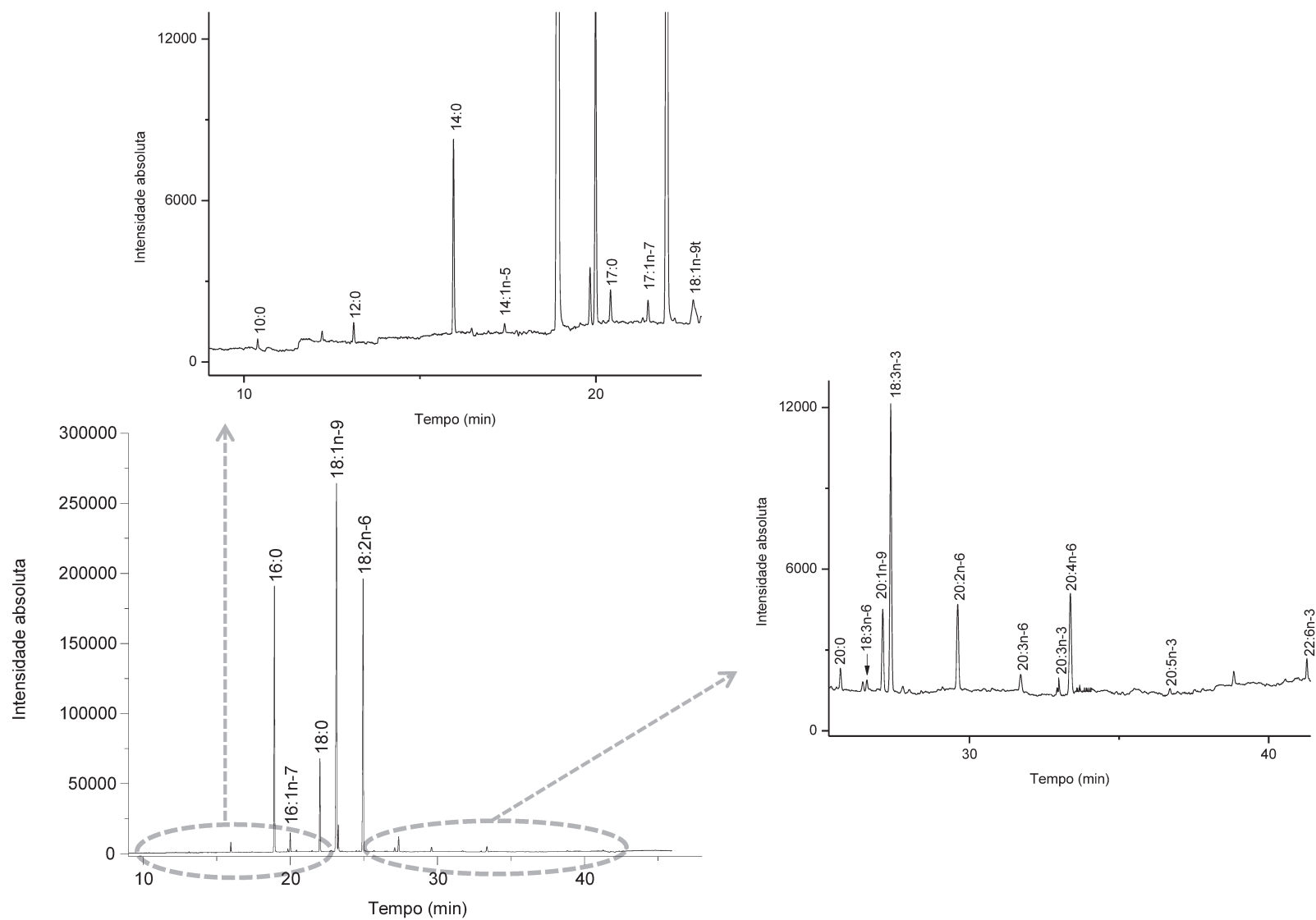


Figura 2 – Cromatograma obtido por GC de ésteres metílicos de ácidos graxos de pernil suíno preparados através da reação de transesterificação assistida por micro-ondas

3.2. Validação com material de referência certificado

Após a otimização e validação do preparo dos ésteres metílicos de ácidos graxos para análise por GC através do planejamento estatístico, foi realizada também a validação usando material de referência certificado de carnes homogeneizadas (SRM 1546, NIST) (n=3 em triplicata), cujos valores dos ácidos graxos são apresentados na tabela 12. Verifica-se que os teores de ácidos graxos encontrados pela transesterificação assistida por micro-ondas encontram-se dentro do intervalo apresentado pelo certificado do material de referência. Com isso pode-se afirmar que o método é exato e preciso.

Tabela 6 – Teores de ácidos graxos (mg/100g) do material de referência certificado (SRM 1546, NIST) obtidos através da transesterificação assistida por micro-ondas e os valores declarados no certificado do material de referência

Ácidos graxos	Transesterificação assistida por micro-ondas	Valor certificado (SRM 1546, NIST)
10:0	21,06 ± 1,56	21,11 ± 3,95
12:0	13,61 ± 0,97	16,41 ± 3,45
14:0	300,00 ± 19,98	312,34 ± 23,45
16:0	5647,82 ± 586,44	5629,62 ± 481,48
18:0	2566,77 ± 247,85	2679,01 ± 358,02
20:0	31,65 ± 0,68	38,88 ± 7,77
16:1n-7	799,75 ± 59,80	843,20 ± 81,48
18:1n-9	10050,12 ± 505,18	10123,45 ± 1185,18
18:2n-6	2179,83 ± 33,42	2419,75 ± 246,91
18:3n-3	189,60 ± 4,30	174,07 ± 43,20
20:1n-9	168,99 ± 19,34	192,59 ± 28,39
20:4n-6	41,77 ± 5,12	69,13 ± 30,86

4. Conclusão

O processo de transesterificação assistida por micro-ondas requer apenas 5 minutos à temperatura mais branda (60 °C) que o método convencional não necessitando do BF_3 , composto altamente tóxico, com tempo de vida limitado e de alto custo.

As micro-ondas provam ser adequadas para a transesterificação com metanol, permitindo conversão em ésteres de ácidos graxos com maior economia e em curto tempo. O procedimento representa um método limpo, prático, simples, econômico e menos agressivo ao meio ambiente, além de possuir alta eficiência na obtenção dos resultados.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela assistência financeira.

6. Referências

AOCS (1997). Official Method Ce 1b-89. In Firestone D (Ed). *Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society* (5th ed.). Champaign: American Oil Chemists' Society Press.

Azcan, N., & Danisman, A. (2007). Alkali catalyzed transesterification of cottonseed oil by microwave irradiation. *Fuel*, 86, 2639–2644.

