

Aplicação do modelo de Scheffé no sistema de microextração líquido-líquido dispersiva de baixa densidade em amostra de soro de ruminantes para determinação de ácido linoleico

Application of the Scheffé model in the low-density dispersive liquid-liquid microextraction system in a serum sample of ruminants for the determination of linoleic acid

DOI:10.34117/bjdv5n12-027

Recebimento dos originais: 07/10/2019

Aceitação para publicação: 03/12/2019

Matheus Julien Ferreira Bazzana

Formação acadêmica mais alta: Graduação em Química

Instituição: Universidade Federal de Lavras

Endereço: Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-900 - Lavras/MG

E-mail: matheus.julien@gmail.com

Cleber Nogueira Borges

Formação acadêmica mais alta: Doutor em Ciências

Instituição: Universidade Federal de Lavras

Endereço: Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-900 - Lavras/MG

E-mail: cleber.borges@ufla.br

Leticia Rodrigues Faria

Formação acadêmica mais alta: Graduação em Zootecnia

Instituição: Universidade Federal de Lavras

Endereço: Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-900 - Lavras/MG

E-mail: leticia.faria1@estudante.ufla.br

João Pedro Araújo Campos

Formação acadêmica mais alta: Mestre em Zootecnia

Instituição: Universidade Federal de Lavras

Endereço: Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-900 - Lavras/MG

E-mail: jpcampos92@gmail.com

Nadja Gomes Alves

Formação acadêmica mais alta: Doutor em Zootecnia

Instituição: Universidade Federal de Lavras

Endereço: Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-900 - Lavras/MG

E-mail: nadja@ufla.br

Adelir Aparecida Saczk

Formação acadêmica mais alta: Doutor em Química

Instituição: Universidade Federal de Lavras

Endereço: Universidade Federal de Lavras, Caixa Postal 3037, CEP: 37200-900 - Lavras/MG

E-mail: adelir@ufla.br

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo avaliar a triagem de uma técnica para a extração de lipídios e esterificação do ácido linoleico, contido no soro sanguíneo de ruminantes, aplicando o modelo polinomial de Scheffé na determinação das proporções de solventes utilizados na técnica de Microextração Líquido-Líquido Dispersiva de Baixa Densidade (LDS DLLME). Os solventes tolueno, metanol e solução salina aquosa de cloreto de magnésio 0,017% (m/v) foram selecionados para extração do ácido linoleico na técnica LDS DLLME. Após a extração, o ácido linoleico foi esterificado e analisado por cromatografia gasosa com detector de ionização em chamas (GC-FID). O modelo polinomial de Scheffé foi aplicado aos dados cromatográficos e o modelo cúbico completo (MCC) representou de maneira eficiente as informações do sistema químico. Os parâmetros e superfície de resposta obtidos indicaram que a melhor condição de extração de ácido linoleico do soro foi: 20,50 % (v/v) de tolueno, 39,75% (v/v) de metanol e 39,75 % (v/v) de solução salina aquosa de MgCl₂ 0,017 % (m/v).

Palavras-chave: Quimiometria, LDS-DLLME, Modelo Cúbico Completo.

ABSTRACT

This study aims to evaluate the screening of a technique for lipid extraction and esterification of linoleic acid contained in ruminant blood serum, applying the Scheffé polynomial model to determine the solvent proportions used in the Dispersive Liquid-Liquid Microextraction technique. Low Density (LDS DLLME). Toluene, methanol and aqueous solution magnesium chloride 0.017% (w/v) solvents were selected for the extraction of linoleic acid in the LDS DLLME technique. After extraction, linoleic acid was esterified and analyzed by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). Scheffé's polynomial model was applied to the chromatographic data and the complete cubic model (MCC) efficiently represented the chemical system information. The parameters and response surface obtained indicated that the best condition for serum linoleic acid extraction was: 20.50% (v/v) toluene, 39.75% (v/v) methanol and 39.75% (v/v) aqueous solution MgCl₂ 0.017% (w/v).

Key words: Chemometrics, LDS-DLLME, Complete Cubic Model.

1 INTRODUÇÃO

A extração de lipídio para a determinação do perfil de ácidos graxos em organismos animais, requer uma sequência de etapas para a obtenção de uma amostra limpa e com quantidades significativas dos constituintes de interesse^{1; 2}. Nesse sentido, as amostras de sangue apresentam diversas complicações nas análises laboratoriais devido à presença de macromoléculas, como as lipoproteínas, capazes de associar lipídios em sua estrutura³.

