

Artigo

Comparação entre Métodos de Metilação na Determinação de Ácidos Graxos em Amostras de Carne por CG-DIC

Ferreira, C. S. R.; Santos, P. D. S.; Sinosaki, N. B. M.; Senes, C. E. R.; J. Visentainer, V.; Santosa, O. O.*

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (6), 0000-0000. Data de publicação na Web: 7 de Outubro de 2020

<http://rvq.s bq.org.br>

Comparison of Methylation Methods for the Determination of Fatty Acids in Meat by GC-FID

Abstract: In this work, the methylation method proposed by Hartman & Lago (1973), Figueiredo *et al.* (2016) (direct methylation) and International Organization for Standardization (ISO 5509, 1978) were evaluated in four different meat varieties (beef, pork, chicken and fish), comparing the results obtained by gas chromatography (GC) for verify the methylation method that presents the highest efficiency in this type of matrix. For all samples, the sum of fatty acids (SFA) was greater when applying direct methylation method, developed by Figueiredo *et al.*, with values obtained of 111.50, 44.39, 31.50, 62.01 mg of FA per gram of sample respectively for meat samples beef, pork, chicken and fish. Direct methylation developed by Figueiredo *et al.*, in addition to resulting in greater efficiency in the methylation of FA in meat samples, has several advantages when compared to other methods such as the use of smaller amounts of sample and solvents, less time to perform the analysis and less errors involved in the process, since methylation is carried out directly on the sample and does not require a lipid extraction process for subsequent methylation step.


Keywords: Lipids; direct methylation; ultrasound; gas chromatography.

Resumo

Neste trabalho foram avaliados os métodos de metilação propostos por Hartman & Lago (1973), Figueiredo *et al.* (2016) (metilação direta) e Organização Internacional para padronização (ISO 5509, 1978) aplicados em quatro variedades distintas de carnes (bovina, suína, frango e peixe), comparando-se os resultados de somatório de ácidos graxos totais (Σ AG) obtidos por cromatografia em fase gasosa (CG) para verificar o método de metilação mais apropriado para este tipo de amostra. Para todas as amostras o somatório de ácidos graxos foi maior quando aplicado o método de metilação desenvolvido por Figueiredo *et al.*, sendo os valores obtidos de 111,50, 44,39, 31,50, 62,01 mg de AG por grama de amostra respectivamente para as amostras de carne bovina, suína, frango e peixe. A metilação direta desenvolvida por Figueiredo *et al.*, além de resultar em maior eficiência na metilação dos AG nas amostras de carne, apresenta várias vantagens quando comparada com as demais metodologias como, emprego de menores quantidades de amostra e solventes, menor tempo de realização da análise e menor quantidade de erros envolvidos no processo, uma vez que a metilação é realizada diretamente na amostra e não necessita de um processo de extração dos lipídios para posterior etapa de metilação.

Palavras-chave: Lipídios; metilação direta; ultrassom; cromatografia gasosa.

* Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Química, Campus Sede, Avenida Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil.

 oliveirasantos.oscardeoliveira@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20200121](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200121)

Comparação entre Métodos de Metilação na Determinação de Ácidos Graxos em Amostras de Carne por CG-DIC

Cintia S. R. Ferreira,^a Patrícia D. S. Santos,^{a,b} Nayane B. M. Sinosaki,^{a,b} Carlos E. R. Senes,^{a,b} Jesuí V. Visentainer,^{a,b} Oscar O. Santos^{a,b*}

^a Universidade Estadual de Maringá (UEM), Departamento de Química, campus sede, Avenida Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil.

^b Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Química, Programa de Pós Graduação em Química, campus sede, Avenida Colombo 5790, CEP 87020-900, Maringá-PR, Brasil.

*oliveirasantos.oscardeoliveira@gmail.com

Recebido em 19 de Maio de 2020. Aceito para publicação em 17 de Setembro de 2020.

1. Introdução

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes, materiais e equipamentos

2.2. Amostras

2.3. Extração lipídica

2.4. Metilação proposta por Hartman e Lago (1973)

2.4. Metilação por ISO 5509 (1978)

2.5. Metilação direta proposta por Figueiredo et. al. (2016)

2.6. Análises por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC)

2.7. Análise estatística

3. Resultados e Discussão

4. Conclusão

1. Introdução

Nas últimas décadas houve um crescente aumento no consumo de carnes pela população a nível mundial,¹ o qual as carnes de frango, boi e porco destacam-se entre as mais consumidas.² A carne de peixe também tem tido grande valorização em seu consumo devido as suas propriedades nutricionais³ e benefícios à saúde do consumidor.⁴⁻⁵ Dados da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, apontam que este aumento no consumo de carnes foi de

30 kg/pessoa/ano na década de 80, para 43,4 kg/pessoa/ano em 2015.⁶

Os lipídios são algumas das substâncias que fazem parte da composição da carne. Os triacilgliceróis (TAG), classe dominante dos lipídios, vem ganhando atenção crescente nos últimos anos devido ao seu potencial papel na promoção da saúde, tendo em vista que quando atribuídos a uma alimentação equilibrada estas substâncias são capazes de prevenir doenças cardiovasculares, gastrointestinais e possuem, também, propriedades antiinflamatórias,⁴⁻⁷ além de serem a maior fonte de reserva energética

corporal.⁸ Os lipídios também interferem na qualidade final do produto que é destinado ao consumo humano,⁹ uma vez que está relacionado às suas propriedades físico-químicas, organolépticas e sensoriais como, sabor, aroma, textura e aparência de cada qualidade de carne.¹⁰⁻¹¹ Estas propriedades podem ser afetadas pelas reações de hidrólise onde ocorre o processo de conversão de triacilgliceróis em diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e glicerol. Desta forma, a determinação dos ácidos graxos (AGs) tem sido amplamente realizada neste tipo de amostra, para possibilitar a avaliação da qualidade dos produtos de acordo com sua composição.¹²

