



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
MESTRADO EM QUÍMICA

PATRÍCIA LOPES DE OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS MAJORITÁRIOS EM
MANTEIGA DE GARRAFA POR ELETROFORESE CAPILAR**

JUIZ DE FORA

2015

PATRÍCIA LOPES DE OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS MAJORITÁRIOS EM
MANTEIGA DE GARRAFA POR ELETROFORESE CAPILAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lopes de Oliveira, Patrícia.

DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS MAJORITÁRIOS EM MANTEIGA DE GARRAFA POR ELETROFORESE CAPILAR / Patrícia Lopes de Oliveira.

-- 2015.

64 p.

Orientador: Marccone Augusto Leal de Oliveira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

1. Manteiga de garrafa. 2. Ácidos graxos. 3. Adulteração. 4. Eletroforese capilar. 5. Cromatografia a gás. I. Augusto Leal de Oliveira, Marccone, orient. II. Título.

Dedico este trabalho ao meu pai Jânder (in memoriam) e minha mãe Silmara, por serem os maiores exemplos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me iluminar sempre.

Agradeço ao meu pai Jânder (in memorian) por ter sido um grande amigo, e por ter me ensinado a enfrentar os problemas com bom humor e cabeça erguida.

Agradeço à minha mãe Silmara, pela sua dedicação, por ser meu exemplo de perseverança e bondade, por compreender minha ausência, e por ter me apoiado sempre nas minhas decisões.

Agradeço minhas irmãs Priscila, Thatiana e Laís, minhas melhores amigas, por sempre acreditarem em mim, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis e por tornarem minha vida mais divertida desde sempre.

Agradeço minha sobrinha Sabrina pelo carinho, companhia e pelo bom humor, por ser a minha inspiração nos dias mais difíceis e por compreender minha ausência.

Agradeço minha afilhada Ludimila por me fazer rir sempre com seu jeitinho ainda tão infantil e ingênuo e por ser também a minha inspiração nos dias mais difíceis.

Agradeço à amiga Dani, pelo companheirismo em todos esses anos de faculdade, pelas caronas, pelas risadas e por estar sempre disposta a me ouvir.

Agradeço às amigas Patrícia Barra, Renata Castro e Renata Sato por me ajudarem sempre, pelos conselhos e orientações.

Agradeço ao meu orientador, Marcone, pela troca de conhecimento, pela confiança depositada em mim e pela amizade.

Aos colegas do Grupo de Química Analítica e Quimiometria pela convivência agradável e pela contribuição de cada um para meu crescimento pessoal.

À Prof. Maria Auxiliadora (UFJF) pela doação das amostras de manteiga de garrafa e também pelas contribuições, fundamentais para o entendimento deste trabalho, feitas no exame de qualificação juntamente com o Pesquisador Marco Gama (Embrapa), a quem eu também sou muito grata.

Às secretárias Maristela, Maria e Simone pela ajuda, paciência e boa vontade.

Às agências financiadoras, UFJF, CAPES, FAPEMIG e CNPq.

“Se você quiser alguém em quem
confiar,

Confie em si mesmo,

Quem acredita sempre alcança.”

(Renato Russo/ Flávio Venturini)

RESUMO

A manteiga de garrafa é um produto artesanal, produzido a partir do batimento seguido da fusão do creme do leite, sendo típico da região nordeste do país e do norte/nordeste de Minas Gerais. Foi proposto um método de análise, alternativo ao método oficial por Cromatografia a Gás (GC), por Eletroforese Capilar de Zona (CZE) para a análise dos ácidos graxos (AG) presentes na manteiga de garrafa. O eletrólito utilizado constituiu de 15 mmol L⁻¹ de solução tampão NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH ~ 6.86); 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS; 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35®, 45% v/v de ACN e 2,1% de 1-octanol e as condições de análise foram injeção hidrodinâmica (12,5 mbar por 4 s), voltagem de + 19 kV, temperatura no interior do capilar de 25 °C, detecção indireta no UV em 224 nm, capilar de TSH com 75 µm d.i., 40 cm de comprimento efetivo e 48.5 cm de comprimento total. Com esta composição foi possível identificar e quantificar os AG: ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1 *cis* 9), ácido palmítico (C16:0), ácido linoleico (C18:2 *cis* 9, 12), ácido linolênico (C18:3 *cis* 9, 12, 15) e ácido mirístico (C14:0). O padrão interno utilizado foi o ácido tridecanoico (C13:0). Os resultados para a quantificação obtidos por CZE foram comparados com o método oficial por GC, e não apresentaram diferença significativa em um intervalo de confiança a 95 %. As figuras de mérito deste trabalho foram representadas pela sensibilidade do método por CZE, assim, foram calculados o limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) para cada AG. A análise dos resultados permitiu concluir que a maioria das amostras de manteiga de garrafa foram adulteradas, possivelmente com óleos vegetais, devido ao elevado teor de ácido linoleico encontrado, que é um AG presente na gordura do leite com concentração variando entre 1 a 3 %.

Palavras-chave: Eletroforese capilar. Cromatografia a gás. Ácidos graxos. Adulteração. Manteiga de garrafa.

ABSTRACT

The “manteiga de garrafa” is a Brazilian butter and a handmade product, produced from the beat followed by the fusion of milk cream, typical of the Brazilian Northeast and the north / northeast of Minas Gerais. An alternative method of analysis by Capillary Zone Electrophoresis (CZE) for the analysis of fatty acids (FA) present in the “manteiga de garrafa” has been proposed. The background electrolyte optimized consisted of 15 mmol L⁻¹ of NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH ~ 6.86); 4.0 mmol L⁻¹ of SDBS; 8.3 mmol L⁻¹ of Brij 35®, 45% v/v of ACN, 2.1% of 1-octanol and the analysis conditions were hydrodynamic injection (12.5 mbar for 4 s), voltage + 19 kV, temperature 25 °C, indirect UV detection at 224 nm, capillary TSH with 75 µm i.d., 40 cm of effective length and 48.5 cm of total length. With this arrangement it was possible to identify and quantify the following FA: stearic acid (C18:0), oleic acid (C18:1 *cis* 9), palmitic acid (C16:0), linoleic acid (C18:2 *cis* 9, 12), linolenic acid (C18:3 *cis* 9, 12, 15) and miristic acid (C14:0). The internal standard used was tridecanoic acid (C13:0). The results for the quantification obtained by CZE were compared with the official method by Gas Chromatography (GC), and no significant difference in a confidence interval of 95%. The figures of merit of this work were represented by the sensitivity of the method by CZE, the were calculated the limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) for each FA.