As metodologias convencionais de extração de lipídios se baseiam em um processo de separação líquido-líquido, formado por um sistema bifásico constituído por três solventes (ternário) em diferentes proporções³. O método criado por Folchet al. (1957) foi desenvolvido para a extração de lipídeos em tecidos animais com a utilização de uma mistura de clorofórmio e metanol. A fração aquosa presente nas amostras constitui o sistema ternário de extração. O método separa os lipídios dos demais constituintes das amostras como, carboidratos, proteínas e água. No entanto, o procedimento possui desvantagens devido a utilização de grandes volumes de solventes tóxicos,

longo tempo de extração, contaminantes não-lipídicos densos, elevado número de etapas e exige grande quantidade de amostra para extração ⁴.

Diante das desvantagens apresentadas, as técnicas miniaturizadas são aplicadas na extração de lipídios com a finalidade de diminuir a quantidade dos solventes utilizados e interferentes da matriz ⁵. Dentre elas, a microextração líquido-líquido dispersiva de baixa densidade (LDS-DLLME), apresenta potencial aplicação nesse tipo de análise, devido a formação de microgotas de solvente orgânico com elevada área superficial, favorecendo uma interação mais efetiva entre o solvente de extração e os lipídios livres em solução, com menor tempo de análise e quantidades reduzidas de solventes orgânicos ⁶.

A rápida execução proporcionada pelas técnicas miniaturizadas contribuem para evitar a oxidação (degradação) dos componentes lipídicos, principalmente os insaturados, encontrados em quantidades significativas em tecidos animais ³. Apesar das características promissoras das técnicas miniaturizadas, os sistemas líquido-líquido bifásicos são complexos e as proporções dos solventes utilizados devem ser determinadas de maneira precisa e com poucas análises ^{5;7}.

Nessa perspectiva, a quimiometria é uma ferramenta que fornece métodos estatísticos e matemáticos, que podem diminuir a quantidade de análises e apresentar informações importantes para o entendimento do sistema químico ⁸. Um exemplo, é o modelo polinomial de Scheffé, utilizado na modelagem de misturas constituídas por dois ou três solventes. O modelo fornece parâmetros matemáticos que apresentam detalhes de uma superfície de resposta, a fim de prever o comportamento do sistema formado com a variação da proporção dos solventes ⁹.

Assim, este trabalho objetiva-se na aplicação da técnica LDS-DLLME para a extração de lipídios contido no soro sanguíneo de ruminantes, com posterior etapa de esterificação do ácido linoleico. O modelo polinomial de Scheffé será aplicado para a avaliar a triagens das proporções dos solventes utilizados na técnica de extração.

2 METODOLOGIA

2.1 PLANEJAMENTO DE MISTURAS DE TRÊS COMPONENTES PELO MODELO DE SCHEFFÉ

A Tabela 1 apresenta a variação na proporção dos solventes cloreto de magnésio 0,017% (m/v) metanol e tolueno utilizados na triagem do método de extração. As respostas da quantidade de ácido linoleico nas amostras de soro foram obtidas em área de pico pelas análises cromatográficas e aplicadas ao modelo polinomial de Scheffé, obtendo os coeficientes para o Modelo Linear (ML), Modelo Quadrático (MQ), Modelo Cúbico Especial (MCE) e Modelo Cúbico Completo (MCC).

As superfícies de resposta (SR) e os parâmetros (β_x e d_x) de cada modelo avaliado foram utilizados na interpretação do conjunto de fatores experimentais associados à técnica de extração. Os

gráficos de ajuste e resíduo foram analisados para determinar o modelo que melhor representa e se ajusta aos dados experimentais.

Tabela 1 - Proporção dos solventes utilizados na DLLME para a triagem do sistema de extração, determinado pelo planejamento de misturas.

Experimento	MgCl ₂ 0,017% (m/v) (%)	Metanol (%)	Tolueno (%)
1	70,0	15,0	15,0
2	42,5	42,5	15,0
3	15,0	15,0	70,0
4	56,2	28,8	15,0
5	42,5	15,0	42,5
6	28,8	28,8	42,5
7*	42,5	24,2	33,3
8*	56,2	19,6	24,2
9*	42,5	33,3	24,2
10*	28,75	19,58	51,66

*condições experimentais realizadas em duplicata.

