

Artigo

Métodos para Determinação da Composição de Triacilgliceróis: Uma Revisão da Última Década

Melo, L. N.; Meneghetti, M. R.; Meneghetti, S. M. P.; Bortoluzzi, J. H.*

Rev. Virtual Quim., 2020, 12 (1), 25-36. Data de publicação na Web: 24 de janeiro de 2020

<http://rvq.sbg.org.br>

Methods for the Determination of Triacylglycerols Composition: A Review of the Past Decade

Abstract: Over the last years (2008-2019), the most employed and innovative techniques for the analysis of triacylglycerol composition are presented and discussed in this article. Determining the composition of these molecules is of great importance since they are the main components of naturally occurring oils and fats and are products of great industrial and commercial interest. The application of oils and fats is closely related to the composition of these triacylglycerols in terms of fatty acids, having the chromatographic analysis techniques as the main and most used for the determination of this composition, with reversed phase high performance liquid chromatography and others techniques derived from it being the most employed.


Keywords: Oils; fats; compositional analysis; chromatography.

Resumo

Ao longo dos últimos anos (2008-2019), as técnicas mais empregadas e inovadoras para a análise da composição de triacilgliceróis são apresentadas e discutidas neste artigo. A determinação da composição destas moléculas é de grande importância, uma vez que as mesmas são os principais componentes de óleos e gorduras de origem natural e são produtos de grande interesse industrial e comercial. A aplicação de óleos e gorduras está intimamente relacionada à composição desses triacilgliceróis em termos de ácidos graxos, tendo as técnicas cromatográficas de análise, como as principais e mais utilizadas para a determinação dessa composição, sendo a cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e outras técnicas derivadas desta as mais empregadas.

Palavras-chave: Óleos; gorduras; análise composicional; cromatografia.

* Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR), Avenida Lourival de Melo Mota s/nº, Cidade Universitária, CEP 57072-970, Maceió-AL, Brasil

 janaina.bortoluzzi@iqb.ufal.br
DOI: [10.21577/1984-6835.20200004](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20200004)

Métodos para Determinação da Composição de Triacilgliceróis: Uma Revisão da Última Década

Lucas N. de Melo, Mario R. Meneghetti, Simoni M. Plentz Meneghetti,
 Janaína H. Bortoluzzi*

Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Química e Biotecnologia, Grupo de Catálise e Reatividade Química (GCaR), Avenida Lourival de Melo Mota s/nº, CEP 57072-970, Cidade Universitária, Maceió-AL, Brasil.

*janaina.bortoluzzi@iqb.ufal.br

Recebido em 23 de julho de 2018. Aceito para publicação em 3 de janeiro de 2020

1. Introdução

2. Técnicas de Análise

- 2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)
- 2.2. Cromatografia Gasosa (GC)
- 2.3. Outras técnicas cromatográficas
- 2.4. Análise estereoespecífica

3. Considerações Finais

1. Introdução

Triacilgliceróis (TAGs), também denominados triglicerídeos ou triacilglicerídeos, podem ser vistos como derivados da reação de esterificação de ácidos graxos (AGs) com o glicerol. Estes compostos proporcionam uma importante fonte de armazenamento de energia em animais e plantas, uma vez que são os principais componentes de óleos e gorduras. Como destacado por Buchgraber e colaboradores (2004), as estruturas moleculares das espécies individuais de TAG podem ser descritas

a partir de suas características em termos de: número total de carbono (NC), isto é, a soma dos átomos de carbonos presentes em cada um dos fragmentos de AGs; grau de insaturação dos AGs; e posição e configuração das duplas ligações em cada AG.¹ Além disso, TAGs também podem ser diferenciados em termos da posição exata (*sn*-1, *sn*-2, *sn*-3, do inglês *stereospecifically numbered*), como recomendado pela IUPAC (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*), em que o AG encontra-se esterificado com a porção de glicerol da estrutura básica dos TAGs (regioespecificidade/estereoespecificidade) (Figura 1).²

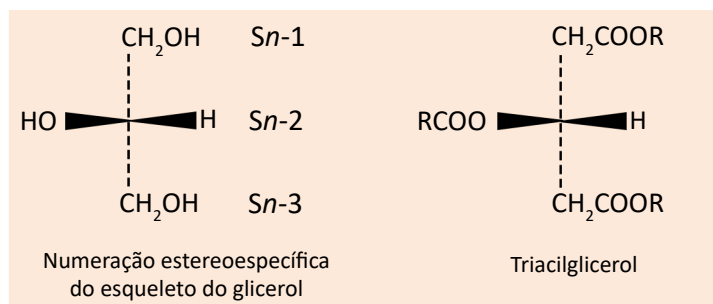


Figura 1. Esqueleto do glicerol e molécula genérica de triacilglicerol²

Como podemos perceber, os AGs são componentes essenciais da molécula de TAG. Esses fragmentos das moléculas de TAGs podem ser definidos como ácidos carboxílicos alifáticos de cadeia linear, que podem ser encontrados na natureza com cadeias com NC entre 4 a 22, sendo os NCs de 16 e 18 (C16 e C18) os mais comuns. Por esta razão, os AGs que possuem cadeias menores que NC = 16-18 são classificados como AG de cadeia curta ou média, enquanto os AGs com cadeia acima desta faixa são denominados de AG de cadeia longa.²

Um grande número de AGs resulta da mesma rota biossintética, na qual a cadeia é construída a partir de duas unidades de carbono, e ligações duplas *cis* são inseridas por enzimas dessaturases em posições específicas da cadeia. Tal fato explica a típica composição de AGs naturais com número par de carbonos em sua cadeia.²