Para determinação dos AGs de forma indireta, utiliza-se um conjunto de procedimentos no qual inicialmente realiza-se a extração do material lipídico da amostra de carne e posteriormente, por meio de reações de metilação, ocorre uma etapa de conversão dos AGs em substâncias mais voláteis, os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs). Após a etapa de conversão, os EMAGs são analisados por cromatografia em fase gasosa (CG)¹³, uma técnica amplamente recomendada para a análise de rotina de AG em amostras de alimentos, sendo a técnica selecionada para a realização deste trabalho associada a um detector de ionização em chama (DIC).¹⁴

Existem diversos métodos de metilação empregados para realização de análises de AG por CG de forma indireta, e entre os mais conhecidos e utilizados podemos citar os desenvolvidos por Hartman e Lago (1973),¹⁵ Joseph e Ackman (1992),¹⁶ Metcalfe (1966)¹⁷ e Organização Internacional para padronização (ISO 5509, 1978).¹⁸ Comparativamente aos demais métodos citados, a metilação direta proposta por Figueiredo *et al.* (2016)¹⁹ permite que a metilação seja realizada diretamente na amostra, sem a necessidade do procedimento de extração destes AG.

O método de metilação direta, além de amostras de carne, já foi estudado em diferentes tipos de amostras para determinação de AGs como, por exemplo, leite,²⁰ leite fermentado²¹ e sementes.²² No entanto, até o presente momento, para amostras de carne, nenhum autor já explorou comparar a eficiência dos principais métodos de metilação que ocorrem de forma indireta na amostra, como Hartman e Lago¹⁵ e ISO 5509¹⁸ com o método de metilação direta, desenvolvido por Figueiredo *et al.*¹⁹ Desta forma o objetivo deste

trabalho é avaliar a aplicação destes diferentes métodos de metilação na determinação de AG em amostras de carne de boi (*Bos taurus*), frango (*Gallus gallus domesticus*), sardinha (*Sardinella brasiliensis*) e porco (*Scrofa domesticus*), tendo em vista que estes métodos estão diretamente relacionados com as características da matriz de cada amostra. É importante ressaltar que a metodologia descrita por Metcalfe e Joseph & Ackman, não foram empregadas neste trabalho por utilizar o reagente BF_3 que é extremamente tóxico, muito reativo e degrada facilmente os AGs que possuem insaturações conjugadas.¹³

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes, materiais e equipamentos

Hidróxido de potássio (KOH) e de sódio (NaOH) (98 %), metanol (CH_3OH) (98 %), clorofórmio (CHCl_3) (98 %), ácido sulfúrico (H_2SO_4) (98 %) e n-heptano (C_7H_{16}) (98 %), foram comprados da Sigma Millipore (Darmstadt, Alemanha), sendo utilizados sem purificação adicional. Utilizou-se também uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAGs, 189, 99,9 %) e tricosanoato de metila (23:0, 99,9 %) adquiridos pela Sigma Millipore (St. Louis, MO, EUA). Para as análises cromatográficas foram utilizados os gases nitrogênio (N_2), hidrogênio (H_2) e hélio (He_2), todos com 99,999 % de pureza.

Foi empregado um liquidificador Philips Walita modelo Problend 213610, 800 W, com jarra de vidro para triturar as amostras. Para realização da filtragem na metodologia de extração lipídica por Bligh & Dyer, foi utilizado um papel filtro qualitativo Whatman nº1. A agitação das soluções foi realizada em um agitador magnético Fisatom modelo 752A (Brasil) e em um agitador CAPP modelo CRV-45X com agitação máxima de 4500 rpm (Reino Unido). As amostras foram sonicadas em um banho ultrasônico Elma®, Elmasonic S15H, com sistema de aquecimento (Singen, Alemanha), a potência e frequência empregada na realização dos experimentos foi de 80 W e 37 kHz, respectivamente. Foi utilizado um rotaevaporador da marca Fisatom, modelo 802 (Brasil), para eliminação do solvente no processo de extração lipídica.

Os EMAGs foram analisados em um equipamento Thermo Scientific CG-DIC, contendo coluna capilar de sílica fundida CP-7420 (Select FAME, 0,25 mm

de diâmetro interno, 100,0 m de comprimento com 0,25 μm de uma fina camada de cianopropil como fase estacionária) e injetor Split ou Split less.

2.2. Amostras

As amostras de carne de boi, frango, porco e peixe foram obtidas no comércio local da cidade de Maringá (PR) e posteriormente trituradas e armazenadas em freezer -4°C para posteriores análises por CG-DIC, sendo os resultados expressos em matéria natural, sem que houvesse uma etapa de secagem das amostras.

2.3. Extração lipídica

Foram realizados vários ciclos de extração lipídica empregando-se o método proposto por Bligh e Dyer (1959)²⁵ até a obtenção de quantidade suficiente de lipídios que permitisse a posterior realização da etapa de metilação dos AG presentes na amostra. Inicialmente, este método de extração lipídica foi desenvolvido para amostras de peixes, mas atualmente, é amplamente empregado em diversos outros tipos de amostras.¹⁹ Resumidamente, pesou-se 100 mg de amostra a qual foi misturada com 100,0 mL de clorofórmio e 200,0 mL de metanol sendo homogeneizadas por 5 min em chapa de agitação. Foram adicionados mais 100,0 mL de clorofórmio na mistura permanecendo por mais 5 min em chapa de agitação e posteriormente, foram inseridos 100,0 mL de água destilada mantendo agitação por mais 2 min. Por fim, a solução homogeneizada foi filtrada em papel Whatman n° 01 em um funil de Buchner juntamente com uma bomba de vácuo. O filtrado foi transferido para um funil de separação, onde ficou até total separação das fases. O sobrenadante foi descartado, e a fase orgânica (camada inferior) foi coletada em balão de fundo chato de 250,0 mL previamente pesado e posteriormente com auxílio de um evaporador foi retirado o clorofórmio restante e os extratos lipídicos foram armazenados a -4°C para posteriormente ser realizada metilação dos AG pelos métodos propostos por Hartman & Lago e ISO 5509 e em seguida serem realizadas as análises por CG-DIC.

