

# DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO TRIACILGLICERÓLICA DE ÓLEOS VEGETAIS POR CLAE, A PARTIR DA DISTRIBUIÇÃO 1, 2, 3 - CASUAL<sup>1</sup>

REGINA CELI ARAUJO LAGO<sup>2</sup>, FREDERICO AUGUSTO RODRIGUES DE SIQUEIRA<sup>3</sup>  
e LEOPOLD HARTMAN<sup>4</sup>

**RESUMO** - Foi montado um programa em linguagem BASIC e executado em microprocessador HP-85 para cálculo da distribuição estatística dos ácidos graxos nas moléculas triacilglicéricas de óleos e gorduras. Com base nas estruturas resultantes do cálculo foi possível identificar os triacilglicéris dos óleos de dendê, polpa de macaúba e gordura de candellilo, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Termos para indexação: triacilglicéris, óleo de dendê, óleo de polpa de macaúba, gordura de candellilo.

## DETERMINATION OF THE TRIACYLGLYCEROL COMPOSITION OF VEGETABLE OILS BY HPLC, BASED ON 1, 2, 3 - RANDOM DISTRIBUTION

**ABSTRACT** - A program for computation was written in BASIC and executed in a HP-85 microprocessor for calculating the random distribution of fatty acids into triacylglycerol molecules. According to the resulting structures, the triacylglycerols of palm oil, macaúba pulp oil and candellilo fat, analysed by high performance liquid chromatography (HPLC), were identified.

Index terms: triacylglycerols, palm oil, macauba pulp oil, candellilo fat.

## INTRODUÇÃO

Óleos e gorduras são constituídos principalmente de ésteres de ácidos graxos com glicerol, os triacilglicéris. O número de triacilglicéris presente num óleo ou numa gordura pode alcançar  $3^n$ , para  $n$  diferentes ácidos graxos constituintes.

A composição em ácidos graxos pode ser determinada, como rotina, por cromatografia a gás. Todavia, até a presente data não se dispõe de um método único para a determinação de triacilglicéris. Para tal, vêm sendo tentadas combinações de várias técnicas, como: cristalização fracionada, distribuição contracorrente, cromatografia em camada fina, coluna ou a gás, antecedidas ou não por hidrólise enzimática seletiva. Em geral, tais métodos são morosos e requerem grandes quantidades de amostra ou, ainda, apresentam baixa resolução. E os cálculos para determinar a composição triacilglicérica a partir dos dados obtidos impõem extensas manipulações algébricas (Kuksis 1972). A cromatografia a gás vem apresentando progressos. Ela possibilita a separação dos triacilglicéris pelo número de carbonos, NC, e, recentemente, o uso de colunas capilares vem-se mostrando promissor (Geeraert & Sandra 1984 e 1986).

Mas ainda é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que permite separar, sobretudo se em fase reversa, um maior número de componentes individuais, incluindo os chamados pares críticos, como C48:0 e C50:1 (EL-Hamdy & Perkins 1982), com número de partição (NP) de 48 e NC respectivos de 48 e 50. Contudo, não se conhece, até o momento, nenhum sistema capaz de separar moléculas triacilglicéricas isoméricas, como é o caso de POP (1,3 - dipalmitoil - 2 - oleoil-glicerol) e PPO (1,2 - dipalmitoil - 3 - oleoil-glicerol).

Em qualquer caso, o número de padrões comercialmente disponíveis não é equivalente aos componentes que se conseguem separar por cromatografia a gás de alta resolução ou por CLAE.

Quando se conhece apenas a composição em ácidos graxos totais, é possível estabelecer-se a composição dos triacilglicéris, com base na chamada distribuição 1, 2, 3 - casual, de acordo com cálculos estatísticos (Litchfield et al. citado por Kuksis 1972).

Procurou-se, neste trabalho, verificar até que ponto tais cálculos poderiam dispensar o uso de padrões para o estabelecimento da composição triacilglicérica dos óleos de dendê, óleo de polpa de macaúba e gordura de candellilo, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência.

<sup>1</sup> Aceito para publicação em 15 de fevereiro de 1989.

<sup>2</sup> Química., Dra.Sc., EMBRAPA/Centro Nacional de Tecnologia Agroindustrial de Alimentos (CTAA), Av. das Américas, 29.501, CEP 23020 Rio de Janeiro, RJ.

<sup>3</sup> Fís., EMBRAPA/CTAA.