2.2 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO POR LDS-DLLME

Em um tubo de vidro com tampa de rosca, foram adicionados 200 µL da amostra de soro sanguíneo de cordeiras suplementadas com soja grão tostada e moída. Ao mesmo tubo, a proporção de solução salina (contendo o soro sanguíneo) delimitada pelo planejamento de mistura foi adicionada de acordo com cada experimento (Tabela 1). Em seguida as proporções de tolueno e metanol, também delimitadas pelo planejamento de mistura, foram adicionadas simultaneamente. O recipiente, foi vedado e centrifugado durante 5 minutos a 1500 G. A fase orgânica foi transferida para outro tubo de vidro para posterior esterificação.

2.3 ESTERIFICAÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO

A esterificação do ácido linoleico foi realizada de acordo com o método de Rodríguez-Palmero et al. (1998). O recipiente com o extrato esterificado foi centrifugado, a fase orgânica foi recolhida com uma micropipeta, acondicionada em um vial de 3,0 mL e injetada em um cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um detector de ionização de chama (GC/FID).

2.4 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As análises cromatográficas foram realizadas em um GC/FID modelo 7890A (Agilent). A coluna analítica utilizada foi uma HP-5 (30 m x 0,32 mm ID x 0,25 mm) com composição da fase

estacionária de 5% fenil-metil-siloxano (Agilent). As amostras foram injetadas por um injetor Split/Splitless em modo Split usando modo de divisão 1:20 (v/v) com a temperatura do 5 injetor de 250 °C e do detector de 375 °C. O volume de injeção foi de 1,0 µL. O gás de arraste utilizado foi o Hélio a um fluxo constante de 1,1 mL min⁻¹.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PLANEJAMENTO DE MISTURAS

A Tabela 2 apresenta os resultados em área cromatográfica dos experimentos realizados com base no planejamento de misturas. A proporção de solução de cloreto de magnésio 0,017% (m/v), metanol e tolueno foram codificados em componente X₁, X₂ e X₃, respectivamente.

Tabela 2 - Proporções determinadas pelo planejamento de mistura e suas respectivas áreas cromatográficas.

Experimentos	X ₁	X ₂	X ₃	Áreas
				Cromatográficas (u.a)
1	70,0	15,0	15,0	75643
2	42,5	42,5	15,0	67547
3	15,0	15,0	70,0	54713
4	56,2	28,8	15,0	57634
5	42,5	15,0	42,5	64042
6	28,8	28,8	42,5	77026
7	42,5	24,2	33,3	60936
7*	42,5	24,2	33,3	61944
8	56,2	19,6	24,2	77515
8*	56,2	19,6	24,2	76635
9	42,5	33,3	24,2	91267
9*	42,5	33,3	24,2	92464
10	28,75	19,58	51,66	72107
10*	28,75	19,58	51,66	71109

*condições experimentais realizadas em duplicata.

As áreas cromatográficas obtidas foram aplicadas ao ML, MQ, MCE e MCC de Scheffé. Os parâmetros (β_i) foram determinados para cada um dos modelos e os parâmetros (d_{ij}) somente para o MCC. Os valores encontrados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros obtidos para cada modelo de representação pelo método de Scheffé.

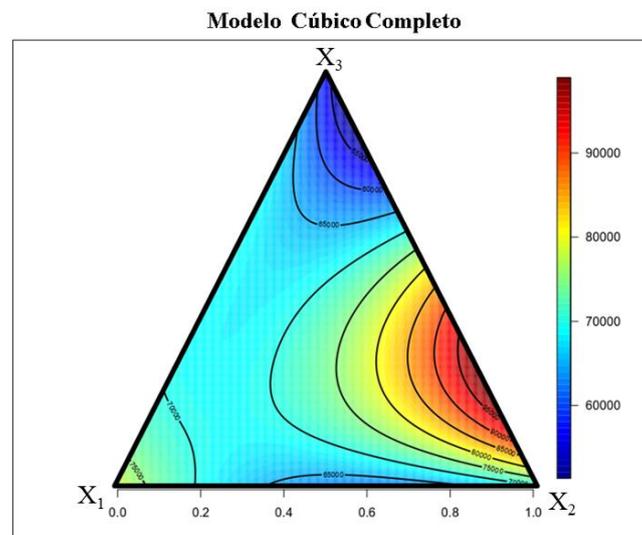
Modelo	β_1	β_2	β_3	β_{12}	β_{13}	β_{23}	β_{123}	d_{12}	d_{13}	d_{23}
Linear	72139	79674	62596	-	-	-	-	-	-	-
Quadrático	76994	74972	53777	-35946	-1368	78908	-	-	-	-
Cúbico Especial	77074	75053	53858	-37968	-3390	76886	25780	-	-	-
Cúbico Completo	78337	70241	57407	-45066	6233	74361	25780	-	-49241	-187660