Badiani, A., Stipa, S., Bitossi, F., Gatta, P.P., Vignola, G., & Chizzolini, R. (2002). Lipid composition, retention and oxidation in fresh and completely trimmed beef muscles as affected by common culinary practices. *Meat Science*, 60, 169–186.

De La Fuente, M.A., Luna, P., & Juárez, M. (2006). Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. *Trends in Analytical Chemistry*, 25(, 917-926.

Folch, J., Lees, M., & Stanley, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

Fulk, W. K., & Shorb, M. S. (1970). Production of an artifact during methanolysis of lipids by boron trifluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 11, 276-277.

Gu, C., Li, H., Gandhi, R.B., & Raghavan, K. (2004). Grouping solvents by statistical analysis of solvent property parameters: implication to polymorph screening International. *Journal of Pharmaceutics*, 283, 117–125.

Horwitz, W., Kamps, L. R., & Boyer, K. W. (1980). Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *Journal Of The Association Of Official Analytical Chemists*, 63, 1344-1354.

Jeyashoke, N., Krisnangkura, K., & Chen, S. (1998). Microwave induced rapid transmethylation of fatty acids for analysis of food oil. *Journal of Chromatography A*, 818, 133–137.

Joseph, J.D., & Ackman, R.G. (1992). Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 488-506.

Ledoux, M., Laloux, L., & Wolff, R. L. (2000). Analytical methods for determination of trans-C18 fatty acid isomers in milk fat – a review. *Analusis*, 28, 402-412.

Lidström, P., Tierney, J., Wathey, B., & Westman, J. (2001). Microwave assisted organic synthesis – a review. *Tetrahedron*, 57, 9225-9283.

Mazalli, M.R., & Bragagnolo, N. (2007). Validation of two methods for fatty acids analysis in eggs. *Lipids*, 42, 483–490.

Mingos, D.M.P. (2005). Theoretical aspects of microwave dielectric heating. In Tierney, J.P., & Lidström, P. (Eds.), *Microwave assisted organic synthesis* (pp 1-22). Boca Ratón: CRC Press.

Patil, P.D., Gude, V.G., Camacho, L.M., & Deng, S. (2010). Microwave-assisted catalytic transesterification of *Camelina sativa* oil. *Energy fuels*, 24, 1298–1304.

Perin, G., Ivaro, G.A., Westphal, E., Viana, L.H., Jacob, R.G., Lenardão, E.J., & D'Oca, M.G.M. (2008). Transesterification of castor oil assisted by microwave irradiation. *Fuel*, 87, 2838–2841.

Perreux, L., & Loupy, A. (2001). A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. *Tetrahedron*, 57, 9199-9223.

Sancho, R.A.S., Bragagnolo, N., Costa, G.G., Mariutti, L.R.B., & De Lima, F.A. (2011). Effect of annatto seed and coriander leaves as natural antioxidants in fish meatballs during frozen storage. *Journal of Food Science*, 76, 838-845.

Zara, R.F., Bonafé, E.G., Martin, C.A., Souza, N.E., Muniz, E.C., & Visentainer, J.V. (2012). Preparation of fame by microwave irradiation using boron trifluoride as a catalyst. *American Journal of Analytical Chemistry*, 3, 288-294.

CAPÍTULO IV

TRANSESTERIFICAÇÃO DIRETA DE TRIACILGLICERÓIS DE CARNE DE FRANGO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA GASOSA

Aline Lisbôa Medina, Neura Bragagnolo

Artigo em preparação a ser submetido para publicação no periódico

Food Chemistry

TRANSESTERIFICAÇÃO DIRETA DE TRIACILGLICERÓIS DE CARNE DE FRANGO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA GASOSA

Aline Lisbôa Medina^a, Neura Bragagnolo^a

^a Departamento de Ciência de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

Resumo

Esse estudo foi realizado visando a esterificação direta de triacilgliceróis de filé de frango assistida por micro-ondas sem o uso de trifluoreto de boro (BF_3) como catalizador. Foi utilizado um delineamento composto central rotacional para otimização do procedimento, avaliando as variáveis, massa da amostra, volume do solvente, tempo de irradiação e concentração de NaOH em metanol. O procedimento otimizado resultou em 300 mg de filé de frango, 5 mL de NaOH em metanol 0,5 % (m/v) e 35 minutos de irradiação, sendo validado comparando os resultados obtidos com o método que utiliza BF_3 com carne de frango e com o padrão de referência certificado de carnes homogeneizadas. Os resultados indicaram que o método de transesterificação assistida por micro-ondas apresenta precisão e exatidão, possibilitando a utilização da energia de micro-ondas para a transesterificação dos triacilgliceróis diretamente da amostra sem a utilização do reagente BF_3 , apresentando como vantagens rapidez, precisão e menor custo.

Palavras-chave: validação, catálise básica, delineamento composto central rotacional.

1. Introdução

O teor dos lipídios e a composição dos ácidos graxos em carnes contribuem em muitos atributos de qualidade e características nutricionais, o que desempenha papel importante nas decisões dos consumidores no momento da compra (Aaslyng et al., 2007). No entanto, o processamento desses alimentos acarreta alteração dos teores e na composição lipídica (Conchillo, Ansorena & Astiasarán, 2005; Alfaia et al., 2010; Sancho, Bragagnolo, Costa, Mariutti & De Lima 2011). Em vista disso, as análises quantitativas de lipídios e o estudo de ácidos graxos têm sido incorporados na rotina de muitos laboratórios, sendo que a cromatografia gasosa é uma das técnicas cromatográficas mais utilizada para a determinação do teor e da composição de ácidos graxos em diferentes amostras (Shantha, 1992; Mazalli & Bragagnolo, 2007; Alfaia et al., 2010).

A preparação da amostra para análise em cromatografia gasosa pode envolver diferentes métodos, sendo que os mais comuns são os procedimentos onde a extração dos lipídios é realizada primeiro e, após, a esterificação dos ácidos graxos para ésteres metílicos de ácidos graxos (Bannon, Craske, Hai, Harper & O'rourke, 1982; Joseph & Ackman, 1992). Entretanto, essa técnica leva tempo, é de alto custo em função da quantidade e do tipo dos reagentes envolvidos e pode levar a erros devido às múltiplas etapas envolvidas. Métodos que forneçam resultados mais rápidos, de menor custo e precisos são necessários para a análise de alimentos. Alguns autores utilizam métodos para a determinação de ácidos graxos através de transesterificação direta, que é realizada sem a etapa previa de extração para o isolamento dos lipídios, tendo sido reportada em amostras como plasma sanguíneo, ovos e produtos lácteos, apresentando boa

precisão e recuperação (Lepage & Roy, 1986; Wang, Sunwoo, Cherian & Sim, 2000; Golay, Dionisi, Hug, Giuffrida & Destailats, 2006).