Uma maneira comum de classificação dos AGs é dada por dois números separados por dois pontos, fornecendo, respectivamente, o tamanho da cadeia e o número de insaturações. A posição da insaturação é geralmente explicitada após a primeira classificação. Por exemplo, o ácido oleico, o qual possui NC = 18, com uma insaturação no carbono 9, é descrito por 18:1 9c. A Tabela 1 apresenta a classificação de alguns AGs comuns, bem como sua estrutura e sua origem (fonte).^{2,3}

Em 1972, Carter Litchfield, em sua publicação *Analysis of Triglycerides*, já destacava os principais desafios encontrados na análise química objetivando a caracterização de misturas complexas de TAG. Entre tais desafios, destacam-se o número extremamente grande de espécies de TAG devido às várias possíveis combinações de AGs esterificados com o esqueleto do glicerol a depender da composição em termos de AG da mistura de TAGs e a similaridade das propriedades químicas e físicas da maioria destas moléculas. Desta forma, técnicas clássicas como cristalização fracionada e oxidação com permanganato não permitem uma separação completa de diferentes grupos de TAG, tornando este tipo de análise semiquantitativa.⁴ Entre as décadas de 1950 e 1960, o desenvolvimento de novas técnicas analíticas, dentre as quais podemos destacar as cromatográficas e as enzimáticas, ajudou a superar tais dificuldades. No que diz respeito aos dias atuais, avanços na tecnologia operacional de técnicas cromatográficas bem como o uso de

modos sofisticados de detecção facilitam ainda mais a análise estrutural de TAGs.

A determinação qualitativa e quantitativa de misturas de TAGs tem grande importância nos mais variados campos da ciência e indústria. Ao longo dos anos, por exemplo, a análise composicional de TAGs presentes em óleos e gorduras comestíveis tem possibilitado o conhecimento sobre o padrão de TAGs que determinadas misturas possuem. Estas informações são de suma importância para a indústria alimentícia no que diz respeito a análises químicas que visam à confirmação de autenticidade, detecção de adulteração e descoberta da composição de novas misturas. Estes procedimentos são de grande utilidade tanto do ponto de vista econômico quanto de saúde humana.

Outros exemplos da importância da análise composicional de TAGs são o entendimento do metabolismo de lipídeos de um ponto de vista bioquímico, com a adição de determinados AGs em específicas posições no esqueleto do glicerol a partir de sínteses enzimáticas, contrastando com sínteses químicas; além da percepção de propriedades físicas de óleos e gorduras, as quais dependem significativamente da composição dos mesmos em termos de TAG. Informações composicionais de TAGs em uma mistura, por exemplo, são essenciais para o controle de reações industriais como hidrogenação e interesterificação, através das quais ocorrem alterações de composição de TAGs.¹

Diversas revisões presentes na literatura mostram que as principais técnicas utilizadas para a determinação de TAGs são a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) e a cromatografia gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*), combinadas ou não com detecção por espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*).^{1,5-7} A presente revisão não foge deste padrão, no entanto, existem publicações que fazem uso de outras técnicas analíticas com o mesmo fim.

No intuito de demonstrar o quantitativo de trabalhos científicos nos últimos anos, foi utilizado o banco de dados *ScienceDirect* utilizando as palavras-chave: *triacylglyceride* (TAG) e as técnicas de separação, *high performance liquid chromatography* (HPLC), *gas chromatography* (GC), *cromatografia líquida de ultra pressão* (UPLC, do inglês *ultra pressure liquid chromatography*) e *cromatografia de fluido supercrítico* (SFC, do inglês *supercritical fluid chromatography*), conforme indicado na Figura 2.

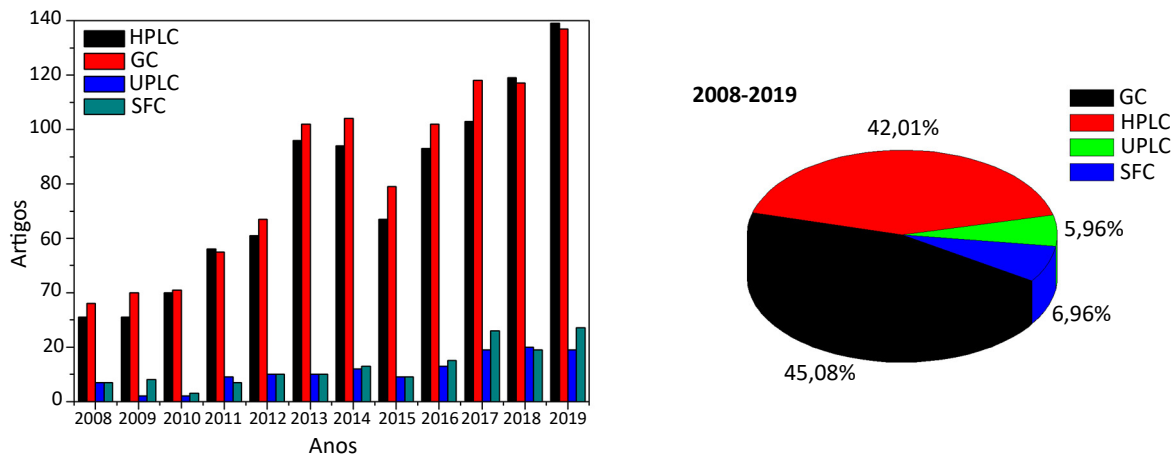


Figura 2. Levantamento bibliográfico de artigos científicos relacionando a análise de triacilglicerídeos (TAGs) e derivados empregando quatro técnicas analíticas de separação: cromatografia gasosa (GC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC) e cromatografia de fluido supercrítico (SFC) nos últimos anos

De acordo com os resultados apresentados na Fig.2 pode-se observar que o uso de técnicas cromatográficas é amplamente utilizada para a análise de TAGs e seus derivados, com destaque no uso das técnicas analíticas de GC e HPLC.