2.4. Metilação proposta por Hartman e Lago (1973)

Para o método proposto por Hartman e Lago, que posteriormente foi modificado por Maia &

Rodriguez e Amaya (1993),²⁶ foram pesados 100 mg dos lipídios (extraídos pelo método desenvolvido por Bligh e Dyer já descrito) em um tubo de ensaio e em seguida, foram adicionados 4,0 mL de hidróxido de sódio / metanol ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) e 5,0 mL de solução de esterificação ($\text{NH}_4\text{Cl} / \text{H}_2\text{SO}_4 / \text{MeOH}$) e, subsequentemente a adição de cada reagente: a amostra foi aquecida (100°C) durante 5 min e ao fim do processo, arrefecida sob água corrente. Posteriormente, foram adicionados 4,0 mL de solução saturada de NaCl juntamente com 5,0 mL de hexano e 500,0 μL do padrão interno de éster metílico (23:0) sendo homogeneizados com agitação vigorosa por 30 s. Por fim, após a separação das fases, a fase sobrenadante foi coletada e analisada por CG-DIC.

2.5. Metilação por ISO 5509 (1978)

Para o método ISO 5509, foram pesados 100 mg do lipídio (extraído por Bligh e Dyer) em um tubo de ensaio sendo adicionados neste mesmo tubo, com auxílio de uma pipeta graduada, 2,0 mL de n-heptano e levado a agitação em Vórtex por 1 min. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL de solução de hidróxido de potássio ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) em metanol o qual foi agitado por mais 30 s. No final adicionou-se um volume de 500,0 μL do padrão interno de éster metílico (23:0). O tubo foi levado à centrifugação com rotação de 2000 rpm durante 2 min para separação de fases, onde o sobrenadante foi coletado e analisado por CG-DIC.

2.6. Metilação direta proposta por Figueiredo et. al. (2016)

A metilação direta foi realizada de acordo com o método desenvolvido por Figueiredo *et al.* (2016)¹⁹, onde 100 mg de amostra de carne foram adicionadas em um tubo de ensaio de 10 cm, e em seguida, foram adicionados 2,0 mL de solução de hidróxido de sódio ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol) sendo colocada em banho ultrassônico por 5 min. Posteriormente, 2,0 mL de ácido sulfúrico ($1,5 \text{ mol L}^{-1}$ em metanol) foi adicionado e todo o sistema foi colocado novamente em banho ultrassônico durante 5 min, em seguida foi realizada a adição de 1,0 mL de n-heptano e agitado por 30 s e posteriormente centrifugado por 2000 rpm durante 1 min. Um volume de 500,0 μL do padrão interno de éster metílico (23:0) foi adicionado, a fase superior foi coletada e analisada por CG-DIC.

2.7. Análises por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG-DIC)

As condições cromatográficas empregadas neste trabalho foram realizadas de acordo com Figueiredo et al. (2016).¹⁹ No início da corrida cromatográfica, a temperatura da coluna foi mantida em 65°C por 4 min, seguida por uma rampa de aquecimento de 16°C min⁻¹ até atingir a temperatura de 185°C, a qual foi mantida por 12 min. Em seguida, uma nova rampa de 20°C min⁻¹ foi aplicada até 235°C e mantida por 14 min, totalizando um tempo de análise de 40 min. O fluxo de gás foi de 1,2 mL min⁻¹ para o gás de arraste (H₂), 30,0 mL min⁻¹ para o gás de limpeza (N₂) e no DIC a vazão foi de 30,0 e 300,0 mL min⁻¹ de gás (H₂) e ar sintético, respectivamente. As amostras foram injetadas no modo Split, com proporção 1:40. O volume de injeção foi de 1,0 µL. Os EMAGs foram identificados por comparação entre o tempo de retenção das amostras de constituintes e os padrões de EMAGs. Os cálculos para determinação de AG foram realizados com o emprego de um padrão interno (23me) e o fator de correção foi utilizado para obter as concentrações de AG de acordo com Visentainer²⁷ e a quantidade de AG foi calculada em mg por grama de amostra. A correção DIC é necessária devido ao sinal de magnitude gerado pelo detector em proporção ao número de átomos de C+ que estão ligados a átomos de hidrogênio.

2.8. Análise estatística

As análises estatísticas descritivas e de componentes principais (PCA) foram realizadas utilizando o *software* R-Studio versão 3.6.1.²⁸ Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey a 95 % de confiança.

3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos da composição de ácidos graxos para os diferentes tipos de carne em métodos distintos de metilação são apresentados na Tabela 1. Para amostras de frango, quando aplicado o método de metilação proposta por Hartman & Lago e ISO 5509 foram quantificados um total de dez AG, enquanto para o método proposto por Figueiredo et al. foram identificados sete AG. Os AG majoritários determinados neste

tipo de amostra com o emprego de ambos os métodos de metilação foram: ácido palmítico (16:0), ácido oleico (18:1) e o ácido linoleico (18:2), onde ambos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) nos resultados obtidos para os três métodos de metilação estudados.

O método ISO 5509 proporcionou resultados mais adequados para o ácido linoleico apresentando um valor de 9,30 mg de AG por g de amostra. Quando aplicado o método de metilação proposta por Figueiredo et al. obteve-se resultados mais adequados para os AG 16:0 e 18:1, sendo estes valores respectivamente 7,08 e 12,03 mg de AG por g de amostra, fato relevante, uma vez que pesquisas anteriores relatam a importância nutricional do ácido palmítico e oleico na alimentação, sendo assim, quantificá-los é de interesse ao consumidor. O ácido palmítico é um ácido graxo saturado sendo fundamental no desenvolvimento do corpo humano, desde o feto até a infância, além de ser um componente essencial dos lipídios teciduais.²⁹ Em relação ao ácido oleico Bhattacharjee et al. (2020) relataram que sua ingestão está associada com benefícios à saúde, uma vez que, o consumo equilibrado reflete na prevenção de cânceres e doenças cardíacas.³⁰ Além disso, observando os valores obtidos na Tabela 1, o método de metilação proposto por Figueiredo et al. destacou-se na obtenção de maiores valores de ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e Σ AG para a amostra de frango.