The results showed that the majority of samples brazilian butter were adulterated, possibly with vegetable oils, due to the high content of linoleic acid, that is an FA existing in milk fat with concentration between 1 and 3 %.

Keywords: Capillary electrophoresis. Gas chromatography. Fatty acids. Adulteration. Brazilian butter.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas dos AG majoritários encontrados na manteiga de garrafa	17
Figura 2. Representação esquemática de um sistema básico de CE.....	20
Figura 3. Representação esquemática do fluxo eletrosmótico.	21
Figura 4. Esquema simplificado para a instrumentação em GC.....	24
Figura 5. Esquema do preparo das amostras para análise por CZE.	29
Figura 6. Comparação entre os métodos no que diz respeito ao tempo no preparo da amostra e tempo total de análise.....	37
Figura 7. Eletroferograma de uma mistura de padrões dos AG. (1) C18:0, (2) C18:1 <i>trans</i> 9, (3) C18:1 <i>cis</i> 9, (4) C16:0, (5) C18:2 <i>cis</i> 9, 12, (6) C18:3 <i>cis</i> 9, 12, 15, (7) C14:0, (PI) C13:0, todos com concentração de 0,50 mmol L ⁻¹	38
Figura 8. Cromatograma FAME MIX 37 (S) Solvente – Diclorometano (1) C4:0, (2) C6:0, (3) C8:0, (4) C10:0, (5) C11:0, (6) C12:0, (7) C13:0, (8) C14:0, (9) C14:1, (10) C15:0, (11) C15:1, (12) C16:0, (13) C16:1, (14) C17:0, (15) C17:1, (16) C18:0, (17) C18:1 <i>trans</i> 9, (18) C18:1 <i>cis</i> 9, (19) C18:2 <i>trans</i> 9, 12, (20) C18:2 <i>cis</i> 9, 12, (21) C20:0, (22) C18:3 <i>cis</i> 6, 9, 12 <i>gama</i> , (23) C20:1 <i>cis</i> 11, (24) C18:3 <i>cis</i> 9, 12, 15 <i>alfa</i> , (25) C21:0, (26) C20:2 <i>cis</i> 11, 14, (27) C22:0, (28) C20:3 <i>cis</i> 8, 11, 14, (29) C22:1 <i>cis</i> 13, (30) C20:3 <i>cis</i> 11, 14, 17, (31) C20:4 <i>cis</i> 5, 8, 11, 14, (32) C23:0, (33) C22:2 <i>cis</i> 13, 16, (34) C24:0, (35) C20:5 <i>cis</i> 5, 8, 11, 14, 17, (36) C24:1 <i>cis</i> 15, (37) C22:6 <i>cis</i> 4, 7, 10, 13, 16, 19.....	39
Figura 9. Cromatograma de diferentes marcas (A, B, C, D e E) de manteiga de garrafa. (8) C14:0, (12) C16:0, (16) C18:0, (17) C18:1 <i>trans</i> , (18) C18:1 <i>cis</i> 9, (20) C18:2 <i>cis</i> 9, 12, (24) C18:3 <i>cis</i> 9, 12, 15 <i>alfa</i> , (#) possível isômero de posição do C18:1 <i>cis</i> 9.	42
Figura 10. Eletroferogramas de amostras de manteiga de garrafa de diferentes marcas A, B, C, D e E. (1) C18:0, (2) C18:1 <i>trans</i> , (3) C18:1 <i>cis</i> 9, (4) C16:0, (5) C18:2 <i>cis</i> 9, 12, (6) C18:3 <i>cis</i> 9, 12, 15, (7) C14:0, (PI) C13:0.....	45
Figura 11. Cromatograma das amostras G e M com destaque para a região que evidencia a ausência de C13:0 nas amostras. (1) C4:0, (2) C6:0, (3) C8:0, (4) C10:0, (6) C12:0, (8) C14:0, (9) C14:1, (10) C15:0, (12) C16:0, (13) C16:1, (14) C17:0, (16) C18:0, (17) C18:1 <i>trans</i> , (18) C18:1 <i>cis</i> 9, (20) C18:2 <i>cis</i> 9, 12, (24) C18:3 <i>cis</i> 9, 12, 15 <i>alfa</i> , (25) C21:0.	47
Figura 12. Cromatogramas de réplicas autênticas das amostras G e M. (1) C4:0, (2) C6:0, (3) C8:0, (4) C10:0, (6) C12:0, (PI) C13:0, (8) C14:0, (9) C14:1, (10) C15:0, (12) C16:0, (13) C16:1, (14) C17:0, (16) C18:0, (17) C18:1 <i>trans</i> , (18) C18:1 <i>cis</i> 9, (20) C18:2 <i>cis</i> 9, 12, (24) C18:3 <i>cis</i> 9, 12, 15 <i>alfa</i> , (25) C21:0.	48

Figura 13. Eletroferogramas de réplicas autênticas das amostras G e M. (1) C18:0, (2) C18:1 *trans*, (3) C18:1 *cis* 9, (4) C16:0, (5) C18:2 *cis* 9, 12, (6) C18:3 *cis* 9, 12, 15, (7) C14:0, (PI) C13:0. 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores obtidos na regressão, ANOVA e Fr para cada AG.	36
Tabela 2. Tempos de retenção de cada AG na mistura de padrões FAME MIX 37.	40
Tabela 3. Valores dos percentuais em área dos principais AG encontrados nas amostras A, B, C, D e E pelo método por GC.	41
Tabela 4. Teores dos AG (g 100 g ⁻¹ de gordura) nas amostras G e M determinados por CZE e por GC.	50

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN: acetonitrila

AG: ácidos graxos

ANOVA: análise de variância, do inglês *analysis of variance*

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Brij 35: éter laurílico de polioxietileno 23

CE: eletroforese capilar, do inglês *capillary electrophoresis*

CZE: eletroforese capilar, do inglês *capillary zone electrophoresis*

d.e.: diâmetro externo do capilar

d.i.: diâmetro interno do capilar

DAD: detector por arranjo de diodos, do inglês *diode array detector*

FAME: ésteres metílicos de ácidos graxos, do inglês *fatty acid methyl esters*

FID: detector de ionização em chama, do inglês *flame ionization detector*

Fr: fator de resposta

GC: cromatografia a gás, do inglês *gas chromatography*

LOD: limite de detecção, do inglês *limit of detection*

LOQ: limite de quantificação, do inglês *limit of quantification*

MeOH: metanol

pH: potencial hidrogenionico

PI: padrão interno

SDBS: dodecil benzenosulfonato de sódio, do inglês *sodium dodecyl benzenesulfonate*