O BF_3 é normalmente utilizado como catalizador para a esterificação de ácidos graxos na forma de complexo coordenado com metanol. De acordo estudos realizados por Lough (1964) e Fulk & Shorb (1970), o uso de alta concentração de BF_3 em metanol (50 % m/v) pode causar sérias perdas de ésteres metílicos de ácidos graxos através da formação de subprodutos. Além disso, é um reagente tóxico e de alto valor comercial (Lough, 1964; Ruiz Rodriguez, Reglero & Ibañez, 2010). Por outro lado, com BF_3 a reação é realizada em menor período de tempo e, em concentrações adequadas, fornece dados precisos (Morrison & Smith, 1964).

O uso da irradiação de micro-ondas como fonte de calor já é utilizado como alternativa útil em diferentes reações químicas (Marquez, Loupy, Calderon & Pérez, 2006; Yamashita, Mitsukura & Kobashi, 2010; Yadav, Reddy, Venugopal & Padmavani, 2004). Na literatura já foram reportados trabalhos onde a transesterificação é realizada com auxílio de micro-ondas. Por exemplo, Armstrong, Metherel & Stark (2008) transesterificaram os ácidos graxos de sangue humano utilizando a reação de catálise com ácido sulfúrico alcançando resultados satisfatórios e comparáveis ao método que utiliza BF_3 . Tomàs, Tor, Villorbina, Canela, Balcells & Eras (2009) obtiveram a derivatização completa dos ácidos graxos e sem alterações dos mesmos em carne utilizando micro-ondas através de reação com clorotrimetilsilano. Muitos autores utilizam aparelhos de micro-ondas domésticos para a realização desses processos (Jie & Yan-Kit, 1988; Banerjee, Dawson & Dasgupta, 1992; Armstrong, Metherel & Stark, 2008). Entretanto, essa

prática deve ser evitada devido à falta de controle da temperatura, de pressão e de segurança.

Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi desenvolver e validar um método de transesterificação direta de triacilgliceróis assistida por micro-ondas em carne de frango para análise em cromatografia gasosa. Para isso, foi realizado um delineamento central composto rotacional (2^4 com 2 pontos centrais) para determinar o ponto ótimo da transesterificação direta assistida por micro-ondas. Em seguida, foi realizada a validação através de comparação entre os resultados obtidos com o método desenvolvido e o método convencional utilizando amostras de filé de frango e de material de referência certificado de carnes homogeneizadas (SRM 1546, NIST, Gaithersburg, MD, USA).

2. Materiais e métodos

2.1 Amostras

A amostra de carne de filé de frango (600 g) foi adquirida no comércio de Campinas, SP. Após a retirada da gordura superficial, a amostra foi homogeneizada em multiprocessador (Philco) por 1 minuto até a obtenção de uma pasta homogênea. O material de referência de carnes homogeneizadas SRM 1546 foi obtido da NIST (Gaithersburg, MD, USA).

2.2 Reagentes

O complexo trifluoreto de boro em metanol 13-15 % (BF_3), a mistura de padrões contendo ésteres metílicos dos ácidos graxos de 4:0 a 24:0, os ésteres

metílicos dos ácidos undecanóico (99 % CG) e tricosanóico (99 % CG) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). O hexano grau cromatográfico HPLC foi adquirido da JT Baker (*Phillipsburg, NJ, USA*) e o clorofórmio, o metanol, o iso-octano, o hidróxido de sódio (NaOH) e o cloreto de sódio grau (NaCl), todos grau P.A. foram obtidos da marca Synth (Diadema, SP, Brasil).

2.3. Determinação de umidade

O teor de umidade foi determinado através do método da AOAC (1997).

2.4. Determinação dos ácidos graxos

2.4.1. Esterificação segundo Joseph & Ackman (1992)

A extração dos lipídios da amostra de filé de frango foi realizada através do método segundo Folch, Lees & Stanley (1957). Os ácidos graxos foram metilados de acordo com o método descrito por Joseph & Ackman (1992). Alíquotas de 25 mg de lipídio foram saponificadas com NaOH em metanol 2 % (m/v) sendo levada à banho de água em ebulição por 5 minutos. Após, foram adicionados 2 mL de BF₃ em metanol levando novamente ao banho de água em ebulição por 30 minutos. A amostra foi resfriada à temperatura ambiente sendo adicionados 5 mL de NaCl saturado (36 %, m/v) e 1 mL de iso-octano P.A. agitando-se em vortex por 30 segundos para a extração dos ésteres metílicos de ácidos graxos. A fase contendo iso-octano foi separada, sendo o processo repetido uma vez, e logo após foi evaporada sob fluxo de nitrogênio. Para a injeção no cromatógrafo gasoso, diluiu-se com 1 mL de hexano HPLC.

2.4.2. Transesterificação direta assistida por micro-ondas

A transesterificação direta assistida por micro-ondas foi realizada em sistema extrator de micro-ondas Start-E (Milestone, Sorisole, Itália). Os parâmetros do método (massa da amostra, volume de solvente, tempo de irradiação e concentração de NaOH em metanol) foram utilizados de acordo com o delineamento estatístico (item 2.5). Uma alíquota da amostra foi pesada nos tubos extratores de teflon, adicionada de hidróxido de sódio em metanol e, submetida à irradiação de micro-ondas a 60 °C com agitação magnética a 30 % e potência de 400 W. Após a irradiação a amostra foi resfriada em banho de gelo sendo transferida para um tubo de ensaio, adicionando-se 3 mL de água destilada e 1 mL de iso-octano. A mistura foi agitada em vortex por 30 segundos e centrifugada a 2500 *g* por 3 minutos a 10 °C para separação dos ésteres metílicos de ácidos graxos. A fase contendo iso-octano foi separada, sendo o processo de extração repetido mais uma vez, e logo após evaporada sob fluxo de nitrogênio. Para a injeção no cromatógrafo gasoso, diluiu-se o extrato seco com 1 mL de hexano HPLC.