Para amostras de carne de porco, de acordo com os resultados na Tabela 1, quando aplicado o método proposto por Hartman & Lago e ISO 5509 foram identificados ao todo oito AGs, enquanto que para metilação proposta por Figueiredo et al. foram identificados seis AG, sendo os majoritários determinados neste tipo de amostra em ambas as metilações os AGs 16:0, 18:0 e 18:1. Para o 18:1 houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos para os diferentes métodos de metilação, sendo o método ISO 5509 o que apresentou a maior concentração deste AG (16,53 mg de AG por g de amostra). A metilação proposta por Figueiredo et al. apresentou um somatório maior e significativamente diferente ($p > 0,05$) quando comparado com os demais métodos para determinação do ácido 16:0 e 18:0, sendo estes valores, respectivamente de 13,40 e 13,48 mg de AG por g de amostra. Além dos AGs 16:0 e 18:0, a metilação proposta por Figueiredo et

Tabela .1. Quantidade de AG (mg de AG por g de amostra) encontrada em cada tipo de carne, aplicando as três diferentes metodologias de metilação

NC/DL	Quantificação de AG (mg de AG por g de amostra)											
	Frango			Porco			Boi			Peixe		
	Direta	Hartman	ISO	Direta	Hartman	ISO	Direta	Hartman	ISO	Direta	Hartman	ISO
14:0	0,18c ± 0,01	0,21b ± 0,31	0,24a ± 0,05	0,56b ± 0,02	0,61a ± 0,19	0,32c ± 0,11	3,56a ± 0,03	2,00b ± 0,23	1,27c ± 0,07	3,32a ± 0,04	1,28c ± 0,47	2,94b ± 0,07
14:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,08b ± 0,22	0,52a ± 0,06
16:0	7,08a ± 0,17	4,30c ± 0,40	5,10b ± 0,61	13,40a ± 0,27	8,25b ± 0,95	8,43b ± 0,17	34,57a ± 0,21	26,04b ± 0,50	25,02c ± 0,13	-	0,09a ± 0,52	0,11a ± 0,27
16:1	1,42a ± 0,04	0,16b ± 0,61	0,13b ± 0,05	0,88a ± 0,04	0,08b ± 0,04	0,08b ± 0,20	2,66a ± 0,02	0,48c ± 0,05	1,65b ± 0,82	32,47a ± 0,52	13,30c ± 0,18	15,78b ± 0,03
17:0	-	-	-	-	-	-	-	0,21a ± 0,11	-	3,21a ± 0,05	0,28c ± 0,87	2,16b ± 0,04
17:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,42a ± 0,24	0,43b ± 0,09
18:0	2,12a ± 0,18	0,95b ± 0,38	1,17b ± 0,81	13,48a ± 0,07	4,8c ± 0,50	5,32b ± 0,72	22,74a ± 0,37	17,52c ± 0,08	20,98b ± 0,78	-	0,14b ± 0,69	0,29a ± 0,09
18:1	12,03a ± 0,15	7,17c ± 0,32	9,82b ± 0,45	13,44b ± 0,35	13,11b ± 0,32	16,53a ± 0,20	44,58b ± 0,37	40,64c ± 0,20	47,28a ± 0,21	3,64c ± 0,10	8,08a ± 0,11	6,21b ± 0,79
18:2	8,25b ± 0,01	7,50c ± 0,69	9,30a ± 0,87	2,64b ± 0,05	2,08a ± 0,40	0,09c ± 0,06	3,44b ± 0,02	5,93a ± 0,09	1,62c ± 0,56	10,84c ± 0,09	21,09b ± 0,04	22,47a ± 0,34
18:3	0,33c ± 0,52	0,81b ± 0,11	1,05a ± 0,53	-	0,36a ± 0,07	0,27b ± 0,09	-	2,32a ± 0,05	0,52b ± 0,07	0,35b ± 0,01	3,37a ± 0,72	0,42b ± 0,32
20:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,39c ± 0,01	0,95b ± 0,03	1,03a ± 0,02
20:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,14b ± 0,07	0,17a ± 0,42
21:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,71b ± 0,01	0,94a ± 0,06	0,61c ± 0,04
20:2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,34b ± 0,34	0,61a ± 0,02
20:5	-	0,03b ± 0,01	0,17a ± 0,08	-	0,33a ± 0,17	-	-	0,64a ± 0,17	-	-	0,13b ± 0,26	0,22a ± 0,43
20:3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,34c ± 0,01	0,40b ± 0,06	0,88a ± 0,58
20:4	-	0,07b ± 0,12	0,14a ± 0,18	-	-	-	-	0,48b ± 0,12	-	-	1,28a ± 0,12	0,25b ± 0,06
22:0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,20a ± 0,04	0,13c ± 0,01	0,49b ± 0,06
24:0	-	-	-	-	-	0,16a ± 0,11	-	-	0,59a ± 0,34	0,35b ± 0,01	0,71a ± 0,05	0,68a ± 0,13
24:1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,11a ± 0,21	0,03b ± 0,27
22:6	-	0,04a ± 0,11	0,03a ± 0,28	-	-	-	-	0,26a ± 0,17	0,05b ± 0,07	3,19a ± 0,05	0,24c ± 0,25	0,33b ± 0,07
AGS	9,44a ± 0,36	5,46c ± 1,09	6,55b ± 1,47	27,43a ± 0,36	13,66b ± 1,64	14,07b ± 1,00	60,88a ± 0,67	45,77c ± 0,92	47,27b ± 0,98	39,77a ± 0,67	26,36b ± 1,8	26,94b ± 1,55
AGMI	13,50a ± 0,19	7,33c ± 0,93	9,96b ± 0,50	14,32b ± 0,39	13,19c ± 0,39	16,61a ± 0,40	47,24b ± 0,39	41,12c ± 0,25	48,92a ± 1,03	14,77c ± 0,10	22,64b ± 2,09	26,08a ± 0,75
AGPI	8,57b ± 0,06	8,45b ± 1,04	10,69a ± 1,94	2,64a ± 0,05	2,57b ± 0,64	0,52c ± 0,15	3,43b ± 0,02	3,24b ± 0,60	9,64a ± 1,8	7,47a ± 0,12	6,51b ± 1,45	3,62c ± 1,54
ΣAG	31,51a ± 0,15	21,24c ± 0,55	27,20b ± 0,48	44,39a ± 0,18	29,42b ± 0,66	31,20b ± 0,43	111,55a ± 0,26	90,1c ± 0,33	99,43b ± 0,45	62,01a ± 0,32	55,51b ± 0,32	56,64b ± 0,45

Resultados expressos em média ± desvio padrão, para n = 3. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (p < 0,05) para o teste de Tukey. Abreviações: NC / DL: número de carbono/dupla ligação; AG: ácido graxo; AGMI: ácido graxo monoinsaturado; AGPI: ácido graxo poliinsaturado; AGS: ácido graxo saturado; ΣAG: somatório de ácido graxo

al. apresentou também os maiores valores para AGS, AGMI e Σ AG, sendo que este último foi de 1,5 e 1,42 vezes maiores quando comparados respectivamente com os métodos propostos por Hartman & Lago e ISO.