UV: ultravioleta

E: campo elétrico

v_{e0} : velocidade eletrosmótica

ϵ_0 : constante de permissividade do vácuo

ϵ_r : permissividade relativa da solução

ζ : potencial zeta

μ_{eo} : mobilidade eletrosmótica

μ_{ep} : mobilidade eletroforética

q : carga iônica

r : raio do soluto

η : viscosidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	MANTEIGA DE GARRAFA	15
1.2	ÁCIDOS GRAXOS	15
1.3	MÉTODOS DE ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS.....	17
1.4	ELETROFORESE CAPILAR.....	18
1.4.1	Instrumentação	19
1.4.2	Características das separações eletroforéticas	20
1.4.3	Detecção	22
1.5	CROMATOGRAFIA A GÁS	23
1.5.1	Instrumentação	23
1.5.2	Detecção	24
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS.....	26
3.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	27
3.2.1	Eletroforese Capilar.....	27
3.2.2	Cromatografia a gás	28
3.3	PREPARO DAS AMOSTRAS	28
3.3.1	Metodologia para análise por CZE.....	28
3.3.2	Metodologia para análise por GC.....	29
3.4	QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS.....	31
3.4.1	Cálculo do Fator de Resposta para CZE-UV	31
3.4.2	Somatório total de áreas e padronização interna para GC-FID.....	33
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 MANTEIGA DE GARRAFA

De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2006) entende-se por manteiga de garrafa, manteiga da terra ou manteiga do sertão o produto que apresenta as seguintes características sensoriais: aspecto pastoso e/ou líquido em que pode ocorrer separação de fase entre a gordura insaturada (líquida) e saturada (cristalizada à temperatura ambiente); coloração variando entre amarela na fase líquida e amarelo-esbranquiçada na fase sólida e ausência de sabores estranhos ou desagradáveis.

A manteiga de garrafa é um produto típico do nordeste brasileiro e das regiões norte/nordeste de Minas Gerais, sendo a comercialização feita em feiras livres. A produção é artesanal e proveniente do batimento do creme do leite, gerando a manteiga, que é submetida à fusão (100 a 130 °C) até que se forme uma “borra” ou precipitado. Após a filtração do precipitado o produto final é armazenado em garrafas e chamado de manteiga de garrafa (Ambrósio *et al.*, 2001).

Na ausência de legislação específica para este produto, Ambrósio *et al.* (2003) realizaram um estudo sobre a estabilidade com a finalidade de tentar determinar um prazo de validade para a manteiga de garrafa. As principais conclusões desse trabalho foram que a manteiga de garrafa é um produto altamente susceptível à oxidação lipídica o que torna a vida-de-prateleira curta, sendo inadequada para o consumo após 60 dias a partir da data de fabricação.

1.2 ÁCIDOS GRAXOS

Ácidos graxos (AG) são ácidos monocarboxílicos alifáticos, que participam da constituição de determinados lipídios presentes nos alimentos, como os óleos (ésteres formados a partir de AG e que se apresentam sob a forma líquida) e gorduras (ésteres formados a partir de AG e que se apresentam sob a forma sólida) (Graziola *et al.*, 2002).

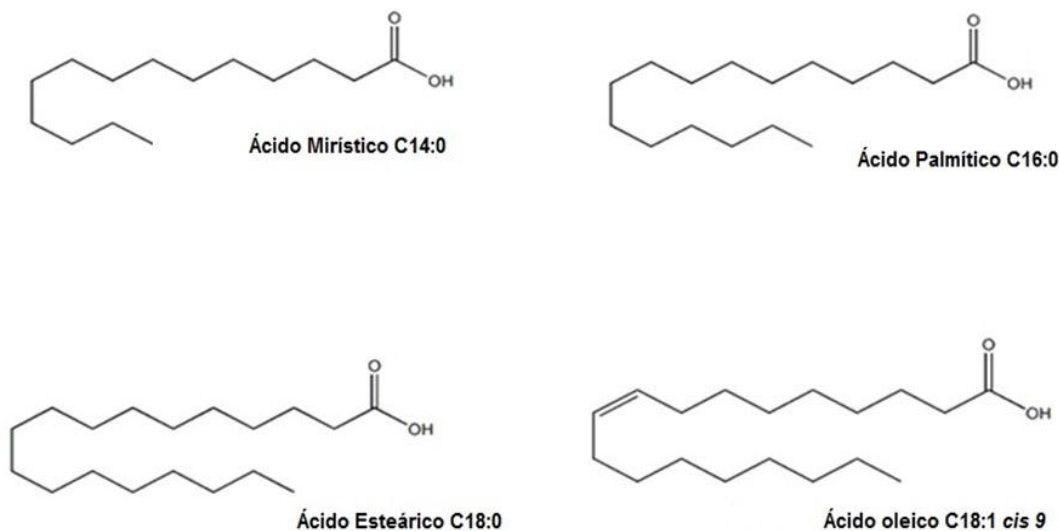
Os AG podem ser saturados, monoinsaturados ou poli-insaturados, dependendo da presença ou ausência de ligações duplas. Eles diferem em comprimento, bem como, com uma cadeia de 4-28 átomos de carbono (Beerman *et al.*, 2003). Com isto os AG podem ser classificados quanto ao tamanho da cadeia hidrocarbonada, quanto a presença de ligações duplas e quanto à ramificação. A cadeia é considerada curta quando contém de dois a quatro átomos de carbono; média de seis a dez átomos de carbono; longa acima de doze átomos de carbono. Um AG é saturado quando não possui ligações duplas na molécula, e é insaturado quando possui uma (monoinsaturados) ou mais de uma (poli-insaturados) ligações duplas na molécula. Os AG não ramificados são aqueles que não possuem ramificações na cadeia carbônica e representam a grande maioria das estruturas (Graziola *et al.*, 2002).

A maior parte dos ácidos graxos naturais encontra-se esterificada com o glicerol (1, 2, 3-triidroxipropano), formando triglicerídeos ou triacilgliceróis componentes dos óleos e gorduras comestíveis. Os óleos e gorduras, misturas relativamente complexas de triacilgliceróis, são os lipídeos mais amplamente distribuídos na natureza (Vianni e Braz-Filho, 1996).