2.4.3. Análise cromatográfica

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo gasoso (GC-2010, Shimadzu) equipado com detector de ionização em chama, injetor split (1/50) e coluna CP-SIL 88 (Chromopack, 100 m x 0,25 mm x 0,20 μ m). As condições cromatográficas foram: temperatura do detector a 260 °C, temperatura do injetor a 250 °C, temperatura inicial da coluna a 120 °C durante 8 minutos, aumentando 20 °C por minuto até 160 °C, aumentando 3 °C

por minuto até 195 °C, mantendo-se nesta temperatura por 10 minutos, aumentando 3 °C por minuto até 210 °C, aumentando 35 °C por minuto até 220 °C, mantendo-se nesta temperatura por 3 minutos, aumentando 20 °C por minuto até 240 °C, mantendo-se nesta temperatura por 5 minutos, totalizando 46 minutos (Sancho, Bragagnolo, Costa, Mariutti & De Lima 2011). O volume de injeção foi de 1 µL através da técnica *hot needle* por 5 segundos. O gás de arraste foi o hidrogênio com velocidade linear de 40 cm/s e o gás make up, nitrogênio a 30 mL/min

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos com os tempos de retenção de ésteres metílicos de ácidos graxos da amostra. A quantificação foi realizada por padronização interna, utilizando-se os ésteres metílicos dos ácidos graxos undecanóico e tricosanóico, sendo os ácidos graxos calculados em mg/100g de carne de filé de frango de acordo com o método da AOCS (1997).

2.5. Delineamento estatístico experimental

Para o estudo da transesterificação direta assistida por micro-ondas foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR), cujos parâmetros e seus níveis são apresentados na tabela 1. O DCCR foi um 2^4 com 3 pontos centrais, compreendendo 27 ensaios, realizados de maneira aleatória de acordo com o arranjo realizado pelo software Statística 7.0. Os teores dos ácidos graxos majoritários da amostra de filé de frango, ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1n-9) e ácido linoleico (18:2n-6), foram as respostas avaliadas no DCCR.

Tabela 1 – Parâmetros e valores utilizados no DCCR

	-2	-1	0	+1	+2
Massa da amostra (mg)	200	300	400	500	600
Volume de solvente (mL)	5	6	7	8	9
Tempo (minutos)	20	25	30	35	40
Concentração de NaOH em metanol (%)	0,1	0,5	1,0	1,5	1,9

2.6. Validação da transesterificação assistida por micro-ondas

A validação do método de transesterificação direta de triacilgliceróis assistida por micro-ondas foi realizada através da comparação entre os resultados obtidos com o método otimizado e com os resultados obtidos com o método proposto por Joseph & Ackman (1992) utilizando amostras de filé de frango e de material de referência certificado de carnes homogeneizadas (SRM 1546). Os resultados obtidos foram avaliados estatisticamente quanto à precisão e exatidão.

2.7. Análise estatística

O planejamento estatístico e a análise estatística dos dados foram realizados utilizando o software Statistica 7.0. Os resultados obtidos e as médias foram comparados pelo teste de Tukey ($p < 0,1$).

3. Resultados e discussões

Os teores de ácidos graxos obtidos pelo método de Joseph e Ackman foram de 310,80, 112,95, 571,44 e 432,54 mg/100g para 16:0, 18:0, 18:1n-9 e 18:2n-6, respectivamente, sendo que o ensaio cujos valores mais se aproximaram

do método convencional foi o ensaio 7. A matriz com os ensaios e os respectivos resultados obtidos através do DCCR está apresentada na tabela 2. O desvio padrão relativo dos pontos centrais foram abaixo de 10 %, o que indica a boa repetibilidade do método. O teor de umidade da amostra foi de 75,14 g/100g, indicando que a mesma pode absorver a energia de micro-ondas e assim, aumentar a eficiência durante a reação de transesterificação.

Os resultados dos coeficientes de regressão são apresentados na tabela 3. A análise estatística indicou que de acordo com as respostas dos ácidos graxos 16:0, 18:1n-9 e 18:2n-6, os parâmetros significativos foram a massa da amostra (m) e a concentração de NaOH (c). Para o teor do ácido graxo 18:0 a única variável significativa foi a concentração de NaOH. Os modelos para cada resposta (16:0, 18:0, 18:1n-9 e 18:2n-6) são apresentados pelas respectivas equações 1, 2, 3 e 4. Em todos os casos, quanto menor a concentração de NaOH, maiores foram os teores dos ácidos graxos obtidos, e quando a massa foi significativa, obteve-se maiores teores dos ácidos graxos ao utilizar menores massas. Com os dados obtidos foi realizada a análise de variância (ANOVA), resultando em 3 superfícies de resposta (figura 1).

$$y_1 = 100,41 - 24,36m - 67,39c \quad (1)$$

$$y_2 = 47,38 - 23,96c \quad (2)$$

$$y_3 = 156,47 - 43,16m - 103,15c \quad (3)$$

$$y_4 = 121,33 - 30,84m - 83,63c \quad (4)$$

Tabela 2 – Matriz do delineamento composto central rotacional (DCCR) utilizada para a transesterificação direta de triacilgliceróis em carne de frango assistida por micro-ondas e as respostas observadas

Ensaio	Variáveis				Respostas (ácidos graxos em mg/100g)			
	Massa	Volume	Tempo	NaOH	16:0	18:0	18:1n-9	18:2n-6
1	-1	-1	-1	-1	203,43	103,63	309,42	225,59
2	+1	-1	-1	-1	41,72	66,61	55,42	66,82
3	-1	+1	-1	-1	179,18	80,30	274,12	206,67
4	+1	+1	-1	-1	208,98	100,27	312,12	241,45
5	-1	-1	+1	-1	245,46	95,16	389,18	291,96
6	+1	-1	+1	-1	158,51	61,18	245,81	185,93
7	-1	+1	+1	-1	303,60	115,63	562,62	423,41
8	+1	+1	+1	-1	151,20	61,66	236,39	179,66
9	-1	-1	-1	+1	30,82	10,37	46,89	33,73
10	+1	-1	-1	+1	17,07	39,50	26,58	20,44
11	-1	+1	-1	+1	85,23	34,81	133,95	101,91
12	+1	+1	-1	+1	35,09	21,84	55,64	40,31
13	-1	-1	+1	+1	18,97	43,99	30,23	22,65
14	+1	-1	+1	+1	4,51	17,66	6,41	4,09
15	-1	+1	+1	+1	18,57	18,59	30,05	22,60
16	+1	+1	+1	+1	40,36	32,83	61,62	44,08
17	-2	0	0	0	114,68	38,09	187,06	140,31
18	2	0	0	0	36,18	18,23	57,29	43,01
19	0	-2	0	0	19,68	7,37	34,13	23,39
20	0	2	0	0	73,05	27,26	102,84	85,41
21	0	0	-2	0	119,31	96,23	179,29	133,30
22	0	0	2	0	36,18	19,22	34,79	40,41
23	0	0	0	-2	190,69	57,16	245,66	241,00
24	0	0	0	2	2,66	2,05	4,69	3,25
25	0	0	0	0	133,90	39,77	216,88	163,43
26	0	0	0	0	121,77	32,27	193,95	146,45
27	0	0	0	0	120,35	37,75	191,7	144,75