A presente revisão objetiva compilar as principais referências mais recentes que fizeram uso das principais técnicas de análise da composição de TAGs. Simultaneamente à análise

estrutural de TAGs, estudos trazem também resultados quanto à conversão destes compostos em ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, do inglês *fatty acid methyl esters*), normalmente por meio de transesterificação. No entanto, não serão feitas referências quanto à análise de FAME, uma vez que esta revisão estará mais direcionada aos parâmetros analíticos da análise das moléculas de TAG.

Tabela 1. Classificação, estrutura e possíveis fontes de ácidos graxos comuns

AG	Nome comum	Fórmula	Tamanho da cadeia	Fonte
4:0	Butírico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$	Curta	Manteiga, lactícínios
6:0	Caproico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CO}_2\text{H}$	Curta	Côco, amêndoa de palma
8:0	Caprílico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}_2\text{H}$	Curta/média	Babaçu, amêndoa de palma, milho
10:0	Cáprico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}_2\text{H}$	Média	Manteiga, babaçu, amêndoa de palma, milho
12:0	Láurico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$	Média	Côco, babaçu, amêndoa de palma
14:0	Mirístico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}_2\text{H}$	Média	Manteiga, babaçu, amêndoa de palma, milho
16:0	Palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}_2\text{H}$	Média	Manteiga, manteiga de cacau, algodão, banha de porco, dendê

Continua...

Continuação...

18:0	Esteárico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}_2\text{H}$	Média	Manteiga de cacau, sebo bovino
18:1 9c	Oleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CO}_2\text{H}$	Média	Farelo de arroz, oliva, gergelim, amendoim, dendê, banha de porco
18:2 9c12c	Linoleico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{CO}_2\text{H}$	Média	Milho, algodão, soja, girassol
18:3 9c12c15c	Linolênico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}_2\text{H}$	Média	Linhaça
20:1 13c	Erúcico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{CO}_2\text{H}$	Longa	Colza com alto teor erúcico
20:5 5c8c11c14c17c	Eicosapentaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}$	Longa	Peixes e gorduras animais
22:6 4c7c10c13c16c19c	Docosa-hexaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_6\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$	Longa	Peixes e gorduras animais

2. Técnicas de Análise

2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A aplicação de técnicas cromatográficas para a análise de TAGs foi revisada extensiva e detalhadamente até o ano de 2004 por Buchgraber e colaboradores.¹

Estudos que fazem uso da técnica HPLC para determinação composicional de TAGs constituem a grande maioria das referências avaliadas na presente revisão. Tal fato é concordante com a literatura, a qual aponta esta técnica como a mais comumente empregada na separação de misturas de TAGs. Com exceção de Lee e colaboradores (2013),²⁰ os quais utilizaram coluna de C30, todas as referências citadas nesta seção fizeram uso de HPLC em fase reversa com coluna de C18 quimicamente ligado à sílica. Na HPLC em fase reversa, a qual se caracteriza pelo uso de fase estacionária apolar e fase móvel polar, os mecanismos de separação de TAGs envolvem tamanho da cadeia e grau de insaturação dos ácidos graxos (cada ligação dupla reduz o número efetivo de carbonos do TAG em duas unidades). Na Tabela 2 são encontrados parâmetros e aspectos da literatura revisada referente à técnica de HPLC. Acetonitrila foi utilizada como constituinte da fase móvel

em todos os estudos citados, mesmo que a eluição tenha sido realizada de forma isocrática ou em gradiente, com adição de diferentes solventes atuando como modificador da fase móvel. Com exceção de Guan e colaboradores (2016),⁸ Holcapek e Lisa (2009),⁹ Lisa e Holcapek (2008),¹⁰ Gao e colaboradores (2016),¹¹ os quais usaram detecção por ultravioleta (UV) e MS em série e Appaiah e colaboradores (2014),¹² Jeyarani e Reddy (2010),¹³ Kim e Marangoni (2017),¹⁴ os quais usaram detecção por índice de refração (RI, do inglês *refractive index*), os demais autores fizeram uso de detector evaporativo de espalhamento de luz (ELSD, do inglês *evaporative light scattering detector*), que apresenta vantagens de poder ser utilizado tanto em eluições isocráticas quanto em gradientes complexos e ser compatível com a detecção de qualquer tipo de substância menos volátil que o eluente. Valores de temperatura da coluna cromatográfica, quando especificados, variaram entre 20 e 40 °C. Dentre os objetivos buscados pela análise estrutural de TAGs nos trabalhos citados, podem ser destacados: caracterização de TAGs formados após interesterificação entre diferentes matérias-primas e possível relação da composição de TAGs com outras propriedades físicas e químicas;^{13,15-18} investigação de propriedades de matérias-primas pouco estudadas,^{11,19} e comprovação de adulteração e modificação de alimentos e óleos.^{20,21}

Tabela 2. Parâmetros e aspectos da análise composicional de triacilgliceróis por cromatografia líquida de alta eficiência