Os AG que ocorrem naturalmente nos óleos e gorduras são os ácidos carboxílicos de cadeia longa não ramificada com número par de átomos de carbono (Graziola *et al.*, 2002). A gordura do leite de ruminantes apresenta-se como exceção à grande maioria dos alimentos, pois apresenta, além dos AG de cadeia carbônica par e não ramificada, AG com cadeia carbônica com números ímpares de átomos de carbono, como o ácido pentadecanoico (C15:0) e ácido margárico (C17:0) (Jensen, 2002). Outra exceção apresentada pela gordura do leite de ruminantes é a presença de AG com cadeia ramificada, representados por AG voláteis (cadeia com menos de 11 átomos de carbono), como, por exemplo, o ácido 4-metiloctanoico e 4-etiloctanoico, encontrados na gordura do leite de cabra (Costa *et al.*, 2009).

A determinação do perfil de AG é importante para a caracterização química dos óleos e gorduras comestíveis (Ruiz-Rodriguez *et al.*, 2010). Os principais AG encontrados por Clemente *et al.* (2009), em um estudo sobre dez diferentes marcas manteigas de garrafa produzidas na região de Salinas – MG, foram o ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) e ácido oleico (C18:1 *cis* 9). A estrutura de tais AG encontra-se na Figura 1.

Figura 1. Estruturas dos AG majoritários encontrados na manteiga de garrafa



Fonte: o autor.

1.3 MÉTODOS DE ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS

Entre os métodos de análise de AG tem-se os métodos espectroscópicos e os métodos cromatográficos. Os métodos espectroscópicos envolvem o infravermelho com transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared* – FT-IR) (AOCS, 1999) e infravermelho com refletância total atenuada (do inglês, *Attenuated Total Reflection Infrared* – ATR-IR) (Mossoba *et al.*, 2007). Os métodos cromatográficos incluem a cromatografia a gás (do inglês, *Gas Chromatography* – GC) acoplada a um detector de ionização em chama (do inglês, *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector* – GC-FID) (AOCS, 1996), cromatografia a gás acoplada a um detector de massas (do inglês, *Gas Chromatography Mass Spectrometry* – GC-MS) (Huang *et al.*, 2006) e cromatografia líquida de alta eficiência impregnada com prata (do inglês, *Silver Ion High Performance Liquid Chromatography* – Ag⁺-HPLC) (Delmonte *et al.*, 2004).

O método oficial de quantificação dos AG é a cromatografia a gás, que envolve a extração da fase lipídica da amostra e derivatização de ácidos graxos em ésteres

metílicos de ácidos graxos (do inglês, *Fatty Acid Methyl Esters* – FAME) (Bailey-Hall *et al.*, 2008, Lepage e Roy, 1984; Ichihara *et al.*, 2002). Assim, a separação dos AG por GC é complicada, devido à polaridade relativamente elevada dos ácidos, sendo, portanto necessária a preparação de derivados apolares, que são mais voláteis que os ácidos graxos livres. Neste sentido, FAMEs são usados quase universalmente para análise por GC dos ácidos graxos (Shantha e Napolitano, 1992).

A partir dos últimos anos, a técnica de eletroforese capilar (do inglês, *Capillary Electrophoresis* - CE), obteve atenção da comunidade científica e tem sido considerada uma técnica de separação alternativa interessante para a análise de AG em óleos, gorduras, alimentos e amostras biológicas (Barra *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003; Porto *et al.*, 2011; Drange e Lundanes, 1997). Os sistemas de eletrólito mais comuns para análises de AG são compostos de tampões, agentes cromóforos [p-anisato (Gareil e Collet, 1996), dodecil-benzeno-sulfonato SDBS (Oliveira *et al.*, 2003)], e outros aditivos, tais como solventes orgânicos [etanol (Liu *et al.*, de 2005), acetonitrila (Surowiec *et al.*, 2004), 1-octanol (Oliveira *et al.*, 2003)], tensoativos, tais como dodecilsulfato de sódio-SDS (Bohlin *et al.*, 2003), polioxietilenolauril éter Brij-35 (Oliveira *et al.*, 2003), e ciclodextrinas (Liu *et al.*, 2005)].

As vantagens da CE quando comparada ao GC estão relacionadas ao preparo da amostra, devido à ausência de etapas de extração e derivatização, e curto tempo de análise, que geram um aumento na frequência analítica. Além disto, outra vantagem para realizar a análise de AG por CE é o uso de colunas não dedicadas para esta técnica (Oliveira *et al.*, 2014). As vantagens apresentada pelo GC para a análise de AG são maior sensibilidade da técnica e um perfil mais amplo dos AG, incluindo os de cadeia curta, média e longa em um único método (Ambrósio *et al.*, 2001; Clemente *et al.*, 2009).

1.4 ELETROFORESE CAPILAR

A CE é uma técnica de separação, que opera em meio líquido, baseada na migração diferenciada de compostos neutros, íons solvatados e espécies ionizáveis, em

um campo elétrico. Existem vários modos de separação, com mecanismos singulares e seletividade característica, tais como: fronteira móvel, zona, isotacoforese, focalização isoelétrica e em gel (Baker, 1995; Tavares, 1996).

Historicamente, esta técnica foi desenvolvida por Tiselius, no início da década de 30, para o estudo de proteínas do soro sanguíneo, através do método da fronteira móvel (Tavares, 1996). Por este trabalho, foi concedido a Tiselius o prêmio Nobel de 1948. Mas foi somente nos anos de 1990, com a implementação das técnicas capilares, que a eletroforese evoluiu de um formato de manipulação intensiva para um formato totalmente automatizado, ganhando o status de técnica analítica de rotina (Tavares, 1996).

Neste trabalho foi aplicado o modo de eletroforese capilar em zona (do inglês, *Capillary Zone Electrophoresis – CZE*).