Tabela 3 – Coeficientes de regressão do DCCR para os teores de ácidos graxos 16:0, 18:0, 18:1n-9 e 18:2n-6

	Ácidos graxos							
	16:0		18:0		18:1n-9		18:2n-6	
	Coeficiente	p-valor*	Coeficiente	p-valor*	Coeficiente	p-valor*	Coeficiente	p-valor*
Média	125,34	0,0008	36,60	0,0296	200,84	0,0030	151,54	0,0012
(1)Massa (L)	-24,36	0,0312	-5,85	0,2858	-43,16	0,0444	-30,84	0,0321
Massa (Q)	-6,66	0,5411	1,77	0,7555	-8,36	0,6890	-7,77	0,5756
(2)Volume (L)	17,01	0,1142	2,81	0,6010	28,91	0,1586	22,20	0,1067
Volume (Q)	-13,93	0,2132	-0,93	0,8689	-21,78	0,3066	-17,08	0,2298
(3)Tempo (L)	-1,10	0,9135	-6,86	0,2155	2,46	0,9000	2,15	0,8685
Tempo (Q)	-6,08	0,5762	9,16	0,1255	-12,15	0,5625	-8,97	0,5190
(4)Conc. NaOH (L)	-67,39	0,0000	-23,96	0,0006	-103,15	0,0001	-83,63	0,0000
Conc. NaOH (Q)	-1,35	0,9003	2,13	0,7079	-7,61	0,7154	-0,15	0,9910
1L,2L	7,87	0,5322	2,21	0,7360	6,65	0,7823	2,97	0,8520
1L,3L	-2,26	0,8562	-6,19	0,3537	-9,20	0,7029	-9,24	0,5641
1L,4L	19,66	0,1339	6,81	0,3095	37,17	0,1406	25,11	0,1333
2L,3L	-8,07	0,5219	-0,39	0,9516	-7,40	0,7587	-4,91	0,7580
2L,4L	-5,37	0,6685	-2,16	0,7414	-13,39	0,5802	-9,55	0,5514
3L,4L	-19,45	0,1378	1,48	0,8213	-38,60	0,1272	-27,71	0,1008

* Significância a $p < 0.1$

Tabela 4 – Análise de variância (ANOVA) para os teores de ácidos graxos 16:0, 18:0, 18:1n-9 e 18:2n-6

Resposta	Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Fcal
16:0	Regressão	123261,10	2	61630,55	26,77
	Resíduos	55238,57	24	2301,60	
	Total	178499,67	26		
18:0	Regressão	13779,06	1	13779,06	24,96
	Resíduos	13797,89	25	551,91	
	Total	27576,95	26		
18:1n-9	Regressão	140339,14	2	70169,57	8,89
	Resíduos	189270,53	24	7886,27	
	Total	489361,39	26		
18:2n-6	Regressão	190699,96	2	95349,98	24,85
	Resíduos	92065,23	24	3836,05	
	Total	282765,19	26		
F _{2; 24; 0,1} = 2,54; F _{1; 25; 0,1} = 2,92					

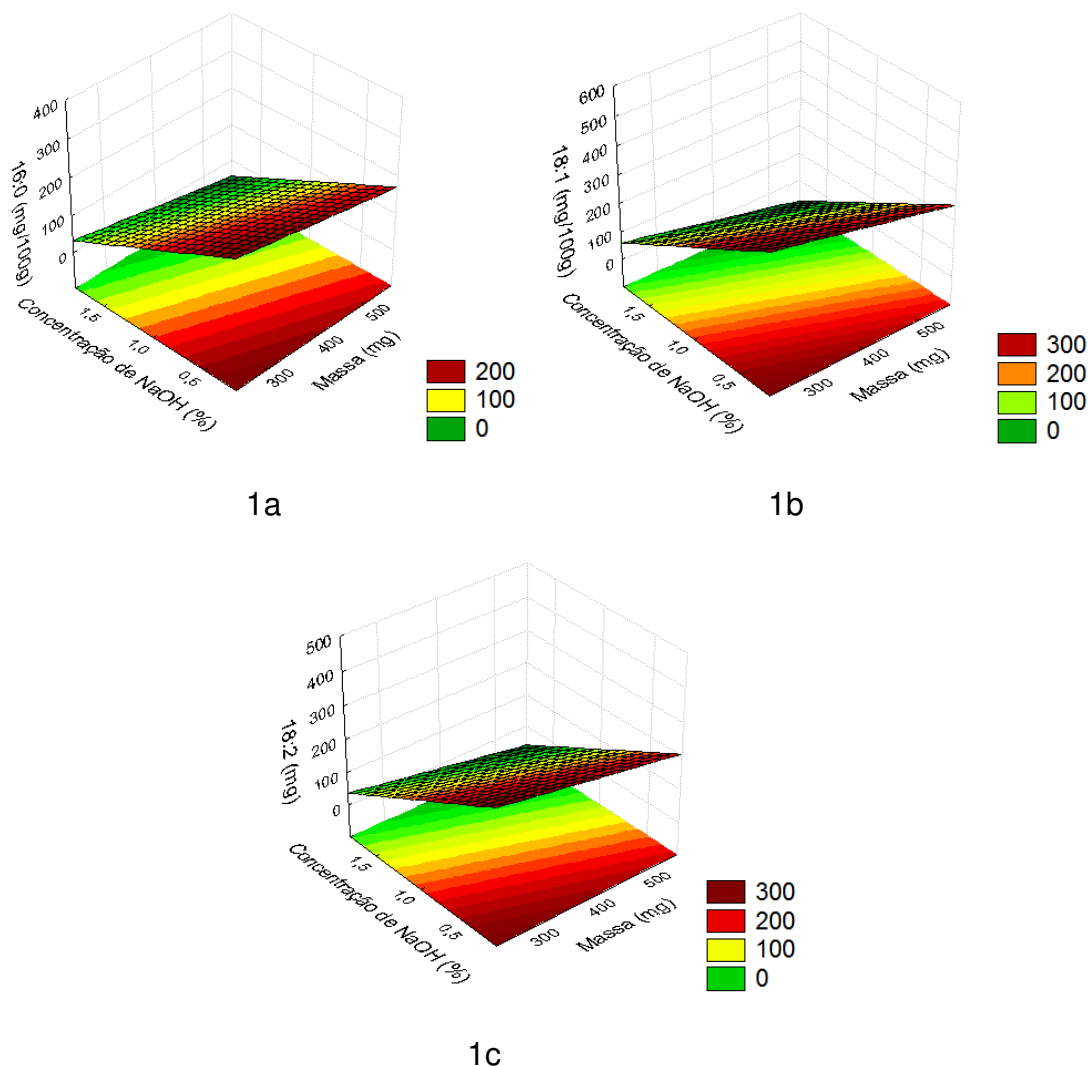


Figura 1 – Superfícies de resposta obtida para a transesterificação de triacilgliceróis em carne de frango assistida por micro-ondas (g/100g) em função da massa da amostra e da concentração de NaOH para os ácidos graxos 16:0 (a), 18:1n-9 (b) e 18:2n-6 (c).