Amostra	Dimensões, fase estacionária, e temperatura da coluna	Fase móvel	Fluxo (mL/min)	Detector	Tempo de análise e nº de TAGs identificados	Referência
Mistura interesterificada de óleos de canola e girassol	250 x 4,6 mm, 5 µm; C18; NC	Acetonitrila-clorofórmio	NC	ELSD	NC 15 TAGs	Ahmadi <i>et al</i> (2008) ¹⁶
Óleos vegetais de importância industrial	300 x 3,9 mm; 150 x 3,9 mm, 4 µm; C18; 25 °C	Acetonitrila; 2-propanol	1,0	UV-MS	110 min 264 TAGs	Lisa e Holcapek (2008) ¹⁰
93 óleos vegetais	300 x 3,9 mm; 150 x 3,9 mm, 4 µm; C18; 25 °C	Acetonitrila; 2-propanol	1,0	MS	110 min 355 TAGs	Holcapek e Lisa (2009) ⁹
Óleo de castanha	250 x 4,6 mm, 5 µm; C18; 20 °C	Acetona-acetonitrila	1,0	ELSD	NC 13 TAGs	Barreira <i>et al</i> (2009) ¹⁹
Manteiga de cacau	250 x 4,6 mm, 5 µm; C18; 30 °C	Clorofórmio-acetonitrila-acetona	NC	ELSD	NC 11 TAGs	Marty e Marangoni (2009) ³⁰
Mistura interesterificada de óleos vegetais	300 x 3,9 mm, 5 µm; C18; 36 °C	Acetona-acetonitrila	1,0	RI	NC 10 TAGs	Jeyarani e Reddy (2010) ¹³
Óleo de sésamo	250 x 4,6 mm, 5 µm; C30; NC	Acetonitrila; 2-propanol	1,2	ELSD	60 min 14 TAGs	Lee <i>et al</i> (2013) ²⁰
Mistura interesterificada de banha e óleo de soja	150 x 4,6 mm, 4 µm; C18; 40 °C	Diclorometano; acetonitrila	1,2	ELSD	45 min 20 TAGs	Xie e Qi (2013) ¹⁷
Mistura interesterificada de banha e óleo de soja	150 x 4,6 mm, 4 µm; C18; 40 °C	Diclorometano; acetonitrila	NC	ELSD	45 min 20 TAGs	Xie e Chen (2014) ¹⁵
Cogumelos comestíveis	250 x 4,6 mm, 5 µm; C18; 20 °C	Acetona-acetonitrila	1,0	ELSD	NC 12 TAGs	Fernandes <i>et al</i> (2014) ²¹
Óleo de côco	250 x 4,0 mm, 5 µm; C18; NC	Acetona-acetonitrila	1,0	RI	30 min 20 TAGs	Appaiah <i>et al</i> (2014) ¹²
Lactícínios	250 x 4,6 mm, 5 µm; C18; NC	Acetona-acetonitrila-clorofórmio	NC	ELSD	156 min 13 TAGs	Vieitez <i>et al</i> (2016) ²⁷
Óleo de colza	150 x 4,6 mm, 5 µm; C18; 35 °C	Acetonitrila; 2-propanol	1,0	MS/MS	28 min 41 TAGs	Guan <i>et al</i> (2016) ⁸
Óleos de sésamo, amendoim e açafrão	250 x 4,6 mm, 5 µm; C18; 40 °C	Acetona-acetonitrila	1,0	RI	NC 18 TAGs	Kim e Marangoni (2017) ¹⁴
Fórmulas infantis	250 x 4,6 mm, 5 µm; C18; NC	Acetonitrila; 2-propanol	0,8	ELSD-MS	120 min 58 TAGs	Sun <i>et al</i> (2018) ²⁸
Mistura de óleo de coco e palma	150 x 3,9 mm 4 µm; C18; 40 °C	Acetonitrila; 2-propanol-hexano	1,0	ELSD	70 min 13 TAGs	Shin, <i>et al</i> (2019) ¹⁸

NC = dados não citados na referência. ELSD = detector evaporativo de espalhamento de luz. UV = ultravioleta. MS = espectrometria de massas.

RI = índice de refração. TAGs = triacilgliceróis.

Tabela 3. Parâmetros e aspectos da análise composicional de triacilgliceróis por cromatografia gasosa

Amostra	Dimensões e fase estacionária da coluna Modo de injeção	Rampa de aquecimento do forno	Referência
Mistura interesterificada de gordura de frango, estearina e TAGs de cadeia média	15m x 0,25 mm x 0,15 µm, 50%-fenil-50%-metilpolissiloxano Split (1:30)	250 °C → 350 °C (5 °C/min)	Chiu e Gioielli (2008) ²⁴
Mistura interesterificada de óleo de canola e óleo de algodão	15 m x 0,25 mm x 0,15 µm, 50%-fenil-50 % -metilpolissiloxano, Split (1:100)	250 °C → 350 °C (5 °C/min)	Ribeiro <i>et al</i> (2009) ²³
Gorduras do leite	2,5 m x 0,32 mm x 0,05 µm, 100% dimetilpolissiloxano PTV	250 °C → 350 °C (60 °C/min)	Povolo e Contarini (2009) ³³
Óleos de referência, comerciais e extratos de sementes	30 m x 0,25 mm x 0,10 µm, 65% difenil-35 %-metilpolissiloxano On-column	130 °C → 300 °C (30 °C/min) 300 °C → 365 °C (4 °C/min) 7 min	Moldoveanu e Chang (2011) ³⁴
Óleos de microalgas	8 m x 0,25 mm x 0,10 µm, 5%-fenil-95 %-metilpolissiloxano Split (1:10)	360 °C → 370 °C (5 °C/min) 370 °C → 390 °C (20 °C/min) 2 min	Soares <i>et al</i> (2013) ²⁶
Mistura interesterificada de óleo de girassol e óleo de palma	15 m x 0,25 mm x 0,15 µm, 50%-fenil-50 % -metilpolissiloxano Split (1:100)	250 °C → 350 °C (5 °C/min)	Masuchi <i>et al</i> (2014) ²⁵
Óleos de sésamo, amendoim e açafrão	30 m x 0,32 mm x 0,15 µm, 50%-fenil-50 % -metilpolissiloxano Split (1:30)	NC	Kim e Marangoni (2017) ¹⁴
Manteiga de cacau, óleos de palma e canola	30 m x 0,25 mm x 0,10 µm, 65% difenil-35 %-metilpolissiloxano Split (1:50)	250 °C → 360 °C (4 °C/min) 25 min	Yoshinaga <i>et al</i> (2017) ²²

PTV = injeção com temperatura de vaporização programável. NC = dados não citados na referência.