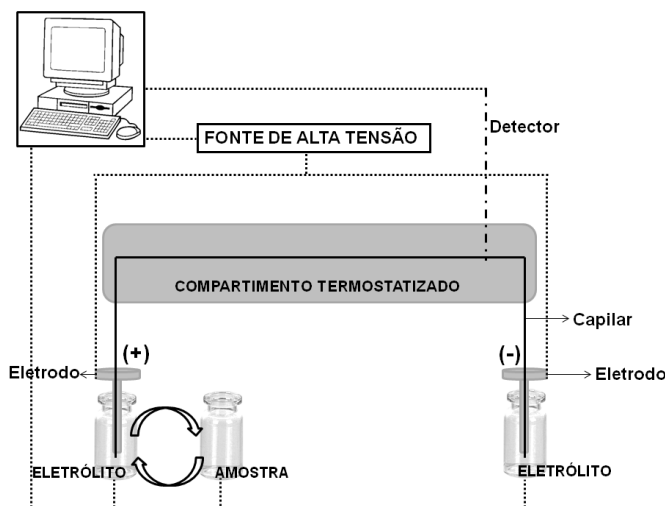
1.4.1 Instrumentação

O sistema de CE consiste de uma fonte de alta tensão, tubos capilares (comumente de sílica fundida, sendo revestidos externamente por polimida, teflon ou poliacrilato), eletrodos de platina, reservatórios para soluções eletrolíticas e um detector apropriado. Os comandos para controle do equipamento, aquisição e tratamento de dados são realizados mediante interface com um computador. A fonte de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar, através da conexão com os eletrodos, que são imersos em reservatórios contendo eletrólito. O sistema pode ser termostaticado por circulação de ar forçado ou líquido refrigerante através do cartucho contendo o capilar (Baker, 1995; Tavares, 1996). Na Figura 1 encontra-se um esquema representando a instrumentação em CE.

Em CE, as amostras podem ser introduzidas no capilar por métodos hidrodinâmicos, aplicando-se um gradiente de pressão; e eletrocinéticos, através de um gradiente de potencial. Injeções hidrodinâmicas são preferidas em aplicações de CZE em solução livre e micelar. O volume (nL) introduzido hidrodinamicamente no capilar é uma alíquota representativa da composição da amostra, e depende do tempo de injeção,

dimensões do capilar, viscosidade da solução tampão e da diferença de pressão estabelecida (Baker, 1995; Tavares, 1996).

Figura 2. Representação esquemática de um sistema básico de CE.



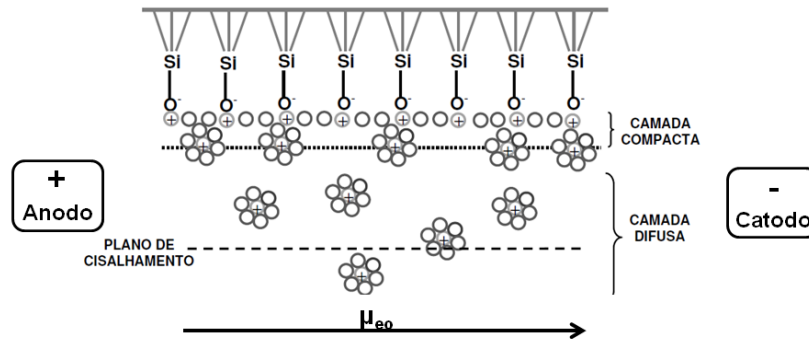
Fonte: Oliveira *et al.*, 2014.

1.4.2 Características das separações eletroforéticas

Uma característica particular da eletroforese capilar consiste no fluxo eletroosmótico. Quando uma alta voltagem é aplicada por meio de um capilar de sílica fundida contendo uma solução de eletrólito ou tampão, um fluxo eletroosmótico é geralmente produzido, causando uma migração do solvente em direção ao cátodo. A causa do fluxo eletroosmótico é a dupla camada elétrica que se desenvolve na interface sílica/solução. A valores de pH maiores que 3, a parede interna do capilar de sílica encontra-se carregada negativamente em virtude da ionização dos grupos silanóis (Si-OH) da sua superfície. Os cátions do tampão congregam-se na dupla camada elétrica, ou camada compacta, adjacente à superfície negativa do capilar de sílica. Os cátions na camada difusa, externa à dupla camada, são atraídos para o cátodo, ou eletrodo negativo, e uma vez que estão solvatados arrastam o solvente com eles (Skoog *et al.*, 2009). A distância na qual uma fração da camada difusa consegue escapar às forças de atração da superfície é caracterizada como o plano de cisalhamento. Este plano delimita

a parte imóvel da região difusa da dupla camada elétrica (Tavares, 1996). A Figura 2 representa o fenômeno descrito anteriormente.

Figura 3. Representação esquemática do fluxo eletrosmótico.



Fonte: Barra, 2014.

A distribuição não homogênea dos íons na camada difusa produz um gradiente de velocidade, conhecido como velocidade eletrosmótica (v_{eo}). A v_{eo} pode ser calculada de modo simplificado pela equação de Helmholtz-Smoluchowski (Equação 1) (Baker, 1995).

$$\vec{v}_{eo} = -\frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} E \quad (1)$$

Onde, ϵ_r é a permissividade relativa da solução, ϵ_0 é a constante de permissividade do vácuo ($\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-2}$), ζ é o potencial desenvolvido no plano de cisalhamento, denominado potencial zeta, em V, E é o campo elétrico aplicado em V cm^{-1} , η é a viscosidade da solução tampão em N s m^{-2} .

Este conjunto de constantes pode ser representado pela mobilidade eletrosmótica (μ_{eo}), em $\text{cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, que é dada pela Equação 2:

$$\vec{\mu}_{eo} = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (2)$$

A velocidade de migração v de um íon (cm s^{-1}) em um campo elétrico pode ser definida pela Equação 3:

$$\vec{\mu}_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} \quad (3)$$

Onde \mathbf{E} (V cm^{-1}) é a intensidade do campo elétrico e μ_{ep} ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) é a mobilidade eletroforética.

A mobilidade eletroforética é proporcional à carga iônica do analito (q) e inversamente proporcional à viscosidade da solução tampão (η) e ao raio do soluto (r) (Equação 4) (Skoog *et al.*, 2009).

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (4)$$

As separações são baseadas na diferença da relação carga-tamanho dos analitos presentes na amostra. Assim, para íons de mesmo tamanho, quanto maior a carga, maior a força motriz e maior a velocidade de migração; para íons de mesma carga, quanto maior o íon, maior o atrito e menor a velocidade de migração (Skoog *et al.*, 2009).

1.4.3 Detecção

O sistema de detecção empregado neste trabalho foi a detecção indireta na região visível do ultravioleta (UV-vis). A detecção indireta foi empregada devido a baixa absorvidade molar dos AG saturados. Assim, foi utilizado um agente cromóforo, que se trata de um composto orgânico com grupos funcionais contendo insaturações que absorvem na região do ultravioleta e do visível (Skoog *et al.*, 2009).

A detecção baseada na interação da luz com a matéria na região visível do espectro (UV/vis) é muito utilizada em CE. A luz que incide sobre o capilar, tem uma fração absorvida pela amostra, no caso pelo agente cromóforo, e a outra fração que não foi absorvida é detectada por um fotodetector, geralmente, um fotodiodo (Baker, 1995).