<sup>4</sup> Eng. - Quím., Ph.D., EMBRAPA/CTAA.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Foram empregados óleo de dendê (*Elaeis guineensis*), da Bahia; óleo de polpa e de amêndoa de macaúba (*Acrocomia*

*aculeata*), extraídos em laboratório de cocos originários de Goiás, e gordura de candellilo (*Myristica otoba*), extraída de sementes panamenhas, usadas num estudo sobre composição do material insaponificável (Nemethy et al. 1986).

Os padrões de triacilgliceróis (OOO, POO, POP e POS) eram da Supelco Inc.

## Métodos

Composição em ácidos graxos: foi determinada por cromatografia a gás dos ésteres metílicos preparados de acordo com Hartman & Lago (1973). Usou-se cromatógrafo Varian mod. 3.700, com detector de ionização de chama a 300°C e bloco injetor a 230°C. Operou-se com coluna capilar (WCOT) de vidroborossilicato, com filme de SP-2330 de 0,2 µ de espessura, 10 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, a 170°C. A vazão de nitrogênio foi de 1 ml/min, com o divisor de amostras ajustado na proporção 32:1. As percentagens relativas dos picos foram obtidos com integrador processador CDS 111, acoplado ao cromatógrafo.

Isolamento dos triacilgliceróis: amostra de 1 g, dissolvida em 4 ml de CHCl<sub>3</sub> foi colocada no topo de uma coluna de 30 cm x 2 cm, empacotada com 30 g de ácido silícico 75-325 mesh e eluída com 500 ml de hexano: éter etílico 95:5, descartando-se os primeiros 150 ml. Os triacilgliceróis puros, como verificado pela ausência de banda de OH na região do infra-vermelho, foram recuperados após evaporação do solvente em rotavapor e, posteriormente, sob fluxo de nitrogênio.

Análise dos triacilgliceróis por CLAE: usou-se cromatógrafo líquido Beckmann mod. 322, acoplado a microprocessador Beckman 420 e ao detector de índice de refração diferencial de Waters Associates mod. R-401, termostaticado a 25°C.

As amostras foram dissolvidas em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> nas proporções de 160 mg/ml (dendê), 150 mg/ml (macaúba) e 80 mg/ml (candellilo) e introduzidas com seringa de 100 µL para válvula equipada com laço injetor de 50 µL. Além de uma pré-coluna foram empregadas, em série, três colunas de aço inoxidável de 25 cm x 0,46 cm, Altex Ultrasphere-ODS (octadecilsilano), com partículas de 5 µ. Os solventes, CH<sub>3</sub>CN: THF: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de pureza para CLAE, foram previamente desgasificados e misturados na proporção 60:20:20. Com a vazão ajustada em 1 ml/min, um cromatograma se completava em 50 min para a amostra de gordura de candellilo e em 70 min para as duas outras amostras.

As áreas dos picos foram calculadas multiplicando-se a altura pela largura a 1/2 altura. Considerou-se como altura do pico a distância de seu máximo até sua linha base individual, traçada do início ao fim da eluição dos componentes. Não foram empregadas correções no cálculo da composição pelo número limitado de padrões.

Espectrometria de massa - foi obtido espectro de massa da amostra de triacilgliceróis de gordura de candellilo em espectrômetro de massa Finnigan 4000, com técnica de ionização química, usando-se metano como gás reagente. Para identificação dos triacilgliceróis examinou-se o espectrograma em relação aos íons moleculares e a fragmentos característicos como o (M-RCOOCH<sub>2</sub>)<sup>+</sup>, que resulta exclusivamente da perda de um radical aciloximetileno da posição primária do glicerol.

Programa para o cálculo estatístico da distribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis - Utilizou-se linguagem BASIC específica. Partindo-se das frações molares

(X<sub>i</sub> = %/PM) dos ácidos graxos onde i = 1...13, calcularam-se as percentagens molares (P<sub>i</sub>) dos ácidos graxos:

$$P_i = \frac{X_i}{\sum X_i} \times 100$$

(Para um ácido graxo ausente, X<sub>i</sub> = 0).