2.2. Cromatografia Gasosa (GC)

O uso de cromatografia gasosa para análise de TAGs foi revisado extensivamente por Ruiz-Samblás e colaboradores (2013).⁶

Na Tabela 3 são encontrados de forma resumida parâmetros e aspectos da literatura referente à utilização da técnica de cromatografia gasosa para análise da composição de TAGs.

Na grande maioria dos estudos recentes que fizeram uso da técnica de GC para a análise composicional de TAGs, nas mais diversas amostras de óleos ou gorduras, foi utilizado detector de ionização em chama (FID, do inglês *flame ionization detector*) e MS, os quais se tratam de detectores universais para este tipo de análise. Yoshinaga e colaboradores (2017) utilizaram FID com coluna capilar de 65%-difenil-35%-dimetilpolissiloxano e injeção em modo *Split* para determinação estrutural de TAGs presentes em gorduras e óleos comestíveis.²² Ribeiro e colaboradores (2009) também fizeram uso do modo de injeção *Split*, porém a separação foi feita em coluna capilar de

50%-fenil-50 %-metilpolissiloxano com o intuito de caracterizar TAGs formados após interesterificação entre óleos de canola e de algodão totalmente hidrogenado e relacionar composição de TAGs com outras propriedades físicas e químicas, como comportamento térmico, polimorfismo e cristalização.²³ A utilização de colunas capilares polares, diferentemente de colunas apolares, as quais separam moléculas somente de acordo com o tamanho de sua cadeia, ou seja, pelo número de carbonos, proporciona discriminação entre TAGs em termos de insaturações de seus ácidos graxos. Outros dois estudos similares utilizaram FID para análise de TAGs pós-interesterificação, simultaneamente a propriedades físico-químicas como ponto de fusão e índice de saponificação. Enquanto Chiu e Gioielli (2008) realizaram interesterificação envolvendo gordura de frango, estearina e TAGs de cadeia média,²⁴ Masuchi e colaboradores (2014) modificaram estruturalmente óleos de girassol com alto teor oleico de palma totalmente hidrogenado.²⁵ Ambos utilizaram condições cromatográficas similares

às de Ribeiro e colaboradores (2009).²³ Soares e colaboradores (2013) utilizaram coluna capilar de caráter apolar (5%-fenil-95%-metilpolisiloxano) para caracterização de TAGs encontrados em microalgas, visando posterior utilização dos mesmos para produção de biodiesel.²⁶

Outros dois trabalhos levaram em consideração um importante aspecto discutido na literatura: o modo de injeção em GC para análise de TAGs.²⁹⁻³¹ As técnicas de injeção em GC utilizando colunas capilares podem ser divididas em injeção direta na coluna (*on-column*) e injeção em um vaporizador com ou sem divisão de fluxo (*Split/splitless*). As altas massas moleculares das moléculas de TAG requerem a utilização de elevadas temperaturas para que sejam vaporizadas e eluídas. Métodos de injeção *Split/splitless* em altas temperaturas estão muitas vezes associados à degradação térmica das moléculas de TAG, a qual pode ser evitada ao utilizar-se a injeção *on-column* em baixas temperaturas ou a injeção com temperatura de vaporização programável do injetor (PTV, do inglês *programmed temperature vaporizer*). Como destacado por Matisova e Domotorova (2003), a maioria das análises realizadas por GC convencional em colunas capilares proporcionam tempos de análises entre 10 e 60 minutos, a depender do tipo de análise, número de componentes a serem analisados e condições experimentais utilizadas.³² Visando uma análise em menores tempos, Pavolo e Contarini (2009) propuseram a utilização de *Fast GC* para determinação de TAGs em gorduras de amostras de leite, com injeção em temperatura mais amena em injetor PTV, com tempo total de análise de 3,5 min.³³ Por outro lado, Moldoveanu e Chang (2011) além de realizarem análise de TAGs de algumas matérias-primas comuns com temperatura inicial de injeção *on-column* de 130 °C, também propuseram uma análise dual, utilizando FID para quantificação e MS para identificação dos TAGs.³⁴

2.3. Outras técnicas cromatográficas

A criação de fases estacionárias com tamanho de partícula cada vez menor possibilitou o desenvolvimento da técnica de cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC). Omar e colaboradores (2017) utilizaram tal técnica para caracterização de TAGs com o intuito de controlar a reação de hidrólise enzimática de

gorduras derivadas do leite,³⁵ enquanto que Abed e colaboradores (2017) determinaram a composição de TAGs em amostras de óleo *single-cell* produzidos por fungos através desta técnica.³⁶ Yang e colaboradores (2019)³⁷ e Leskinen e colaboradores (2010)³⁸ também fizeram uso de UPLC para análise da composição de TAGs de óleos comestíveis. Nos quatro trabalhos citados foram usadas colunas compostas por C18 e detecção por MS. Nos dois primeiros estudos mencionados, a coluna (45 °C) apresentava dimensões de 50 mm x 2,1 mm, com 1,9 µm de tamanho de partícula. Duas fases móveis foram utilizadas: acetonitrila:álcool isopropílico (1:9 v/v) e 40 % acetonitrila, com fluxo de 300 µL/min. No terceiro estudo foi utilizada a mesma coluna porém a 35 °C e duas fases móveis: acetonitrila:metanol:água (19:19:2 v/v/v) e álcool isopropílico como mesmo fluxo dos estudos anteriores. No último estudo que fez uso da técnica, a coluna (21 °C) apresentava dimensões de 100 mm x 2,1 mm, com 1,7 µm de tamanho de partícula. O gradiente da fase móvel consistia de acetona (A) e acetonitrila (B), com fluxo de 0,4 mL/min.