As superfícies de resposta indicaram que quanto menor a massa maior o teor de ácidos graxos quantificados. A menor massa possibilita a transesterificação completa com as condições utilizadas, indicando que o solvente com o catalizador consegue penetrar na matriz, extraíndo e esterificando os

compostos eficientemente, diferente do que aconteceu com ensaios utilizando massas maiores, que não foram alcançados valores de ácidos graxos comparáveis aos do método convencional.

A possibilidade de eliminar o uso do trifluoreto de boro na transesterificação assistida por micro-ondas traz como vantagens não somente a reação com menor possibilidade de interferentes, mas também maior economia e diminuição do uso de reagentes tóxicos. A concentração de NaOH deve ser suficiente para completar a reação, porém evitando-se o excesso, já que a partir de determinadas concentrações os teores de ésteres metílicos de ácidos graxos começam a diminuir, possivelmente devido a reações de saponificação, que são irreversíveis e não permitem a esterificação completa (Hsiao, Lin, Chang & Chen, 2010). As superfícies de resposta mostram que quanto menor a concentração de NaOH, melhores foram os resultados. Assim, foi selecionada a concentração de 0,5 % para a otimização.

A quantidade de metanol adicionada à mistura reacional deve ser em excesso para manter o equilíbrio da reação para a formação dos ésteres metílicos de ácidos graxos. Embora o volume não tenha se apresentado significativo nas superfícies de resposta, o valor utilizado para a transesterificação foi de 8 mL, pois com essa quantidade obtêm-se maiores valores dos ácidos graxos minoritários da amostra. O metanol atua como solvente extrator e também como reagente para a transesterificação de ésteres (Mulbry, Kondrad, Buyer & Luthria, 2009). Em função de suas características dielétricas, o metanol é bom absorvedor da radiação de micro-ondas, sendo que a mesma causa destruição da estrutura

celular facilitando a extração do lipídio pelo metanol, permitindo a reação de transesterificação (Mandal, Mohan & Hemalatha, 2007).

Geralmente, ao aumentar o tempo reacional, aumenta-se também o rendimento da reação. Na transesterificação assistida por micro-ondas, o parâmetro tempo apresentou comportamento semelhante ao volume, uma vez que os melhores resultados obtidos de ácidos graxos minoritários foram com 35 minutos do que utilizando um menor tempo.

A partir dos resultados obtidos pelo DCCR, foram selecionadas as condições ótimas do processo, 300 mg de amostra, 8 mL de NaOH em metanol a 0,5 % (m/v) e 35 minutos, realizando-se então a validação do método. Os teores dos ácidos graxos da validação são apresentados na tabela 5, e foram obtidos através da dispersão dos resultados entre 6 replicatas da transesterificação dos triacilgliceróis de carne de frango, onde o coeficiente de variação para todos os ácidos graxos manteve-se menor que 12 %, aceitável no nível de concentração estudado (Horwitz, Kamps & Boyer, 1980). Com exceção do ácido graxo 17:1n-7, todos os outros ácidos graxos não diferiram estatisticamente. Os ácidos graxos 8:0, 10:0, 13:0, 15:1n-5, 18:2n-6(9*t*,12*t*), 21:0, 22:2n-6 e 24:0 não foram detectados na cromatografia gasosa em ambos métodos. Na figura 2 é apresentado um cromatograma de ésteres metílicos de ácidos graxos de filé de frango obtidos com a transesterificação assistida por micro-ondas.

Tabela 5 – Teores de ácidos graxos (mg/100g) de filé de frango obtidos pela transesterificação direta assistida por micro-ondas e segundo o método de Joseph e Ackman (1992).

Ácidos graxos	MAE	Joseph e Ackman (1992).
12:0	4,56 ± 0,39 ^a	4,57 ± 0,33 ^a
14:0	9,68 ± 1,07 ^a	9,60 ± 0,93 ^a
15:0	1,52 ± 0,02 ^a	1,63 ± 0,04 ^a
16:0	316,01 ± 37,08 ^a	310,80 ± 19,08 ^a
17:0	2,74 ± 0,21 ^a	2,75 ± 0,18 ^a
18:0	113,41 ± 10,49 ^a	112,95 ± 5,55 ^a
20:0	1,26 ± 0,10 ^a	1,38 ± 0,12 ^a
22:0	0,44 ± 0,04 ^a	0,57 ± 0,06 ^a
14:1n-5	2,00 ± 0,16 ^a	2,17 ± 0,05 ^a
16:1n-7	72,26 ± 4,30 ^a	73,64 ± 6,69 ^a
17:1n-7	1,43 ± 0,08 ^a	7,84 ± 0,12 ^b
18:1n-9 ^t	2,53 ± 0,15 ^a	2,76 ± 0,22 ^a
18:1n-9	562,68 ± 24,05 ^a	571,44 ± 35,16 ^a
18:2n-6	429,89 ± 15,62 ^a	432,54 ± 29,43 ^a
18:3n-6	2,68 ± 0,19 ^a	3,01 ± 0,09 ^a
18:3n-3	23,22 ± 1,79 ^a	23,16 ± 2,44 ^a
20:1n-9	3,60 ± 0,34 ^a	3,95 ± 0,05 ^a
20:2n-6	7,14 ± 0,69 ^a	7,02 ± 0,59 ^a
20:3n-6	9,07 ± 0,63 ^a	9,00 ± 0,54 ^a
20:3n-3	0,61 ± 0,08 ^a	0,57 ± 0,02 ^a
20:4n-6	62,19 ± 7,22 ^a	62,27 ± 3,44 ^a
20:5n-3	2,68 ± 0,34 ^a	2,84 ± 0,02 ^a
22:1n-9	0,60 ± 0,07 ^a	0,56 ± 0,04 ^a
22:6n-3	3,60 ± 0,30 ^a	3,58 ± 0,07 ^a
24:1n-9	0,46 ± 0,01 ^a	0,62 ± 0,02 ^a

Letras iguais na mesma linha não apresentam diferença estatística entre os métodos ($p < 0,1$).