Abriu-se uma matriz ou variável independente tridimensional utilizando-se o processo de laço triplo, usando-se os índices i, j, k, e calcularam-se todas as combinações possíveis de treze ácidos graxos, combinados três a três:

$$C_i, C_j, C_k \quad i, j, k = 1 \dots 13$$

Para manter o caráter percentual do resultado, todos os produtos foram calculados da seguinte forma:

$$M = \frac{P_i \times P_j \times P_k}{10.000} \quad i, j, k = 1 \dots 13$$

As percentagens molares dos triacilgliceróis foram calculadas a partir das expressões:

$$\begin{aligned} \text{Se } P_i = P_j = P_k &\longrightarrow \% M = M \\ \text{Se } P_i = P_j & \quad P_j = P_k &\longrightarrow \% M = 3M \\ \text{Se } P_i \neq P_j & \quad P_j \neq P_k &\longrightarrow \% M = 6M \end{aligned}$$

Calculou-se, a seguir, a soma total das percentagens molares (≅ 100%) e imprimiram-se somente aquelas que foram maiores do que 0,01%.

O laço triplo i, j, k foi encerrado após a impressão completa dos resultados.

O programa foi executado em microprocessador HP-85.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 aparece a composição em ácidos graxos (peso %) dos óleos estudados, base do cálculo estatístico da composição triacilglicerólica molar. Embora não existam diferenças no tocante ao tipo de ácidos graxos constituintes entre os óleos de dendê e de polpa de macaúba, suas proporções são bem distintas, fazendo prever diferenças marcantes na composição triacilglicerólica. A gordura de candellilo apresenta uma composição ainda mais diversa, onde um único ácido, o mirístico, ocorre num teor de 81,50%, tornando previsível a ocorrência de trimiristina como componente principal.

As percentagens em peso dos componentes triacilglicerólicos das amostras estão mostradas na Tabela 2, na ordem de eluição nos cromatogramas.

Assim, foram detectados e medidos vinte componentes no óleo de dendê, 17 no óleo de polpa de macaúba e 15 na gordura de candellilo.

Os componentes, com estruturas consideradas possíveis pelo cálculo estatístico, e de ocorrência

**TABELA 1. Composição em ácidos graxos dos óleos de dendê e de polpa de macaúba e da gordura de candellilo (peso %).**

Ácidos graxos		Óleo de dendê	Óleo de polpa de macaúba	Gordura de candellilo
Cáprico	C	—	0,02	0,11
Láurico	L	0,03	0,05	6,57
Mirístico	M	0,76	0,15	81,50
Miristoléico	Mo	—	—	2,92
Palmitico	P	41,80	17,42	4,51
Palmitoléico	Po	0,04	1,24	0,35
Estearico	S	5,00	2,47	0,44
Oléico	O	38,50	63,65	2,72
Linoléico	Li	13,50	12,30	0,31
Linolênico	Ln	0,21	1,04	—
Araquídico	A	0,08	0,06	—

**TABELA 2. Composição (peso %) dos triacilgliceróis nos cromatogramas.**

Número do componente	Óleo de dendê	Óleo de polpa de macaúba	Gordura de candellilo
1	1,41	0,45	0,12
2	4,10	0,21	0,16
3	0,41	2,09	0,28
4	tr	0,47	0,28
5	0,64	0,69	1,00
6	3,21	0,58	0,02
7	0,23	12,68	4,59
8	13,51	9,20	15,26
9	9,46	1,29	2,59
10	0,31	37,43	56,65
11	4,01	23,22	4,79
12	0,47	5,27	10,47
13	21,95	tr	0,28
14	0,47	4,41	0,30
15	25,43	1,28	0,20
16	2,97	tr	0,20
17	2,15	0,26	—
18	7,39	—	—
19	0,51	—	—
20	0,95	—	—

> 0,1% molar, foram agrupados segundo a ordem esperada de eluição no cromatograma em fase reversa, ou seja, em ordem crescente do número de partição (NP) e, para cada grupo de igual NP, em ordem decrescente de NC, e sua composição aparece nas Tabelas 3, 4 e 5.