Outra técnica cromatográfica pode ser destacada na literatura quanto a sua utilização para determinação composicional de TAGs: a cromatografia em fluido supercrítico (SFC). Em SFC, solventes ou gases sob condições supercríticas, geralmente misturas binárias ou ternárias tendo dióxido de carbono como principal componente, são empregados, com o intuito de expandir a capacidade da cromatografia gasosa. Tal técnica acoplada à MS foi utilizada por Rodríguez-Meizoso e colaboradores (2019), Gao e colaboradores (2017) e Zhou e colaboradores (2014) para determinação da composição de TAGs em amostras de artérias pulmonares de porcos, óleos comestíveis e gorduras do leite de vaca, respectivamente.³⁹⁻⁴¹ Nos três estudos, foi utilizada coluna com dimensões de 150 mm x 3,0 mm, com 1,7 µm de tamanho de partícula. No primeiro trabalho, a coluna de diol foi mantida a 50 °C e foram utilizados CO₂ (A) e metanol contendo modificador químico (B) como eluente com fluxo de 1,6 mL/min. No segundo trabalho, a coluna de C18 foi mantida a 30 °C e, como eluente, foram utilizados CO₂ (A) e metanol (B), com fluxo de 0,3 mL/min. No terceiro trabalho, uma coluna de 2-etilpiridina foi mantida a 50 °C e como eluente, foram utilizados CO₂ (A) e acetonitrila:etanol 1:1 v/v (B), com fluxo de 1,2 mL/min.

Tu e colaboradores (2017) desenvolveram um método baseado em SFC acoplado a MS para determinar comparativamente a composição de TAGs de leite humano em diferentes estágios de lactação, bem como de fórmulas infantis.⁴² Foi utilizada coluna de 2-etilpiridina (50 °C), com dimensões de 100 mm x 3,0 mm, 1,7 µm. CO₂ supercrítico foi utilizado como solvente A, e metanol:acetonitrila:ácido fórmico 50:50:0,1 v/v/v como solvente B, com fluxo de 1,0 mL/min.

2.4. Análise estereoespecífica

Um método comumente utilizado para determinação composicional de TAGs, pela elucidação estereoespecífica quanto à posição no esqueleto de glicerol na qual os AGs podem estar esterificados, é realizado através de reação de hidrólise enzimática. O princípio deste método baseia-se em teorias propostas por Vander Wal (1960) e Coleman e Fulton (1961) as quais assumem que: (1) as posições *sn*-1 e *sn*-3 são equivalentes; (2) a composição de AG na posição *sn*-2 e nas posições *sn*-1 e *sn*-3 é diferente e independente; (3) os AGs ocupando a posição *sn*-2 bem como os que ocupam as posições *sn*-1 e *sn*-3 são distribuídos aleatoriamente. A utilização de lipases pancreáticas possibilitam uma hidrólise seletiva dos AGs nas posições *sn*-1,3 dos TAGs, produzindo 2-monoacilgliceróis e AGs.^{43,44} A molécula de 2-monoacilglicerol formada pode ser separada e convertida a FAMES para posterior análise cromatográfica. O procedimento é então confirmado pela comparação da composição de AGs do TAG original e dos que restam após hidrólise parcial. Tal método, seguido de etapa de transesterificação e análise por GC, simultaneamente ou não a técnicas cromatográficas para análise composicional de TAGs, foi utilizada por Gao e colaboradores (2016),¹¹ Xie e Chen (2014),¹⁵ Abed e colaboradores (2017),³⁶ Segura e colaboradores (2015),⁴⁵ e Xie e Qi (2013).¹⁷

3. Considerações Finais

O uso de diferentes técnicas analíticas para análise de TAGs nos últimos anos foi revisado, nos mais diversos tipos de amostras lipídicas e com uma variedade de objetivos. Pode-se perceber que as técnicas cromatográficas dominam

este campo da ciência, e avanços tecnológicos nesta área, tanto em termos operacionais quanto visando o desenvolvimento de novas fases estacionárias, tendem a trazer cada vez mais novas metodologias que venham a suprir dificuldades apresentadas experimentalmente. Foram revisados estudos nos quais foram realizadas com sucesso análises composicionais de TAGs por meio de HPLC, GC, UPLC e SFC com diferentes maneiras de detecção (FID, MS, UV, ELSD, RI). Comparando as quatro técnicas, a GC apresenta uma desvantagem que está relacionada a dificuldade de volatilização das moléculas de TAG devido ao elevado tamanho das suas cadeias, sendo necessária a utilização de colunas de alta temperatura. Em termos de custos operacionais, tempos de análise, limites de detecção e de quantificação as técnicas de GC e HPLC são muito semelhantes. Por outro lado, as técnicas mais modernas, UPLC e SFC são mais rápidas e mais sensíveis. Além disso, a análise estrutural completa das posições *sn*-1,2,3 nas quais os ácidos graxos encontram-se esterificados na molécula de triacilglicerol, fornecida principalmente por métodos enzimáticos, se faz necessária dos pontos de vista fisiológicos e nutricionais, uma vez que gorduras consumidas na dieta do ser humano são absorvidas principalmente como AGs livres ou como 2-monoacilgliceróis.

Agradecimentos

Os autores agradecem às agências de fomento FINEP, CNPq, CAPES, FAPEAL e ao INCT-Catálise. LNM, SMPM e MRM agradecem ao CNPq por suas bolsas de pesquisa. Todos os autores agradecem à Capes pelo uso do Portal Periódicos Capes.