De acordo com a Tabela 1, ao aplicar os métodos de metilação propostos por Hartman & Lago, ISO e Figueiredo *et al.*, para amostra de carne de boi foram identificados respectivamente onze, nove e seis AG, sendo os majoritários: 16:0, 18:0 e 18:1. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos para os diferentes métodos mencionados, sendo que o 18:1 apresentou maior valor quando aplicada a metilação ISO 5509, diferindo-se 2 % maior quando comparada com a metilação proposta por Figueiredo *et al.* e 5 % maior quando comparada com a metilação proposta por Hartman & Lago. Embora a metilação ISO 5509 apresente para o ácido oleico um percentual maior em sua quantificação, para os AG 14:0, 16:0, 16:1 e 18:0 a metilação direta se destaca, além de obter valores significativamente maiores para AGMI e Σ AG.

De acordo com a Tabela 1, o método proposto por Hartman & Lago e ISO 5509 resultou na determinação de vinte e um AG em amostras de peixe, enquanto o método proposto por Figueiredo *et al.* foram determinados doze AG. Os AG majoritários: 16:0 e 18:1 foram determinados com a aplicação de ambos os métodos de metilação aplicados neste tipo de amostra, no entanto, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores obtidos, onde para o 16:0 a metilação direta apresentou uma maior concentração de AG (32,47 mg de AG por g de amostra) e para o 18:1 a concentração foi maior para a metodologia Hartman & Lago (8,08 mg de AG por g de amostra). Com relação ao Σ AG, assim como nas demais amostras de carne, obteve-se resultados mais adequados para a metilação direta. O mesmo acontece com outros tipos de amostras já relatadas na literatura como descreve Piccioli *et al.* (2019) para amostra de leite fermentado e Sinosaki *et al.* (2019) para amostras de sementes, mostrando que o método direto foi o que obteve resultados mais adequados quando comparado a outros métodos de metilação convencional. Fato que pode ser explicado através do procedimento experimental da metodologia, uma vez que utiliza temperatura ambiente e banho ultrassônico aumentando a eficácia das conversões dos AGs em EMAGs também em amostras de carne.

Nesse contexto, quando comparamos os diferentes métodos de metilação, é perceptível que a metilação direta proposta por Figueiredo *et al.* utiliza menor quantidade de amostra e solvente, sendo de execução mais rápida quando comparada com as demais (Hartman & Lago e ISO) o que favorece seu emprego à laboratórios com auto fluxo de amostras. Além disso, as técnicas de Hartman & Lago e ISO apresentam etapas desfavoráveis que podem aumentar o erro experimental, onde possíveis interações indesejáveis da matriz com os solventes utilizados podem ocorrer, proporcionando produtos não metilados. Reações de saponificação podem ocorrer quando, por exemplo, a realização da esterificação ocorre em meio básico e na amostra temos a presença de AGL. Outras reações indesejadas são reações resultantes da degradação lipídica, que ocorrem em AGs polinsaturados na presença do calor. Desta forma, as duas metodologias (Hartman & Lago e ISO) resultaram em um menor rendimento na quantificação de AGs totais como observado na Tabela 1 para os quatro tipos de carnes estudadas. O método direto de metilação ainda apresenta a vantagem de não precisar realizar o processo de extração lipídica antes da metilação, garantindo deste modo uma menor quantidade de erros experimentais devido à menor quantidade de etapas envolvidas. Além disso, o analista possui maior segurança laboratorial evitando contato com grande quantidade de solventes orgânicos, evita o descarte de resíduos destes solventes ao meio ambiente. Outro benefício seria em relação ao custo da análise. A Figura 1 mostra a quantidade de AGS, AGMI e AGPI obtidos para os diferentes tipos de carnes com a aplicação de diferentes métodos de metilação. É perceptível que a metilação direta proposta por Figueiredo *et al.* apresentou valores significativamente maiores com relação aos AGS em todos os tipos de carne quando comparada com as demais metodologias, além de apresentar também menores valores de desvio padrão relativo.

Com relação aos AGMI, a metilação direta obteve valores significativamente maiores apenas para amostra de carne de frango, enquanto para os demais tipos de carne, a esterificação por ISO foi a que obteve resultados significativamente maiores e apresentando valores de desvios padrão aceitáveis (DPR < 20 %).

Para os AGPI em amostras de carne de frango e boi a metilação ISO apresentou valores significativamente maiores, no entanto, em abas