**TABELA 3. Composição triacilglicerólica (mol %) do óleo de dendê.**

Estruturas possíveis*	Composição mol %			
	NP** NC		observada	calculada
OLiLi (OLnO)	44	54	1,38	1,97
PLiLi (P <sub>o</sub> OLi; POLn)	44	52	4,14	2,45
MOLi (PLnP; PLiP <sub>o</sub> )	44	50	0,42	0,39
N.I.	—	—	tr	—
MLiP	44	48	0,68	0,33
OOLi (SLiLi; SOLn)	46	54	3,13	5,57
N.I.	—	—	tr	—
PLiO (P <sub>o</sub> OO; PLnS)	46	52	13,60	12,75
PLiP (MOO; POP <sub>o</sub> ; MLiS)	46	50	9,82	8,04
MOP (PP <sub>o</sub> P)	46	48	0,33	0,90
OOO (SOLi)	48	54	3,91	6,38
N.I.	—	—	0,47***	—
POO (PLiS)	48	52	22,05	19,62
N.I.	—	—	0,47**	—
POP (MOS)	48	50	26,35	21,60
PPP (PMS)	48	48	3,17	8,68
SOO (SLiS; PLiA)	50	54	2,09	2,05
POS	50	52	7,41	4,64
PPS	50	50	0,52	2,77
SOS (POA)	52	54	0,92	0,32

\* Aparecem entre parênteses as estruturas que, pelo cálculo, ocorriam em menor porporção;

\*\* Aitzemuller (1982) conceitua NP como NC-2DL, onde DL corresponde ao n° de duplas ligações na molécula;

\*\*\* Composição em peso %.

A identificação dos componentes foi, incidentalmente, iniciada pela amostra de óleo de dendê, não só pela disponibilidade de alguns padrões específicos (POP; POO; POS; PPP e OOO), mas também pelo fato de a literatura registrar dados e cromatogramas que podiam ser utilizados para comparação (El-Hamdy & Perkins 1981, Deffense 1984). Na Tabela 3, que mostra a composição triacilglicerólica molar do óleo de dendê, observada e calculada apenas para quatro componentes (N.I.), não se atribui qualquer estrutura, que pode ser isomérica tanto com a estrutura que lhe antecede como com a que lhe sucede. A semelhança da composição entre as duas formas de medida permitiu a assinalação da maioria das estruturas, observando-se que POP, POO e PLiO foram os principais componentes, na mesma ordem de grandeza apontada na literatura (El-Hamdy & Perkins 1981, Deffense 1984).

TABELA 4. Composição triacilglicérica (mol %) de óleo de polpa de macaúba.

Estruturas possíveis*	NP	NC	Composição mol %	
			observada	calculada
OLiLn (LiLiLi)	42	54	0,45	0,68
PLiLn	42	52	0,22	0,15
OLiLi (OOLn)	44	54	2,07	4,15
PLiLi (POLn, P <sub>O</sub> LiO)	44	52	0,48	2,27
PLiP <sub>O</sub> , PLnP	44	50	0,73	0,30
N.I.	-	-	0,58**	-
OOLi (SOLn, SLiLi)	46	54	12,56	15,06
POLi (P <sub>O</sub> OO)	46	52	9,39	10,61
MOP, PP <sub>O</sub> P	46	48	1,40	0,28
OOO (SOLI)	48	54	36,99	26,58
POO (PSLi, P <sub>O</sub> OS)	48	52	23,64	23,48
POP	48	50	5,53	6,94
PPP	48	48	tr	0,70
SOO	50	54	4,35	2,94
POS	50	52	1,30	1,77
PPS	50	50	tr	0,27
SOS	52	54	0,26	0,11

\* Aparecem entre parênteses as estruturas que pelo programa, ocorriam em menor proporção.

\*\* Composição em peso %.

TABELA 5. Composição triacilglicérica (mol %) da gordura de candelillo.

Estruturas possíveis*	NP	NC	Composição mol %	
			observada	calculada
CMM <sub>O</sub> (LLM <sub>O</sub> )	36	38	0,13	0,07
CLM (LLL)	36	36	0,19	0,09
MM <sub>O</sub> M <sub>O</sub> (LM <sub>O</sub> P <sub>O</sub> )	38	42	0,29	0,22
LMM <sub>O</sub> (COM; LLP <sub>O</sub> )	38	40	0,30	1,11
LLM (CMM)	38	38	1,12	1,66
MM <sub>O</sub> P <sub>O</sub> (M <sub>O</sub> M <sub>O</sub> P; LOM <sub>O</sub> ; LLiM)	40	44	0,02	0,25
LMP <sub>O</sub> (MMM <sub>O</sub> ; LM <sub>O</sub> P; LLO)	40	42	4,75	6,36
LMM (LLP; CMP)	40	40	16,39	15,00
MMLi (MOM <sub>O</sub> ; MP <sub>O</sub> P <sub>O</sub> )	42	46	-	0,88
MMP <sub>O</sub> (LMO; MM <sub>O</sub> P; LP <sub>O</sub> P)	42	44	2,58	3,18
MMM (LMP)	42	42	58,49	55,52
MMO (MPP <sub>O</sub> ; MM <sub>O</sub> S; PM <sub>O</sub> P; LOP)	44	46	4,60	5,27
MMP (LMS; LPP)	44	44	10,41	8,26
OMO	46	50	0,25	0,15
MPO (MP <sub>O</sub> S)	46	48	0,28	0,50
MMS (MPP)	46	46	0,19	1,09