Referências Bibliográficas

- ¹Buchgraber, M.; Ulberth, F.; Emons, H.; Anklam, E. Triacylglycerol profiling by using chromatographic techniques. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2004**, *106*, 621. [CrossRef]
- ²Scrimgeour, C. Em *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*; Shahidi, F., eds.; 6a ed., John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2005, cap. 1. [CrossRef]
- ³Knothe, G.; Gerpen, J. Van; Krahl, J.; Ramos, L. P.; *Manual de Biodiesel*, Editora Edgard Blücher: São Paulo, 2006.

- ⁴ Litchfield, C.; *Analysis of Triglycerides*, Academic Press: New York, 1972. [[Link](#)]
- ⁵ Lipp, M. Review of methods for the analysis of triglycerides in milk fat: application for studies of milk quality and adulteration. *Food Chemistry* **1995**, *54*, 213. [[CrossRef](#)]
- ⁶ Ruiz-Samblás, C.; González-Casado, A.; Cuadros-Rodríguez, L. Triacylglycerols Determination by High-temperature Gas Chromatography in the Analysis of Vegetable Oils and Foods: A Review of the Past 10 Years. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2015**, *55*, 1618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷ Ruiz-Gutiérrez, V.; Barron, L. J. R. Methods for the analysis of triacylglycerols. *Journal of Chromatography B: Biomedical Applications* **1995**, *671*, 133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸ Guan, M.; Chen, H.; Xiong, X.; Lu, X.; Li, X.; H, F.; Guan, C. A Study on Triacylglycerol Composition and the Structure of High-Oleic Rapeseed Oil. *Engineering* **2016**, *2*, 258. [[CrossRef](#)]
- ⁹ Holcapek, M.; Lisa, M. Statistical evaluation of triacylglycerol composition by HPLC/APCI-MS. *Lipid Technology* **2009**, *21*, 261. [[CrossRef](#)]
- ¹⁰ Lisa, M.; Holcapek, M. Triacylglycerols profiling in plant oils important in food industry, dietetics and cosmetics using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1198*, 115. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹¹ Gao, F.; Yang, S.; Birch, J. Physicochemical characteristics, fatty acid positional distribution and triglyceride composition in oil extracted from carrot seeds using supercritical CO₂. *Journal of Food Composition and Analysis* **2016**, *45*, 26. [[CrossRef](#)]
- ¹² Appaiah, P.; Sunil, L.; Kumar, P. K. P.; Krishna, A. G. G. Composition of Coconut Testa, Coconut Kernel and its Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2014**, *91*, 917. [[CrossRef](#)]
- ¹³ Jeyarani, T.; Reddy, S. Y. Effect of enzymatic interesterification on physicochemical properties of mahua oil and kokum fat blend. *Food Chemistry* **2010**, *123*, 249. [[CrossRef](#)]
- ¹⁴ Kim, G. Y.; Marangoni, A. G. Crystallization Behavior of High Behenic Acid Stabilizers in Liquid Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2017**, *94*, 1165. [[CrossRef](#)]
- ¹⁵ Xie, W.; Chen, J. Heterogeneous Interesterification of Triacylglycerols Catalyzed by Using Potassium-Doped Alumina as a Solid Catalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 10414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Ahmadi, L.; Wright, A. J.; Marangoni, A. J. Chemical and enzymatic interesterification of tristearin/triolein-rich blends: Chemical composition, solid fat content and thermal properties. *European Journal of Lipid Science and Technology* **2008**, *110*, 1014. [[CrossRef](#)]
- ¹⁷ Xie, W.; Qi, C. Interesterification of Soybean Oil and Lard Blends Catalyzed by SBA-15-pr-NR3OH as a Heterogeneous Base Catalyst. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 3373. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ Shin, J.-A.; Heo, Y.-J.; Lee, K.-T. Physicochemical characteristics of fat blend from hydrogenated coconut oil and acyl migrated palm mid-fraction. *Food Chemistry* **2019**, *275*, 739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Barreira, J. C. M.; Casal, S.; Ferreira, I. C. F. R.; Oliveira, M. B. P. P.; Pereira, J. A. Nutritional, Fatty Acid and Triacylglycerol Profiles of Castanea sativa Mill. Cultivars: A Compositional and Chemometric Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 2836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Lee, W.; Su, N.; Lee, M.; Lin, J. Assessment of authenticity of sesame oil by modified Villavecchia Test and HPLC-ELSD analysis of triacylglycerol profile. *Food Research International* **2013**, *53*, 195. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Fernandes, A.; Barreira, J. C. M.; Antonio, A. L.; Martins, A.; Ferreira, I. C. F. R.; Oliveira, M. B. P. P. Triacylglycerols profiling as a chemical tool to identify mushrooms submitted to gamma or electron beam irradiation. *Food Chemistry* **2014**, *159*, 399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²² Yoshinaga, K.; Obi, J.; Nagai, T.; Iioka, H.; Yoshida, A.; Beppu, F.; Gotoh, N. Quantification of Triacylglycerol Molecular Species in Edible Fats and Oils by Gas Chromatography-Flame Ionization Detector Using Correction Factors. *Journal of Oleo Science* **2017**, *66*, 259. [[CrossRef](#)]
- ²³ Ribeiro, A. P. B.; Basso, R. C.; Grimaldi, R.; Gioielli, L. A.; dos Santos, A. O.; Cardoso, L. P.; Gonçalves, L. A. G. Influence of chemical interesterification on thermal behavior, microstructure, polymorphism and crystallization properties of canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. *Food Research International* **2009**, *42*, 1153. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Chiu, M. C.; Gioielli, L. A. Lípidios estruturados obtidos a partir da mistura de gordura de frango, sua estearina e triacilgliceróis de cadeia média. I- Composição em ácidos graxos e em triacilgliceróis. *Química Nova* **2008**, *31*, 232. [[CrossRef](#)]