1.5 CROMATOGRAFIA A GÁS

A cromatografia, de uma maneira geral, é uma técnica na qual os componentes de uma mistura são separados com base nas diferenças de velocidade, e são transportados através de uma fase fixa estacionária, por uma fase móvel que pode ser um líquido, um gás ou um fluido supercrítico. A fase estacionária é imobilizada em uma coluna ou sobre uma superfície plana. A fase móvel movimenta-se através da fase estacionária transportando a mistura dos analitos (Skoog *et al.*, 2009).

Na cromatografia a gás, os componentes de uma amostra vaporizada são separados em consequência de sua partição entre uma fase móvel gasosa e uma fase estacionária líquida ou sólida contida dentro da coluna. Ao realizar uma separação por cromatografia a gás, a amostra é vaporizada e injetada na cabeça da coluna cromatográfica. A eluição é feita por um fluxo de fase móvel gasosa inerte. Em contraste, com muitos outros tipos de cromatografia, a fase móvel não interage com as moléculas do analito, ou seja, sua única função é transportar o analito através da coluna (Skoog *et al.*, 2009).

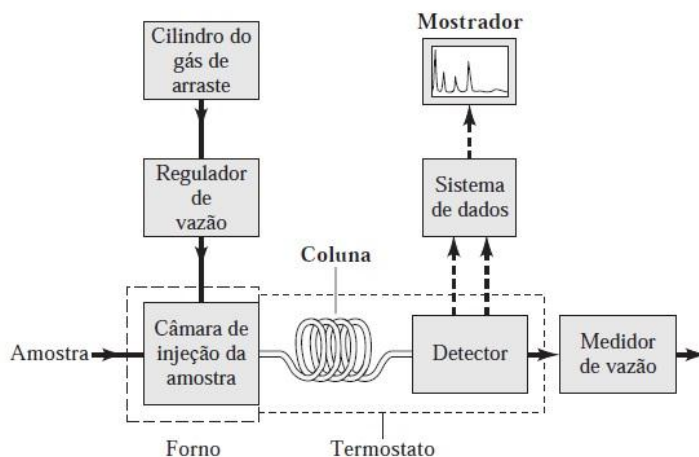
Dois tipos de cromatografia a gás são encontrados: cromatografia gás-líquido (CGL) e cromatografia gás-sólido (CGS). A CGL é baseada na absorção seletiva dos analitos entre a fase móvel gasosa e uma fase líquida imobilizada (fase estacionária) na superfície de um material sólido inerte de recheio ou nas paredes de um tubo capilar. Como este tipo é amplamente utilizado em diversas áreas da ciência, seu nome é geralmente abreviado para cromatografia a gás (do inglês, *Gas Chromatography* – GC). A CGS é baseada em uma fase estacionária sólida na qual a retenção dos analitos ocorre por adsorção (Skoog *et al.*, 2009). O tipo utilizado neste trabalho foi a CGL ou simplesmente GC.

1.5.1 Instrumentação

Um esquema simplificado do equipamento de GC está representado na Figura 3. Reguladores de pressão, manômetros e medidores de vazão são necessários para se controlar a vazão do gás de arraste contido em um cilindro externo ao equipamento. A injeção da amostra é feita através de seringas calibradas, podendo ser feita manual ou automaticamente. A coluna deve ser aquecida para proporcionar uma pressão de vapor

que possibilite a eluição dos analitos em tempo razoável, e, portanto fica inserida em um forno, onde a temperatura pode ser programada. Em seguida um detector apropriado faz a interface dos dados obtidos no equipamento com um software.

Figura 4. Esquema simplificado para a instrumentação em GC.



Fonte: Skoog *et al.*, 2009

1.5.2 Detecção

O sistema de detecção empregado neste trabalho foi o detector de ionização em chama (do inglês, *Flame Ionization Detector* – FID).

O FID é o mais empregado em aplicações de GC em geral. O processo de detecção ocorre quando o efluente da coluna é dirigido para uma pequena chama de ar/hidrogênio. A maioria dos compostos orgânicos produz íons e elétrons quando pirolizados à temperatura de uma chama ar/hidrogênio. A detecção envolve o monitoramento da corrente produzida pela coleta desses portadores de carga. Poucas centenas de volts são aplicadas entre a ponta do queimador e um eletrodo, localizado acima da chama, serve para coletar os íons e elétrons. A corrente resultante é medida com um picoamperímetro (Skoog *et al.*, 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Analisar o perfil de AG em diferentes amostras de manteiga de garrafa.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Observar possíveis adulterações em amostras de manteiga de garrafa;
- ✓ Propor um método alternativo por CZE-UV ao método oficial GC-FID para identificação de possíveis adulterações em amostras de manteiga de garrafa;
- ✓ Comparação estatística dos resultados obtidos pelos diferentes métodos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES, SOLUÇÕES E AMOSTRAS

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água purificada por sistema de osmose reversa. Metanol, isopropanol, ácido acético glacial (Vetec, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), acetonitrila (ACN) (Merck, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil), 1-octanol (Merck, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro Brasil) e hexano (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) foram adquiridos com grau cromatográfico. Polioxoetileno 23 lauril éter (Brij 35®) e dodecilbenzenosulfonato de sódio (SDBS) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), hidróxido de sódio (NaOH) foi obtido de Synth (São Paulo, São Paulo, Brasil) e sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) P.A. da Vetec (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil).

Os padrões individuais dos ácidos tridecanoico (C13:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), elaídico (C18:1 *trans* 9), oleico (C18:1 *cis* 9), linoleico (C18:2 *cis* 9, 12), linolênico (C18:3 *cis* 9, 12, 15) foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) e foram utilizados no desenvolvimento do método por CZE. A mistura de padrões utilizada, contendo 37 ésteres metílicos, (37 Component FAME Mix) foi obtida de Supelco® (Bellefont, PA, USA) sendo utilizada para a identificação dos tempos de retenção dos metil ésteres para o método por GC. O padrão de ácido tridecanoico (C13:0) foi submetido à reação de metilação ácida (Christie, 1993), pois foi utilizado como padrão interno para a quantificação no método por GC.

Soluções estoques individuais dos AG foram preparadas em metanol. Todas as soluções foram estocadas no freezer até o momento das análises.

A solução aquosa de Brij 35® foi preparada na concentração de 50,0 mmol L⁻¹ e mantida a 5°C, cabe ressaltar que seu uso ficou limitado para o prazo de 15 dias. Para a solução aquosa de SDBS, foi preparada na concentração de 100,0 mmol L⁻¹, podendo ser mantida à temperatura ambiente.

