

**CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP**  
**RELATÓRIO DE CONSULTA**

**TÍTULO DO PROJETO:** “Avaliação de metodologia de preparação de metil ésteres de ácidos graxos de óleos vegetais.”

**PESQUISADORA:** Sabria Aued Pimentel

**INSTITUIÇÃO:** Instituto Adolfo Lutz

**FINALIDADE DO PROJETO:** Publicação

**PARTICIPANTES DA ENTREVISTA:** Sabria Aued Pimentel

Lúcia Pereira Barroso

Rinaldo Artes

Tatiana Salomão Miamoto

Caio Hiroshi Oshiro

Paula Mitiko Yamakawa

**DATA:** 20/03/2001

**FINALIDADE DA CONSULTA:** Comparação de metodologias do estudo, sugestões para dimensionamento da amostra e armazenagem dos dados.

**RELATÓRIO ELABORADO POR:** Tatiana Salomão Miamoto

## **1. Introdução**

A composição de ácidos graxos extraídos da gordura dos alimentos é um importante parâmetro a ser considerado na avaliação da qualidade das dietas consumidas pela população. O Instituto Adolfo Lutz é um dos laboratórios de Saúde Pública que auxilia na verificação da qualidade dos alimentos e possui um laboratório próprio para a determinação da composição de ácidos graxos.

Com a implementação da legislação de alimentos, que exige a apresentação da composição do alimento na rotulagem dos produtos, aumentaram consideravelmente as solicitações de análise de ácidos graxos no Instituto Adolfo Lutz. Assim, o desenvolvimento de metodologias mais rápidas e de custos reduzidos para a determinação da composição desses ácidos auxiliará na eficiência dos serviços prestados à população.

O objetivo deste estudo é avaliar uma metodologia para preparação de metil ésteres de ácidos graxos de óleos vegetais baseada na Norma IUPAC 2.301 (Blackwell Scientific Publications 7<sup>th</sup> Edition, 1987), apresentando algumas modificações que visam as diminuições do tempo e do custo da análise. A metodologia será comparada ao método oficial de preparação de metil ésteres do Instituto Adolfo Lutz (Instituto Adolfo Lutz, 1985).

## **2. Descrição do Estudo**

Foram utilizadas no estudo amostras de óleos vegetais, preparadas como material de teste pelo Central Science Laboratory (CSL), UK, para determinação da composição dos metil ésteres de ácidos graxos. Três materiais de teste foram analisados:

1. Uma mistura de óleo de milho e óleo de amendoim (R9);
2. Uma mistura de óleo de oliva e óleo de amendoim (R12);
3. Uma mistura de óleo de girassol e óleo de milho (R14).

O CSL obteve todas as amostras do comércio, sendo utilizados dois litros de cada óleo para composição da mistura. Estes materiais foram preparados segundo orientações contidas no Protocolo Internacional Harmonizado para Avaliação de Eficiência de Laboratórios Analíticos (Thompson and Wood, 1993).

Foram feitas cinco repetições das medidas dos metis ésteres dos ácidos para cada amostra utilizando cada metodologia. A composição de ácidos graxos das amostras foi obtida através de uma análise por cromatografia em fase gasosa.

O método oficial do Instituto Adolfo Lutz (método IAL) é baseado na metilação a quente com necessidade de maior tempo e custos elevados. Já o método baseado na Norma IUPAC 2.301, com algumas modificações (método IUPAC), é um procedimento baseado na metilação a frio, com tempo e custo reduzidos.

### 3. Descrição das Variáveis

As variáveis do estudo podem ser classificadas como:

- **Fator:** método - método utilizado para medição, que pode ser IAL ou IUPAC;
- **Bloco:** amostra - mistura de óleos vegetais considerada (R9, R12 ou R14);
- **Variável resposta:** composição dos ácidos graxos - quantidade do ácido graxo por 100g de óleo (expressa em porcentagem).

As medidas da composição dos ácidos graxos são feitas em todos os diferentes ácidos presentes em cada mistura de óleos vegetais, mas serão considerados na análise somente aqueles que estavam presentes nas três misturas.

### 4. Situação do Projeto

A pesquisadora possui dados de três amostras (R9, R12 e R14). Provavelmente no mês de abril, ela receberá uma quarta mistura de óleos que será introduzida na análise.

O reduzido número de amostras deve-se ao fato de que a pesquisadora recebe apenas uma amostra de mistura de óleos vegetais por ano, e o custo dessas amostras é muito alto.

A pesquisadora deseja comparar a quantificação de ésteres metílicos de ácidos graxos entre os dois métodos e obter sugestões sobre o dimensionamento amostral, a técnica de análise e a armazenagem dos dados.

## 5. Sugestões do CEA

A fim de se realizar uma análise mais precisa dos dados, é necessário que a amostra a ser considerada tenha um número suficiente de elementos. A seguir é apresentada a forma de cálculo do tamanho da amostra utilizada (ver Neter et al., 1996, capítulo 26).

$$r = \frac{2S^2\sigma^2}{\Delta^2}$$

$$S^2 = (a-1)F_{\alpha}(a-1, n-a)$$

Onde:

r: tamanho da amostra para cada método;

$\sigma^2$ : estimador da variância;

a: número de tratamentos (métodos);

$\Delta$ : diferença mínima significativa que a pesquisadora espera detectar entre as duas médias de um determinado ácido, obtidas através dos métodos IAL e IUPAC (por exemplo, se  $\Delta = 0,03$ , qualquer diferença maior que 0,03 entre as médias de um certo ácido, é detectada);

n: multiplicação de a por r;

$\alpha$ : nível de significância da comparação.