\* Aparecem entre parênteses as estruturas que, pelo programa, ocorriam em menor proporção.

Convém salientar que as estruturas assinaladas não correspondem a qualquer distribuição específica dos ácidos graxos nas três posições do glicerol.

Para a identificação dos triacilgliceróis do óleo de polpa de macaúba tomaram-se por base os componentes ocorrendo, respectivamente, nas percentagens em peso de 37,43; 23,22 e 12,68, que, por analogia com os dados do programa, foram considerados como sendo o OOO, POO e OOLi. Na Tabela 4 aparece a composição triacilglicérica do óleo de polpa de macaúba, observada e calculada. Não existem dados na literatura que possam ser usados para comparação.

No caso da gordura de candelillo, a alta proporção do componente de NC e NP 42, estrutura do 1, 2, 3 - trimiristoil-glicerol, MMM, ofereceu, através de sua localização no cromatograma, uma pista segura para a identificação dos demais componentes, como está mostrado na Tabela 5. Havia sido também observado que o principal íon molecular no espectrograma de massa correspondia ao MMM, de peso molecular 722. Baughman et al. (1921) relataram a ocorrência de 52,2% do componente aqui identificado como o principal na gordura de candelillo.

## CONCLUSÕES

A identificação da maioria dos componentes triacilglicéricos dos óleos de dendê e de polpa de macaúba e da gordura de candelillo foi conseguida com auxílio de um programa para o cálculo da distribuição 1, 2, 3 - casual dos ácidos graxos, efetuado em microprocessador HP-85. Tal cálculo, que pode ser feito em poucos minutos, substitui o uso de padrões de alto custo e nem sempre disponíveis. A metodologia poderá ser estendida a outros óleos vegetais, desde que a distribuição dos ácidos graxos se aproxime, como aquela dos óleos estudados, ao padrão 1, 2, 3 - casual.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Melvin Calvin e à Dra. Esther K. Nemethy, da Universidade da Califórnia, Berkeley, pelas facilidades de uso e pela orientação quanto ao funcionamento do cromatógrafo líquido.

## REFERÊNCIAS

- AITZETMULLER, K. Recent progress in the high performance liquid chromatography of lipids. *Prog. Lipid Res.*, 21:171-93, 1982.

- BAUGHMAN, W.F.; JAMIESON, G.S.; BRAUNS, D.H. An analysis of otopa butter. **J. Am. Chem. Soc.**, **43**:199-204, 1921.
- DEFFENSE, A. Application de la chromatographie liquide haute performance à l'analyse des triglycérides des graisses végétales et animales et de leurs fractions obtenues par cristallisation fractionnée. **Rev. Fr. Corps Gras**, **31**(3):123-9, 1984.
- EL-HAMDY, A.E. & PERKINS, E.G. High performance liquid phase chromatography of natural triglyceride mixtures: critical pair separation. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, **58**(9):867-72, 1982.
- GEERAERT, E. & SANDRA, P. On the potential of CGC in triglyceride analysis. **J. High Res. Chrom., Chrom. Comm.**, **7**(7):431-2, 1984.
- GEERAERT, E. & SANDRA, P. Capillary GC of triglycerides in fats and oils using a high temperature phenylmethylsilicone stationary phase. Part III. Cocoa butter equivalents, nut oils and butter oils. **J. High Res. Chrom., Chrom. Comm.**, **9**(1):206-11, 1986.
- HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. A rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, **22**:475-6, 494, 1973.
- KUKSIS, A. Newer developments in determination of structure of glycerides and phosphoglycerides. **Prog. Chem. Fats Other Lipids**, **12**:1-163, 1972.
- NEMETHY, E.K.; LAGO, R.C.A.; HAWKINS, D.; CALVIN, M. The lignans of *Myristica otopa*. **Phytochemistry**, **25**(4):959-60, 1986.