A solução tampão (pH ~ 6,86), com concentração de 100,0 mmol L⁻¹, foi preparada a partir da solução de fosfato monobásico de sódio (NaH₂PO₄) 50,0 mmol L⁻¹ e 50,0 mmol L⁻¹ de fosfato dibásico de sódio (Na₂HPO₄), que também foi mantida sob refrigeração, porém sem restrição para o tempo de uso.

Primeiramente foram analisadas cinco diferentes marcas de manteiga de garrafa, compradas em janeiro e fevereiro de 2014, identificadas pelas letras A, B, C, D e E. A amostra A possuía um rótulo que informava que sua origem é Monte Carmelo – MG, e a amostra B, também rotulada, tem sua fabricação feita em Santa Helena de Goiás – GO. Tais amostras foram adquiridas no Mercado Municipal de Juiz de Fora. As amostras C, D e E foram compradas em feiras livres em Salvador e não estavam rotuladas. As amostras obtidas em Salvador foram doadas pela professora do departamento de química da UFJF, Prof. Dr. Maria Auxiliadora Costa Matos. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente, mas abrigadas da luz, e antes de serem submetidas ao preparo foram mantidas em aquecimento em banho térmico a 40°C, para a devida homogeneização.

Em novembro de 2014 outras duas amostras foram compradas para que a comparação entre os métodos fosse feita. Foi necessário comprar novas amostras devido ao tempo e local de armazenamento das amostras A, B, C, D e E, que as tornaram inadequadas para a análise. As amostras, sendo uma de manteiga de garrafa (chamada de G) e outra de manteiga natural (chamada de M), foram obtidas no Mercado Municipal de Juiz de Fora. Tais amostras foram mantidas sob refrigeração e antes de serem submetidas ao preparo foram mantidas em aquecimento em banho térmico a 40°C, para a devida homogeneização.

Para as análises por CZE, o eletrólito de trabalho foi preparado no dia das análises, pela diluição apropriada das soluções estoques e adição de solventes.

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

3.2.1 Eletroforese Capilar

As análises ocorreram através do equipamento de CE 7100 (HP3d CE, Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA), disponível na Universidade Federal de Juiz de Fora, equipado com detector por arranjo de diodos (DAD), com detecção indireta no ultravioleta (UV) em 224 nm, temperatura controlada no interior do cartucho em 25°C, aquisição e tratamento de dados em software (HP ChemStation, rev A.06.01). As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (12.0 mbar por 4 s) e o sistema eletroforético foi operado sob polaridade normal e voltagem constante de + 16 kV. Para

todos os experimentos foi utilizado o capilar de sílica fundida com revestimento externo de Teflon® (TSH) (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA): 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo), 75 µm diâmetro interno (d.i.) e 375 µm de diâmetro externo (d.e.). Neste trabalho, o capilar do tipo TSH evita a adsorção interna na parede do capilar, o que causa problemas na reprodutibilidade das análises (Balesteros et al., 2007).

3.2.2 Cromatografia a gás

Os experimentos foram realizados no equipamento GC 2010-Plus (Shimadzu, Kyoto, Japão) equipado com injetor do tipo split-splitless, auto-injetor AOC 20-i e detector por ionização por chama (FID), disponível na Universidade Federal de Juiz de Fora. A obtenção dos dados foi através do software GC Solution (Shimadzu, Kyoto, Japão). As análises foram realizadas através da coluna CP-Sil 88 for FAME (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) com 100 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,2 µm de espessura do filme sob as seguintes condições de operação: FID em 270 °C, temperatura da coluna programada para iniciar em 80 °C e aumentar em 4 °C a cada minuto até o valor de 220 °C, mantendo essa temperatura durante 5 minutos, e em seguida de 220 °C aumentando 4 °C a cada minuto até o valor de 240 °C, mantendo nesse valor durante 10 min, velocidade linear do H₂ em 23,6 cm/s e injeção em modo split na razão de 1:16 (Agilent Technologies, 2010).

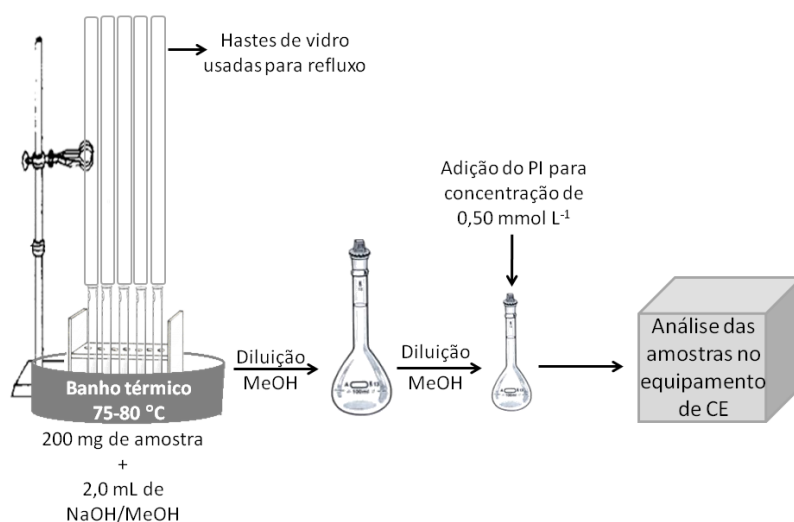
3.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

3.3.1 Metodologia para análise por CZE

Para análise de AG, as amostras foram submetidas à etapa de saponificação (Oliveira *et al.*, 2003), que consiste na reação entre os AG e uma base forte, hidrólise alcalina, tendo como produto sais de AG. A hidrólise alcalina é necessária por dois motivos: primeiro, os AG nos óleos e gorduras encontram-se em sua forma esterificada (triacilglicerol) e não livres; segundo, para que a separação por CZE seja possível os AG devem estar em sua forma aniônica. Assim, para tal reação, cerca de 200 mg de

cada amostra de manteiga de garrafa são transferidos para um balão de fundo redondo, no qual é adicionado 2,00 mL de solução metanólica de NaOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Cada balão permanece sob refluxo, em banho térmico, à temperatura de 75-80 °C durante 25 minutos. Após o término da reação, o produto foi transferido para um balão volumétrico de 10,0 mL, e volume final completado com metanol. Tais soluções estoques foram armazenadas em freezer. Antes de introduzir as amostras no equipamento de CE diluições foram feitas utilizando os volumes de 50, 80, 100 e 200 μL de amostra e o volume necessário de padrão interno (PI) para que sua concentração final fosse de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo transferidos para um balão de 1,0 mL e o volume completado com metanol. A Figura 5 a seguir representa o esquema simplificado do preparo das amostras.