- ²⁵ Masuchi, M. H.; Gandra, K. M.; Marangoni, A. L.; Perenha, C. S.; Chiu, M. C.; Grimaldi, R.; Gonçalves, L. A. G. Fats from Chemically Interesterified High-Oleic Sunflower Oil and Fully Hydrogenated Palm Oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **2014**, *91*, 859. [[CrossRef](#)]
- ²⁶ Soares, A. T.; Silva, B. F.; Fialho, L. L.; Pequeno, M. A. G.; Vieira, A. A. H.; Souza, A. G.; Antoniosi Filho, N. R. Chromatographic characterization of triacylglycerides and fatty acid methyl esters in microalgae oils for biodiesel production. *Journal of Renewable and Sustainable Energy* **2013**, *5*, 053111. [[CrossRef](#)]
- ²⁷ Vieitez, I.; Irigaray, B.; Callejas, N.; González, V.; Gimenez, S.; Arechavaleta, A. Composition of fatty acids and triglycerides in goat cheeses and study of the triglyceride composition of goat milk and cow milk blends. *Journal of Food Composition and Analysis* **2016**, *48*, 95. [[CrossRef](#)]
- ²⁸ Sun, C.; Wei, W.; Zou, X.; Huang, J.; Jin, Q.; Wang, X. Evaluation of triacylglycerol composition in commercial infant formulas on the Chinese market: A comparative study based on fat source and stage. *Food Chemistry* **2018**, *252*, 154. [[CrossRef](#)]
- ²⁹ Hinshaw, Jr., J. V.; Seferovic, W. Analysis of triglycerides by capillary gas chromatography with programmed-temperature injection. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications* **1986**, *9*, 731. [[CrossRef](#)]
- ³⁰ Lozada, L.; de la Fuente, M. A.; Fontecha, J.; Juárez, M. Considerations of the quantitative aspect of the determination of milkfat triglycerides with split PTV and on-column injection. *Journal of High Resolution Chromatography* **1995**, *18*, 771. [[CrossRef](#)]
- ³¹ Buchgraber, M.; Ulberth, F.; Anklam, E. Interlaboratory evaluation of injection techniques for triglyceride analysis of cocoa butter by capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2004**, *1036*, 197. [[CrossRef](#)]
- ³² Matisova, E.; Domotorova, M. Fast gas chromatography and its use in trace analysis. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000*, 199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³³ Povolo, M.; Contarini, G. Fast gas chromatography: Applications in milk fat analysis. *Lipid Technology* **2009**, *21*, 88. [[CrossRef](#)]
- ³⁴ Moldoveanu, S. C.; Chang, Y. Dual Analysis of Triglycerides from Certain Common Lipids and Seed Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 2137. [[CrossRef](#)]
- ³⁵ Omar, K. A.; Gounga, M. E.; Liu, R.; Mwinyi, W.; Aboshora, W.; Ramadhan, A. H.; Sheha, K. A.; Wang, X. Triacylglycerol composition, melting and crystallization profiles of lipase catalysed anhydrous milk fats hydrolysed. *International Journal of Food Properties* **2017**, *20*, 1230. [[CrossRef](#)]
- ³⁶ Abed, S. M.; Zou, X.; Ali, A. H.; Jin, Q.; Wang, X. Profiling of triacylglycerol composition in arachidonic acid single cell oil from *Mortierella alpina* by using ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis* **2017**, *62*, 245. [[CrossRef](#)]
- ³⁷ Wei, W.; Sun, C.; Jiang, W.; Zhang, X.; Hong, Y.; Jin, Q.; Tao, G.; Wang, X.; Yang, Z. Triacylglycerols fingerprint of edible vegetable oils by ultra-performance liquid chromatography-Q-ToF-MS. *LWT - Food Science and Technology*, **2019**, *112*, 108261. [[CrossRef](#)]
- ³⁸ Leskinen, H. M.; Suomela, J.; Kallio, H. P. Quantification of triacylglycerol regioisomers by ultra-high-performance liquid chromatography and ammonia negative ion atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2010**, *24*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁹ Gil-Ramirez, A.; Al-Hamimi, S.; Rosmark, O.; Hallgren, O.; Larsson-Callerfelt, A.-K.; Rodríguez-Meizoso, I. Efficient methodology for the extraction and analysis of lipids from porcine pulmonary artery by supercritical fluid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **2019**, *1592*, 173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Gao, B.; Luo, Y.; Lu, W.; Liu, J.; Zhang, Y.; Yu, L. Triacylglycerol compositions of sunflower, corn and soybean oils examined with supercritical CO₂ ultra-performance convergence chromatography combined with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry* **2017**, *218*, 569. [[CrossRef](#)]
- ⁴¹ Zhou, Q.; Gao, B.; Zhang, X.; Xu, Y.; Shi, H.; Yu, L. Chemical profiling of triacylglycerols and diacylglycerols in cow milk fat by ultra-performance convergence chromatography combined with a quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Food Chemistry* **2014**, *143*, 199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴² Tu, A.; Ma, Q.; Bai, H.; Du, Z. A comparative study of triacylglycerol composition in Chinese human milk within different lactation stages and imported infant formula by SFC coupled with Q-TOF-MS. *Food Chemistry* **2017**, *221*, 555. [[CrossRef](#)]

⁴³ Vander Wal, R. J. The glyceride structure of fats and oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **1960**, *37*, 595. [[CrossRef](#)]

⁴⁴ Coleman, M. H.; Fulton, W. C.; *Enzymes of Lipid Metabolism*, Pergamon Press: New York, 1961.

⁴⁵ Segura, J.; Escudero, R.; Ávila, M. D. R.; Cambero, M. I.; López-Bote, C. J. Effect of fatty acid composition and positional distribution within the triglyceride on selected physical properties of dry-cured ham subcutaneous fat. *Meat Science* **2015**, *103*, 90. [[CrossRef](#)].