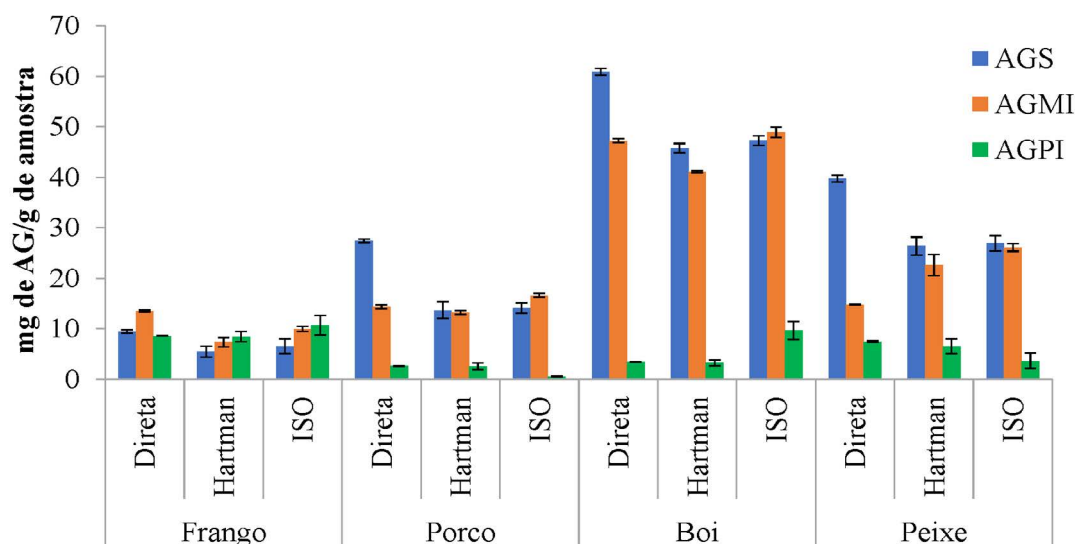


Figura 1. Comparação entre os diferentes métodos de metilação em termos de AGS, AGMI e AGPI nos diferentes tipos de carne

as amostras o erro foi muito próximo do limite aceitável ($DPR < 20\%$). Com relação às amostras de porco e de peixe, o método de metilação direta proposta por Figueiredo *et al.* além de apresentar valores de desvio padrão comparativamente menores com relação aos demais métodos, obteve também valores de AGPI mais adequados.

Os dados obtidos sobre a composição em ácidos graxos foram submetidos à análise exploratória utilizando o método de análise de componentes principais PCA que é uma ferramenta quimiométrica muito útil em estudos na área de ciência e tecnologia de alimentos, sendo frequentemente utilizados para discriminar variações químicas e determinar o rótulo de classe mais provável^{23, 24} revelando a relação entre as variáveis medidas e de relações ou agrupamento entre amostras.

Para isso foi utilizado um conjunto de dados 12 x 4, onde os quatro tipos de carnes (frango, porco, boi e peixe) submetidos aos diferentes métodos de metilação (metilação direta, Hartman & Lago e ISO) constituem as linhas da matriz, já as colunas foram formadas pelo resultado de AGMI, AGPI, AGS e ΣAG para cada variável investigada.

O gráfico de distribuição apresentado na Figura 2 mostra que para as duas componentes principais determinadas pelo PCA (PC1 e PC2) descreveram 56,24 % (PC 1) e 21,80 % (PC 2) da taxa de contribuição de variância acumulada. O gráfico dos *escores* na Figura 2 (a) proporciona informações referentes às amostras em estudo,

onde expõe o agrupamento das diferentes amostras de carnes que foram submetidas aos diferentes tipos de metodologias de metilação. Na primeira componente (PC 1), no eixo positivo as amostras foram agrupadas em: 7, 8, 9, 10, 11 e 12, indicando que possuem similaridade referente às variáveis AGPI e AGMI. No eixo negativo, as amostras foram agrupadas em 1, 2, 3, 4, 5 e 6, indicando que apresentam alguma similaridade referente à variável AGS verificados no gráfico dos *loadings 2* (b).

Na segunda componente (PC 2) as amostras foram agrupadas no eixo positivo em: 1, 2, 3, 9, 10 e 11 indicando que apresentam alguma similaridade referente às variáveis AGS e ΣAG . E no eixo negativo 4, 5, 6, 7, 8 e 12, mostrou-se correlacionados com AGPI e AGMI, verificados no gráfico dos *loadings* (2-B), que apresenta informações referentes as variáveis obtidas pelos três tipos de metodologias de metilação.

Nas Figuras, 3, 4 e 5 temos os cromatogramas obtidos para cada método de esterificação aplicado em amostra de frango.

4. Conclusão

A metilação direta demonstrou ser o método mais eficiente em todas as amostras empregadas, quando se trata de AGMI e ΣAG . O método resultou na maior quantidade de ΣAG possuindo vantagens

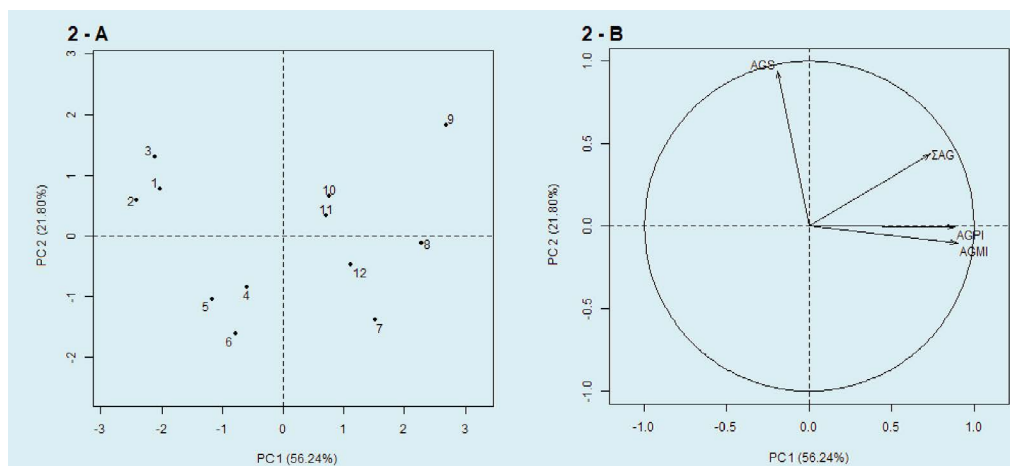


Figura 2. (2-A) Gráfico PCA dos resultados dos scores. 1, 4, 7 e 10: Carne de frango, porco, boi e peixe submetida à metilação direta proposta por Figueiredo et. al, respectivamente. 2, 5, 8 e 11 expressa a metilação proposta por Hartman e Lago em carnes de frango, porco, boi e peixe, respectivamente. Os números 3, 6, 9 e 12 apresenta a metilação proposta por ISO em amostras de carne de frango, porco, boi e peixe na devida ordem. **(2-B)** Gráfico PCA dos resultados do loadings. AGMI: ácidos graxos monoinsaturados; AGPI: ácidos graxos poli-insaturados; AGS: ácidos graxos saturados; ΣAG: somatório de ácidos graxos