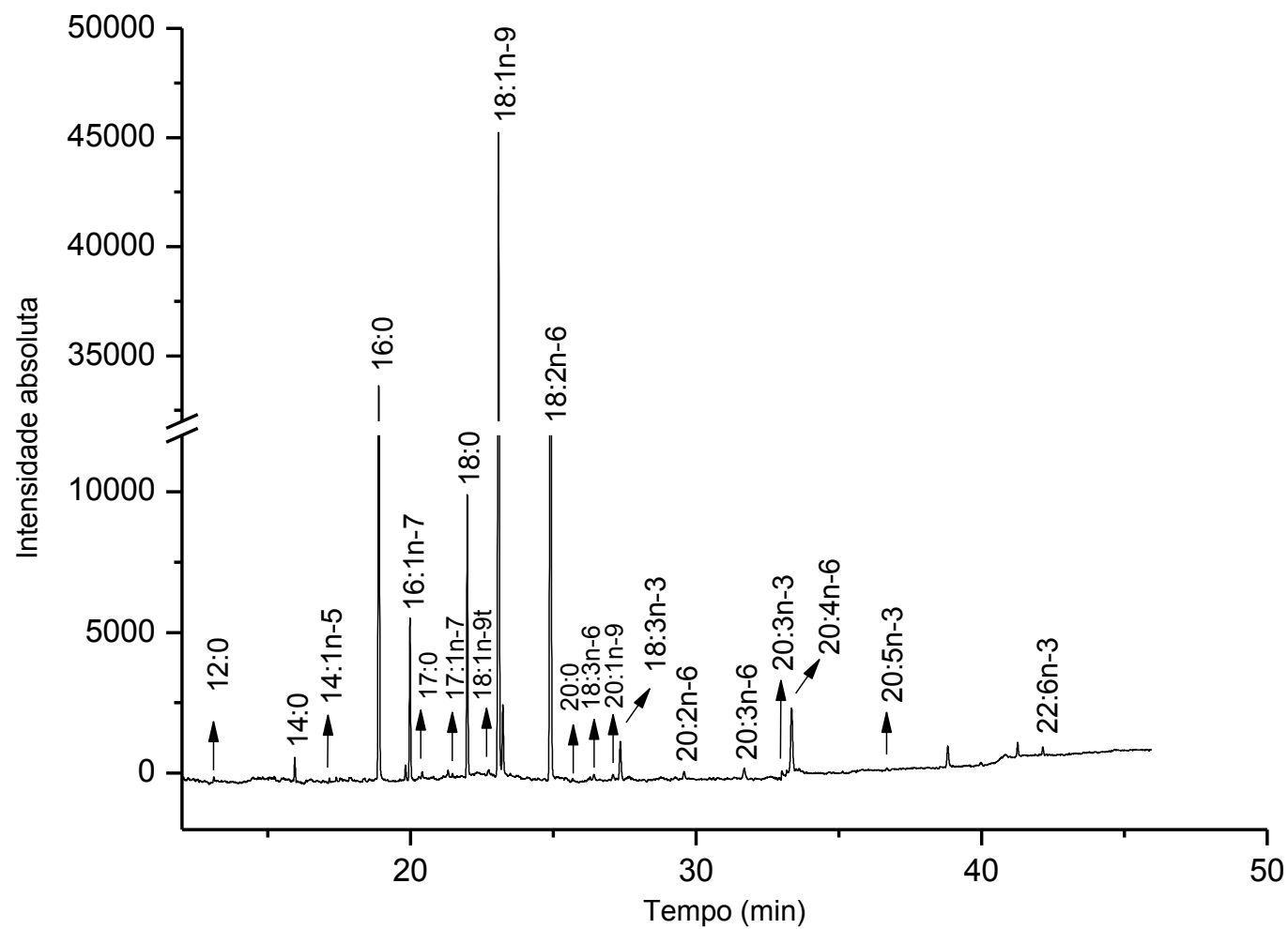


Figura 2 – Cromatograma de ésteres metílicos de ácidos graxos de filé de frango obtidos pelo método de transesterificação direta assistida por micro-ondas

Os resultados da validação utilizando o material de referência certificado de carnes homogeneizadas (SRM 1546) são apresentados na tabela 6. Comparando os teores de ácidos graxos obtidos pelo método da transesterificação assistida por micro-ondas com os valores apresentados pelo certificado, observa-se que os teores obtidos encontram-se no intervalo do valor certificado. Os resultados obtidos das validações indicam que o método de transesterificação assistida por micro-ondas é preciso e exato, alcançando valores comparáveis ao método convencional com a vantagem de eliminar a etapa da extração dos lipídios.

Tabela 6 – Teores de ácidos graxos (mg/100g) do material de referência certificado (SRM 1546, NIST) obtidos pelo método da transesterificação assistida por micro-ondas e o valor declarado no certificado do material de referência (SRM 1546, NIST).

Ácidos graxos	Transesterificação assistida por micro-ondas	SRM 1546
10:0	17,73 ± 1,79	17,10 ± 3,20
12:0	15,12 ± 1,48	13,30 ± 2,80
14:0	265,65 ± 12,74	253,00 ± 19,00
16:0	4682,03 ± 451,83	4560,00 ± 390,00
18:0	2359,68 ± 119,12	2170,00 ± 290,00
20:0	29,56 ± 3,08	31,50 ± 6,30
16:1n-7	718,25 ± 23,36	683,00 ± 66,00
18:1n-9	8150,80 ± 841,54	8200 ± 960,00
18:2n-6	2113,03 ± 52,44	1960 ± 200,00
18:3n-3	110,17 ± 0,45	141,00 ± 35,00
20:1n-9	139,56 ± 13,00	156,00 ± 23,00
20:4n-6	41,32 ± 2,71	56,00 ± 25,00

4. Conclusão

Nesse estudo, foi possível realizar a análise de ácidos graxos de carne de frango sem a extração prévia dos lipídios ou qualquer outro preparo da amostra que não fosse a homogeneização. A técnica de transesterificação direta assistida por micro-ondas para análise dos ácidos graxos em carne de frango resultou em teores de ácidos graxos estatisticamente iguais aos obtidos pelo método proposta por Joseph & Ackman (1992).

Ao comparar com o método convencional, a transesterificação assistida por micro-ondas necessita de menor número de etapas e menos reagentes. O método proposto pode ser utilizado para análises de rotina devido sua facilidade, segurança, simplicidade e por ser menos agressivo ao meio ambiente e à saúde do que o método convencional, apresentando alta precisão e exatidão.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela assistência financeira.

6. Referências

Aaslyng, M.D., Oksama, M., Olsen, E.V., Bejerholm, C., Baltzer, M., Andersen, G., Bredie, W.L.P., Byrne, D.V., & Gabrielsen, G. (2007). The impact of sensory quality of pork on consumer preference. *Meat Science*, 76, 61–73.