Os coeficientes (β_i) se relacionam com cada modelo de mistura ternária de acordo com o número de termos associados a suas equações matemáticas. Eles podem ser avaliados para estimar a interação entre os componentes da mistura de estudo e representar graficamente as Superfícies de Resposta (SR). Da mesma forma, os parâmetros (d_{ij}) podem ser determinados para o MCC que possui dez termos associados conforme a Equação 1¹¹.

$$y_i = \sum_{i=1}^{n=3} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{n=3} \sum_{i>j}^{n=3} \beta_{ij} x_i x_j + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + \sum_{i=1}^{n=3} \sum_{j>i}^{n=3} d_{ij} x_i x_j (x_i - x_j) \quad (1)$$

Analisando os coeficientes obtidos para cada modelo e suas respectivas SR, foi possível constatar que os dados que se ajustaram melhor foi o MCC. Por meio dos parâmetros encontrados para o MCC com o planejamento de misturas ternárias, a Figura 1 apresenta a SR que representa o ajuste dos dados ao modelo proposto.

Figura 1 - Superfície de resposta referente MCC composta solução salina de cloreto de magnésio 0,017% (m/v) (X_1), Metanol (X_2) e Tolueno (X_3).



Fonte: autor

A superfície de resposta apresentada na Figura 1 para o MCC demonstra mudanças significativas quando comparada aos modelos anteriores. A região compreendida entre os pontos X_2 e X_3 apresentou maior intensidade de resposta, indicando que a composição capaz de extrair com maior eficiência o ácido linoleico das amostras de soro, possui maior proporção de metanol.

O MCC foi capaz de evidenciar com maior precisão a composição mais efetiva no processo de extração, devido aos dez parâmetros associados à sua equação matemática, sendo eles $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}, \beta_{123}, d_{12}, d_{13}, d_{23}$. Tais parâmetros são capazes de fornecer as informações em diferentes pontos do sistema proposto, modelando de forma efetiva a superfície, pois, analisa as curvaturas e inflexões por toda sua extensão. Os parâmetros d_{12}, d_{13}, d_{23} , são os pontos centrais característico do MCC e representam informações significativas para a interpretação do modelo.

O parâmetro d_{12} não foi determinado, pois, as informações que o constitui também estão contidas nos termos d_{13} e d_{23} . Nesse sentido, a informação gerada pelo coeficiente d_{12} não seria complementar para a representação do sistema. A representação matemática do MCC está apresentada na Equação 2.

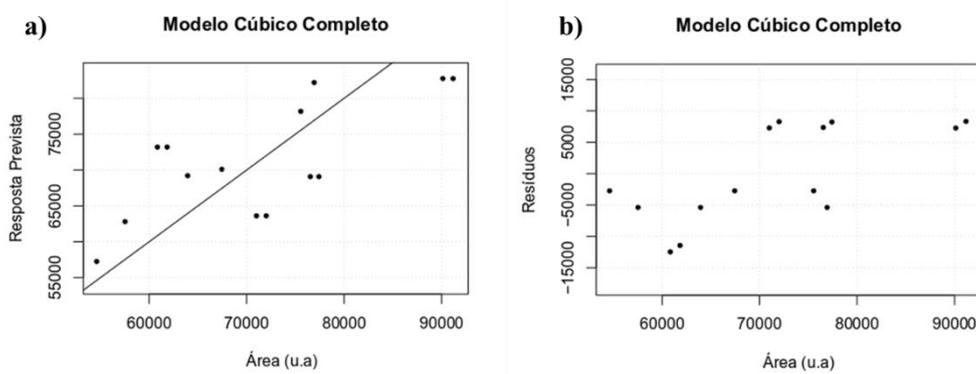
$$y = 78337x_1 + 70241x_2 + 57407x_3 - 45066x_1x_2 + 6233x_1x_3 + 74361x_2x_3 + 25780x_1x_2x_3 - 49241[x_1x_3(x_1 - x_3)] - 187660[x_2x_3(x_2 - x_3)] \quad (2)$$

Os parâmetros apresentados na Equação (para o MCE, demonstram diferenças mínimas quando comparados aos do MQ. O parâmetro β_{123} apresentou um valor relativamente baixo (25780), quando comparados aos demais coeficientes de resposta positiva, indicando que a composição de solventes do ponto em questão não apresenta uma boa condição de extração do ácido linoleico das amostras.