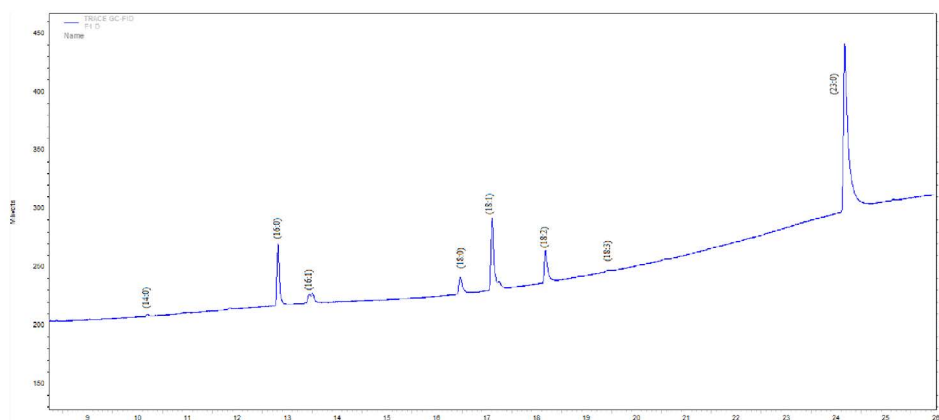


Figura 3. Cromatograma obtido quando aplicado o método de metilação proposto por Figueiredo et al. em amostras de carne de frango

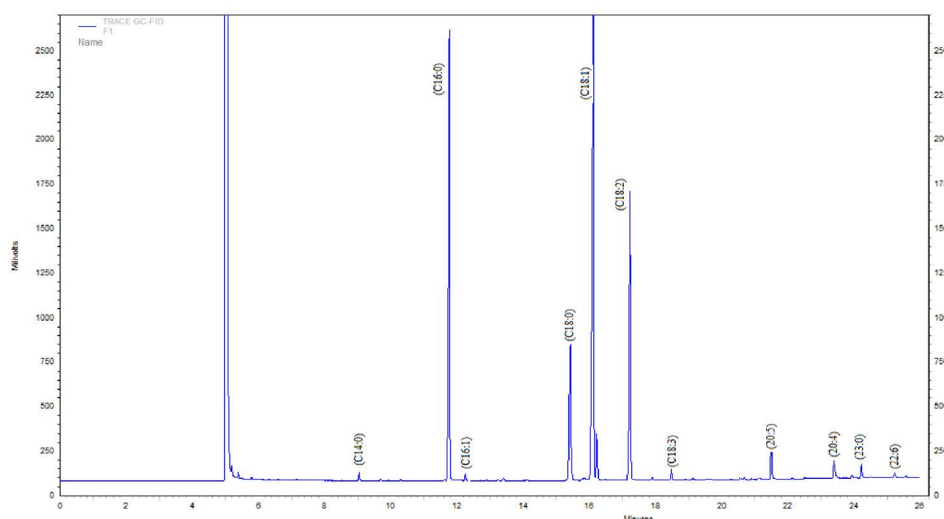


Figura 4. Cromatograma obtido quando aplicado o método de metilação proposto por Hartman & Lago em amostras de carne de frango

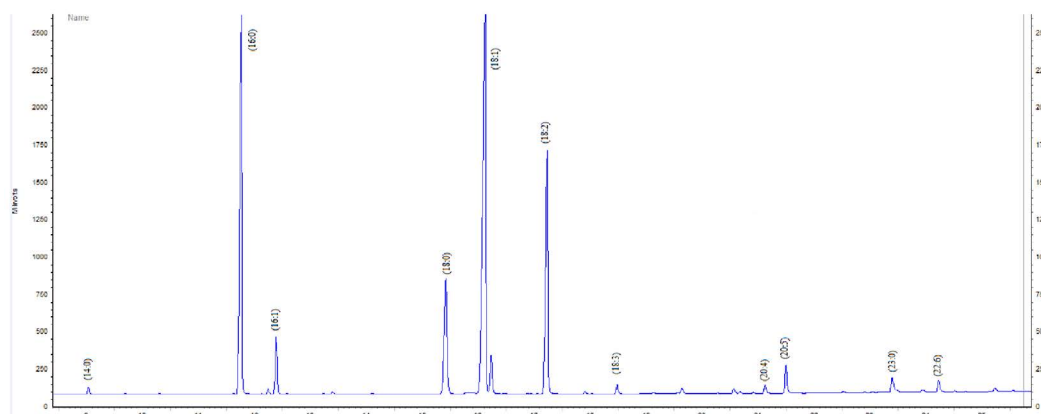


Figura 5. Cromatograma obtido quando aplicado o método de metilação ISO 5509 em amostras de carne de frango

quando comparado com os demais (Hartman & Lago e ISO) devido ao baixo custo, maior rapidez na realização da análise, utilização de menores quantidades de solventes orgânicos tornando-se uma técnica menos tóxica e agressiva tanto para o analista como para o meio ambiente. Para amostras de carne, o método direto pode ser aplicado com eficácia e benefícios econômicos, assim como já relatado na literatura para outras matrizes alimentícias como, por exemplo, leites, sementes e leite fermentado. Além disto, foram encontrados como ácidos graxos majoritários o palmítico e o oleico em todas as amostras de carnes, sendo estes relatados como importantes para consumo humano na obtenção de uma dieta mais saudável, tornando-se importante a determinação e avaliação, não só destes ácidos graxos, mas de todos os outros que também fazem parte da constituição lipídica para avaliar as propriedades nutricionais destes diferentes tipos de carnes.