Considerando como exemplo os seguintes valores:

$$\sigma^2 = 0,007 ; \quad \Delta = 0,030 ; \quad a = 2,$$

calculou-se o tamanho de amostra a ser analisada.

**Tabela 1.** Tabela auxiliar para o cálculo de tamanho de amostra

| r  | S <sup>2</sup> | Δ      |
|----|----------------|--------|
| 60 | 3,921          | 0,0304 |
| 65 | 3,915          | 0,0292 |
| 63 | 3,918          | 0,0297 |
| 62 | 3,919          | 0,0299 |

O valor de r que mais aproxima Δ de seu valor “real” (0,030) é 62. Logo, a amostra deve possuir 62 elementos (ácidos) para que a análise tenha um resultado aceitável.

Para comparar as médias das medidas da composição dos ácidos graxos de cada um dos métodos, sugere-se a realização de um teste t para dados emparelhados (ver Bussab e Morettin, 1987 e Costa Neto, 1977), onde cada “par” de valores será formado pelas médias das cinco observações em cada ácido obtidas pelos métodos IAL e IUPAC. Utiliza-se o mesmo teste para comparar as médias das variâncias das medidas. Neste caso, no lugar das médias emparelhadas, utiliza-se os pares das variâncias calculadas a partir das cinco réplicas obtidas com os dois métodos em cada ácido.

Os testes anteriormente citados podem ser feitos com o auxílio do Excel (Teste-T para as médias de duas populações com amostras emparelhadas), ou de pacotes estatísticos como, por exemplo, o SPSS e o SAS.

Uma solução para o armazenamento dos dados do estudo encontra-se na Tabela 2, apresentada a seguir. Nesta tabela constam as cinco medidas de cada ácido obtidas através dos métodos IAL e IUPAC. Cada mistura de óleos vegetais (Amostra) está representada na Tabela 2 por códigos. Por exemplo, o código 1 representa a mistura R9, o código 2 representa a mistura R12 e o código 3, a mistura R14. Os ácidos presentes nas misturas estão codificados da seguinte forma: 1 – ácido C16:0; 2 – ácido

C18:0; 3 – ácido C18:1; e assim sucessivamente. Sugere-se a utilização de uma planilha eletrônica, como o Excel, para o armazenamento dos dados.

**Tabela 2.** Composição dos ácidos graxos\*\*

| Ácido   |   | 1     |     |       |       |     |      | ... |      | n*  |      |       |       |       |  |
|---------|---|-------|-----|-------|-------|-----|------|-----|------|-----|------|-------|-------|-------|--|
| Método  |   | IAL   |     |       | IUPAC |     |      | ... |      | IAL |      |       | IUPAC |       |  |
| Réplica |   | 1     | ... | 5     | 1     | ... | 5    | ... | 1    | ... | 5    | 1     | ...   | 5     |  |
| Amostra | 1 | 11.16 | ... | 11.20 | 2.96  | ... | 2.07 | ... | 2.95 | ... | 2.54 | 37.49 | ...   | 36.20 |  |
|         | 2 | 9.02  | ... | 8.98  | 4.00  | ... | 2.98 | ... | 3.15 | ... | 3.65 | 38.15 | ...   | 39.26 |  |
|         | 3 | 8.45  | ... | 8.47  | 2.32  | ... | 1.95 | ... | 1.65 | ... | 2.06 | 60.45 | ...   | 60.33 |  |

\*n é o número máximo de ácidos presente numa mistura

\*\*Obs.: Tabela parcial com dados fictícios

## 6. Conclusão

Após o armazenamento dos dados conforme sugerido, se possível incluindo os dados da quarta amostra de óleos vegetais, e o término da compilação da planilha, sugere-se que a pesquisadora marque uma entrevista de retorno junto ao CEA.

## 7. Referências Bibliográficas

Bussab, W.O. e Morettin, P.A. (1987). **Estatística Básica**. 4ª ed. Atual, São Paulo. 321p.

Costa Neto, P.L. de O. (1977). **Estatística**. 5ª ed. Edgard Blücher, São Paulo. 246p.

Instituto Adolfo Lutz (1985). **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3ª ed., São Paulo, IMESP, v.1, 266p.

Blackwell Scientific Publications 7<sup>th</sup> Edition (1987). **IUPAC Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives**. IUPAC Method 2.301; Report of IUPAC Working Group WG 2/97.

**Microsoft Excel for Windows. Reference Manual, Release 2.0** (1991). Readmond: Microsoft Corporation.

Neter, J., Kutner, M.H., Nachtsheim, C.J. and Wasserman, W. (1996). **Applied Linear Statistical Models**. 4.ed. Chicago: Irwin. 1408p.

**SAS: Reference Manual, Versão 5.0** (1996). USA: SAS Institute. 940p.

SPSS Inc. (1999), **SPSS Base 10.0 User's Guide**, NC: SPSS Inc. 537p.

Thompson, M. and Wood, R. (1993). International harmonized protocol for proficiency of (chemical) analytical laboratories. **J. Assoc. Off. Anal. Chem. International**, **76**. 926-940.