Alfaia, C.M.M., Alves, S.P., Lopes, A.F., Fernandes, M.J.E., Costa, A.S.H., Fontes, C.M.G.A., Castro, M.L.F., Bessa, R.J.B., & Prates, J.A.M. (2010). Effect of cooking

methods on fatty acids, conjugated isomers of linoleic acid and nutritional quality of beef intramuscular fat. *Meat Science*, 84, 769–777.

AOAC (1997). Association of Official Analytical Chemists. Official methods of the analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16. ed. Washington: AOAC.

AOCS (1997). Official Method Ce 1b-89. In Firestone D (Ed). *Official methods and recommended practices of the American oil chemists' society* (5th ed.). Champaign: American Oil Chemists' Society Press.

Armstrong, J.M., Metherel, A.H., & Stark, K.D. (2008). Direct microwave transesterification of fingertip prick blood samples for fatty acid determinations. *Lipids*, 43, 187–196.

Banerjee, P., Dawson, G., & Dasgupta, A. (1992). Enrichment of saturated fatty acid containing phospholipids in sheep brain serotonin receptor preparations: use of microwave irradiation for rapid transesterification of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1110, 65–74.

Bannon, C.D., Craske, J.D., Hai, N.T., Harper, N.L., & O'rourke, K.L. (1982). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. *Journal of Chromatography*, 217, 63-69.

Conchillo, A., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2005). Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 141–146.

Folch, J., Lees, M., & Stanley, S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-509.

Fulk, W.K., & Shorb, M.S. (1970). Production of an artifact during methanolysis of lipids by boron trifluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 11, 276-277.

Golay, P., Dionisi, F., Hug, B., Giuffrida, F., & Destailats, F. (2006). Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on *trans* fatty acid content. *Food Chemistry*, 101, 1115–1120.

Horwitz, W., Kamps, L. R., & Boyer, K. W. (1980). Quality assurance in the analysis of foods for trace constituents. *Journal Of The Association Of Official Analytical Chemists*, 63, 1344.

Hsiao, M., Lin, C., Chang, Y., & Chen, L. (2010). Ultrasonic mixing and closed microwave irradiation-assisted transesterification of soybean oil. *Fuel*, 89, 3618–3622.

Jie, M.S.F.L.K., Yan-Kit, C. (1988). The use of a microwave oven in the chemical transformation of long chain fatty acid esters. *Lipids*, 23(4), 367-369.

Joseph, J.D., & Ackman, R.G. (1992). Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 488-506.

Lepage, G., & Roy, C.C. (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research*, 27, 114-120.

Lough, A.K. (1964). The production of methoxy-substituted fatty acids as artefacts during the esterification of unsaturated fatty acids with methanol containing boron trifluoride. *Biochemical Journal*, 90, 4c-5c.

Mandal, V., Mohan, Y., & Hemalatha, S. (2007). Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research. *Pharmacognosy Reviews*, 1, 7-18.

Marquez, H., Loupy, A., Calderon, O., & Pérez, E.R. (2006). An eco-friendly protocol for synthesis of thiourea derivatives: 1-benzoyl-3-benzylguanidine and 1-benzoyl-3-benzyl-*O*-ethylisourea. A possible non-purely thermal microwave-assisted reaction. *Tetrahedron*, 62, 11, 2616-2621.

Mazalli, M.R., & Bragagnolo, N. (2007). Validation of Two Methods for Fatty Acids Analysis in Eggs. *Lipids*, 42, 483–490.

Morrison, W.R., & Smith, L.M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 5, 600-608.

Mulbry, W., Kondrad, S., Buyer, J., & Luthria, D. (2009). Optimization of an oil extraction process for algae from the treatment of manure effluent. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 86, 909–915.

Ruiz-Rodriguez, A., Reglero, G., & Ibañez, E. (2010). Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 305–326.

Sancho, R.A.S., Bragagnolo, N., Costa, G.G., Mariutti, L.R.B., & De Lima, F.A. (2011). Effect of annatto seed and coriander leaves as natural antioxidants in fish meatballs during frozen storage. *Journal of Food Science*, 76, 838-845.

Shantha, N.C. (1992) Gas chromatography of fatty acids. *Journal of Chromatography*, 624, 37-51.

Tomàs, A., Tor, M., Villorbina, G., Canela, R., Balcells, M., & Eras, J. (2009). A rapid and reliable direct method for quantifying meat acylglycerides with

monomode microwave irradiation. *Journal of Chromatography A*, 1216, 3290–3295.

Wang, Y., Sunwoo, H., Cherian, G., & Sim, J.S. (2000). Fatty Acid Determination in Chicken Egg Yolk: A Comparison of Different Methods. *Poultry Science*, 79, 1168–1171.

Yadav, J.S., Reddy, B.V.S., Venugopal, C., & Padmavani, B. (2004). In Cl_3/SiO_2 -catalyzed α -amination of 1,3-dicarbonyl compounds under microwave irradiation. *Tetrahedron Letters*, 45, 7507-7509.

Yamashita, H., Mitsukura, Y., & Kobashi, H. (2010). Microwave-assisted acylation of aromatic compounds using carboxylic acids and zeolite catalysts. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 327 80-86.

CONCLUSÃO GERAL

Com a aplicação do método de superfícies de resposta, foi possível desenvolver o método de extração de lipídios assistida por micro-ondas, aplicável em amostras cárneas (carnes de frango, bovina e suína). O método de extração desenvolvido não acarretou em modificações no teor de ácidos graxos nem houve formação de produtos da oxidação lipídica, quando comparado com o método convencional. As condições ótimas do processo foram determinadas e posteriormente validadas: 300 mg de amostra, 54 °C e 15 minutos, utilizando apenas 5 mL de solvente extrator. Através da comparação com o método de Folch et al. (1957) e pelo uso de material de referência certificado, o método demonstrou-se preciso, exato e robusto, com menor consumo de solvente, utilização de menos amostra e redução do tempo de análise, reduzindo custos da análise e tornando-a menos laboriosa.

Também foi possível o desenvolvimento de métodos de transesterificação de ácidos graxos assistida por micro-ondas para a análise em cromatografia gasosa. O método de transesterificação de lipídios necessita de apenas 5 minutos de irradiação a 60 °C com hidróxido de sódio em metanol a 0,5 %. Já no método de transesterificação direta assistida por micro-ondas, não demanda a extração prévia dos lipídios da amostra, sendo necessários 30 minutos de irradiação a 60 °C com hidróxido de sódio em metanol a 0,5 %.

Evidencia-se com esse estudo, a eficiência de diferentes métodos de análise em laboratório com o uso da energia de micro-ondas. Os métodos desenvolvidos não apenas melhoram a eficiência dos processos, mas também

facilitam o trabalho de rotina, reduzindo os custos de análises em laboratório, já que há uma redução significativa do uso de solventes e de reagentes utilizados nos métodos convencionais.