Referências Bibliográficas

¹Taheri-Garavand, A.; Fatahi, S.; Omid, M.; Makino, Y. Meat quality evaluation based on computer vision technique: A review. *Meat Science* **2019**, *156*, 183. [CrossRef]

²Ang, C. S.; Chan, N. N. Singh, L. A comparison study of meat eaters and non-meat eaters on mind attribution and moral disengagement of animals. *Appetite* **2019**, *136*, 80. [Crossref]

³Morales, E.; Higuchi, A. Is fish worth more than meat? – How consumers beliefs about health and nutrition affect their willingness to pay more for fish than meat. *Food Quality and Preference* **2018**, *65*, 101. [CrossRef]

⁴Brotas, M. S. C.; Carvalho, G. A. Pereira, P. A. P. Determination, through Derivatization and GC-MS Analysis, of Omega-3 and Omega-6 Fatty Acids in Fish Oil Capsules Sold in Salvador, Bahia. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2020**, *31*, 447. [CrossRef]

⁵Baldissera, M. D.; Souza, C. F.; Cristina, C.; Velho, M. C.; Klein, B.; Abbad, L. B.; Ourique, A. F.; Wagner, R.; Da, A. S. Baldisserotto, B. Dietary supplementation with nerolidol nanospheres improves growth, antioxidant status and fatty acid profile in Nile tilapia: Benefits of nanotechnology for fish health and meat quality. *Aquaculture* **2020**, *516*, 734635. [CrossRef]

⁶Dominguez, L. J.; Bes-Rastrollo, M.; Basterra-Gortari, F. J.; Gea, A.; Barbagallo, M.; Martínez-González, M. A. Should we recommend reductions in saturated fat intake or in red/processed meat consumption? The SUN prospective cohort study. *Clinical Nutrition* **2018**, *37*, 1389. [CrossRef]

⁷Manuela, P.; Cardoso, D. C.; Filipa, A.; Vicente, B. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet. *Meat Science* **2013**, *93*, 586. [Crossref]

⁸Jaturasitha, S.; Chaiwang, N.; Kayan, A.; Kreuzer, M. Nutritional strategies to improve the lipid composition of meat, with emphasis on Thailand and Asia. *Meat Science* **2016**, *120*, 157. [CrossRef]

⁹Leggio, A.; Belsito, E. L.; De Marco, R.; Liguori, A.; Siciliano, C.; Spinella, M. Simultaneous extraction and derivatization of amino acids and free fatty acids in meat products. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1241*, 96. [CrossRef]

¹⁰Bernardi, D. M.; Bertol, T. M.; Pflanzner, S. B.; Sgarbieri, V. C.; Pollonio, M. A. R. ω -3 in meat products: Benefits and effects on lipid oxidative stability. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2016**, *96*, 2620. [CrossRef]

- ¹¹ Decker, E. A.; Akoh, C. C.; Wilkes, R. S. Incorporation of (n-3) Fatty Acids in Foods :Challenges and Opportunities. *The Journal of Nutrition* **2012**, *142*, 610. [[CrossRef](#)]
- ¹² Stergiou, P. Y.; Foukis, A.; Filippou, M.; Koukouritaki, M.; Parapouli, M.; Theodorou, L. G.; Hatziloukas, E.; Afendra, A.; Pandey, A.; Papamichael, E. M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnology Advances* **2013**, *31*, 1846. [[CrossRef](#)]
- ¹³ Milinsk, M. C.; Matsushita, M.; Visentainer, J. V.; De Oliveira, C. C.; De Souza, N. E. Comparative analysis of eight esterification methods in the quantitative determination of vegetable oil fatty acid methyl esters (FAME). *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2008**, *19*, 1475. [[CrossRef](#)]
- ¹⁴ Aued-Pimentel, S; Zenebon, O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados : aspectos sobre legislação e quantificação. *Revista do Instituto Adolfo Lutz* **2009**, *68*, 167. [[link](#)]
- ¹⁵ Hartman, L.; Lago, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory practice* **1973**, *22*, 475. [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Joseph, J. D.; Ackman, R. G. Capillary Column Gas Chromatographic Method for Analysis of Encapsulated Fish Oils and Fish Oil Ethyl Esters: Collaborative Study. *Journal of AOAC International* **1992**, *75*, 488. [[CrossRef](#)].
- ¹⁷ Metcalfe, L. D, Schimitz, A. A, Pelka, J. R. Rapid Preparation of Fatty Acid Esters from Lipids for Gas Chromatographic Analysis. *Analytical Chemistry* **1966**, *38*, 514. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ International Organization for Standardization: ISO 5509: Animal and Vegetable Fats and Oils: Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids; London, **1978**. [[Link](#)]
- ¹⁹ Figueiredo, I. L.; Claus, T.; Oliveira Santos Júnior, O.; Almeida, V. C.; Magon, T.; Visentainer, J. V. Fast derivatization of fatty acids in different meat samples for gas chromatography analysis. *Journal of Chromatography A* **2016**, *1456*, 235. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ Cruz-hernandez, C.; Goeuriot, S.; Giuffrida, F.; Thakkar, S. K. Direct quantification of fatty acids in human milk by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1284*, 174. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Piccioli A. F. B.; Santos, P. D. S.; Silveira, R. da; Bonafe, E.; Visentainer, J. V.; Santos, O. O. Fatty Acid Determination in Fermented Milk Samples Employing Direct Esterification and Gas Chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2019**, *30*, 1350. [[CrossRef](#)]
- ²² Braga, N.; Sinosaki, M.; Daniele, P.; Bellanda, M. Analytical method of direct derivatization of fatty acids in seeds. *Chemical Papers* **2019**, *73*, 2399. [[CrossRef](#)]
- ²³ Hongyu, K.; Jorge, G.; Junior, D. O. Análise de Componentes Principais : resumo teórico , aplicação e interpretação. *Engineering and Science* **2016**, *1*, 83. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Kacha, A.; Grenez, F.; Orozco-Arroyave, J. R.; Schoentgen, J. Principal component analysis of the spectrogram of the speech signal: Interpretation and application to dysarthric speech. *Computer Speech & Language* **2020**, *59*, 114. [[CrossRef](#)]
- ²⁵ Bligh, E. G.; Dyer, W. J. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **1959**, *37*, 911. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Maia E. L., Rodrigues-Amaya D. B. R.; Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. *Revista Instituto Adolfo Lutz* **1993**, *53*, 27. [[Link](#)]
- ²⁷ Visentainer, J. V.; Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova* **2012**, *35*, 274. [[CrossRef](#)]