O ajuste do MCE para a representação dos dados experimentais encontrados foi avaliado por meio dos gráficos de ajuste e resíduos apresentado na

Figura 2.

Figura 2 - (a) Gráfico de ajuste dos dados ao modelo. (b) Gráfico de resíduos. Ambos para o modelo cúbico completo.



Fonte: autor

Ao analisar o gráfico da

Figura 2 (a), foi possível verificar que o MCC ajustou os dados de forma eficiente quando comparado aos demais modelos, pois, os pontos ficaram mais próximos a linha de tendência e alguns desvios foram minimizados. O gráfico de resíduos apresentados na

Figura 2 (b), indicou aleatoriedade na disposição dos dados e os pontos questionáveis, sendo possível descartar a possibilidade de *outlier* e comprovando que o MCC foi eficiente na representação dos dados obtidos.

3.2 MELHOR COMPOSIÇÃO PARA A EXTRAÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO

Por meio da análise da SR obtida para o MCC (

Figura 2) foi possível observar que houve uma região bem delimitada entre X_2 e X_3 com intensidade próxima a 100 mil. Essa região corresponde as melhores condições de extração para o ácido linoleico das amostras de soro. A Tabela 4 apresenta a região de maior intensidade de extração do ácido linoleico.

Tabela 4 - Região de maior extração do ácido linoleico de acordo com o MCC

Região	X_1	X_2	X_3	Solução Salina % (v/v)	Metanol % (v/v)	Tolueno % (v/v)
Ponto I	0,30	0,55	0,15	46,62	30,12	23,25
Ponto II	-	0,90	0,10	39,75	39,75	20,50
Ponto III	-	0,50	0,50	28,75	28,75	42,50

Analisando os valores encontrados na Tabela 4, foi possível constatar que a proporção da solução salina, pode variar entre 28,75 a 46,62%; a proporção de metanol entre 28,75 a 39,75% e a de tolueno entre 20,50 a 42,50%. É válido ressaltar que as proporções devem obedecer a restrição da Equação 1.

Apesar da ampla faixa de proporções que podem ser utilizadas, as técnicas miniaturizadas tendem a diminuir a quantidade dos solventes de alta toxicidade como o tolueno e o metanol. Nesse sentido, foi possível estabelecer uma proporção dos três componentes ideal para a realização da técnica de extração, sendo 39,75% (v/v) de solução salina, 39,75% (v/v) de metanol e 20,50% (v/v) de tolueno.

4 CONCLUSÃO

A técnica de preparo de amostra LDS-DLLME mostrou-se promissora na extração de ácido linoleico das amostras de soro de ruminantes. O modelo polinomial de Scheffé foi capaz de determinar as melhores proporções de solventes mais na extração do analito. O MCC representou de

maneira mais efetiva os dados obtidos, quando comparado aos demais modelos. A proporção de tolueno, metanol e solução salina aquosa de $MgCl_2$ 0,017% indicada para a extração do ácido linoleico foi 20,50% (v/v), 39,75% (v/v) e 39,75% (v/v), respectivamente, se adequando aos princípios da LDS-DLLME, que utiliza quantidade pequenas de solvente orgânicos.

REFERÊNCIAS

- ¹ FUKASAWA, K. et al. Qualitative and quantitative comparison of cyclic phosphatidic acid and its related lipid species in rat serum using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1567, p. 177-184, 2018.
- ² LEE, J. Y. et al. Analysis of lipid adsorption on nanoparticles by nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 24, p. 6155-6164, 2018. ISSN 1618-2642.
- ³ BRUM et al. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias primas de origem vegetal e animal.** *Quimica Nova*. 32: 849-854 p. 2009
- ⁴ FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.
- ⁵ SARAFRAZ, Y. E. A. **Liquid-phase microextraction.** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 29: 1-14 p. 2010.
- ⁶ YANG, Y. et al. Low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-ICP-MS for speciation analysis of phenylarsenics in lake water. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 87-100, 2019.

- ⁷ SARAFIAN, M. H. et al. Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 12, p. 5766-5774, 2014.
- ⁸ NUNES, C. A. et al. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2003-2010, 2012-11-30, 2012.
- ⁹ CORNELL, J. **Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data**. Wiley: Wiley Series in Probability and Statistics 2011.
- ¹⁰ RODRÍGUEZ-PALMERO ET AL. **Comparison of two methods for the determination of fatty acid profiles in plasma and erythrocytes**. *Journal of Chromatography. A*. 793: 435–440 p. 1998.
- ¹¹ NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editoras da Unicamp - Campinas, SP. 2001.