Figura 5. Esquema do preparo das amostras para análise por CZE.



Fonte: Barra *et al.*, 2013.

Os resíduos restantes nos balões de saponificação foram pesados e descontados das massas iniciais pesadas, assim, para os cálculos de quantificação as unidades serão relativas à massa de gordura.

3.3.2 Metodologia para análise por GC

Para análise por GC as amostras foram previamente submetidas à extração da fração lipídica. Para isto, de acordo uma adaptação do método proposto por Hara e

Radin (1978), cerca de 30 mg de amostra foram pesados, em um tubo de ensaio com tampa, e em seguida adicionou-se 7,2 mL de uma mistura de hexano e isopropanol (HIP) na proporção de (3:2), e também 4,8 mL de solução aquosa de Na_2SO_4 ($66,8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Essa mistura foi agitada durante 15 s e posteriormente esperou-se a separação das fases deixando o tubo em repouso. Em seguida, a fase orgânica, que é a superior, foi transferida para um outro tubo e 1 g de Na_2SO_4 anidro foi adicionado, para garantir a ausência de água nesta fase. Após este procedimento a fase orgânica é transferida para um balão de evaporação, e levada ao rota-vapor à 40°C .

A etapa seguinte é o processo de esterificação, no caso, metilação alcalina, que foi feito de acordo com adaptação do método proposto por Christie (2001), no qual adiciona-se 1 mL de hexano para ressuspender a fração lipídica impregnada nas paredes do balão de evaporação, adicionando em seguida 2,0 mL de solução metanólica de NaOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Essa mistura é mantida, durante 10 min, em banho térmico sob refluxo a 50°C . Após o resfriamento, transfere-se do balão de evaporação para um tubo de ensaio com rosca para tampar, e adiciona-se 100 μL de ácido acético glacial e 5,0 mL de água deionizada, e essa mistura é agitada por 15 s. Em seguida, 3,0 mL de hexano são adicionados e novamente agita-se por 15 s. Mediante a separação das fases o sobrenadante é transferido para outro tubo onde Na_2SO_4 anidro é adicionado até que a solução esteja límpida. O sobrenadante é transferido para um balão volumétrico de 5,0 mL e o volume completado com hexano. Assim as amostras estão prontas para serem injetadas no equipamento de GC.

Cabe ressaltar que os resíduos restantes nos balões, após a evaporação de todo o solvente, também foram pesados e descontados das massas iniciais pesadas.

Para fazer a quantificação em termos de massa de gordura foi necessário utilizar um padrão interno (PI), sendo escolhido o C13:0. Para isto foi feita a metilação ácida, adaptado de Christie (1993), deste padrão. Em um tubo de ensaio com tampa adicionou-se 2 mL de solução metanólica de C13:0 (1 mg mL^{-1}) e 2 mL de H_2SO_4 1% em anidro, seguida de agitação durante 10 s. Este tubo foi tampado e levado em banho térmico a 50°C durante 1h. Após o resfriamento adicionou-se solução aquosa de NaCl 5% e em seguida a mistura foi submetida a agitação por 15 s. Em seguida, 2 mL de hexano são adicionados e a mistura agitada por 15 s. Após a separação das fases, a fase superior que é a orgânica, foi transferida para outro tubo contendo cerca de 1 g de Na_2SO_4 anidro, para garantir a ausência total de água. O sobrenadante foi transferido para um balão de 5,0 mL e o volume completado com hexano.

As amostras foram metiladas separadamente do padrão interno pois os ácidos graxos nas amostras estão na forma esterificada, e assim só são metilados através da metilação alcalina. Já o padrão de C13:0 disponível no laboratório está na forma de ácido graxo livre, e ácidos graxos livres só são metilados através da metilação ácida. O ideal seria obter o tridecanoato de metila e prepará-lo juntamente com as amostras.

Apenas as amostras G e M foram analisadas com o uso do padrão interno. Para a análise foram pipetados diretamente no vial 500 µL de amostra e 500 µL da solução metilada de C13:0.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

3.4.1 Cálculo do Fator de Resposta para CZE-UV

A quantificação dos AG nas amostras de manteiga de garrafa foi baseada em um estudo estatístico envolvendo o cálculo do fator de resposta (Fr) usando o C13:0 como padrão interno (PI) (Barra *et al.*, 2012).

A expressão matemática que descreve o Fr está descrita a seguir na Equação 5:

$$\frac{A_{AG}}{[AG]} = Fr \frac{A_{PI}}{[PI]} \quad (5)$$

Onde A_{AG} é a área do pico do padrão do AG de interesse; A_{PI} é a área do pico do padrão interno; $[AG]$ é a concentração do ácido graxo; $[PI]$ é a concentração de padrão interno; Fr é o fator de resposta.

Assim, para calcular o Fr, um modelo de regressão linear pode ser aplicado, no qual a razão das áreas (A_{AG}/A_{PI}) representam as variáveis dependentes e a razão entre as concentrações ($[AG]/[PI]$) representam as variáveis independentes e o Fr é o coeficiente angular do modelo. Portanto, foi feita uma curva de calibração para cada AG de interesse (C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 *9c*, C18:2 *9c*, *12c*, C18:3 *9c*, *12c*, *15c*) com seis diferentes níveis de concentração (0,15; 0,30; 0,50; 0,70; 0,90 e 1,15 mmol L⁻¹), sendo a concentração do PI fixa (0,50 mmol L⁻¹), utilizando soluções metanólicas dos padrões dos AG, bem como triplicatas autênticas em cada nível e sequência de análise aleatória.

A homocedasticidade dos dados foi verificada pelo teste de Cochran e a independência dos resíduos foi verificada pelo teste de Durbin-Watson. As curvas que apresentaram o comportamento homocedástico tiveram o modelo de regressão calculado pelo método dos mínimos quadrados, tais curvas referem-se aos AG: C16:0, C18:1 9c, C18:2 9c, 12c, C18:3 9c, 12c, 15c. Nas curvas do C14:0 e C18:0 as variâncias apresentaram forte dispersão ao longo das retas, assim o comportamento dessas curvas é heterocedástico. Com isto, aplicou-se o método dos mínimos quadrados ponderados para o cálculo do modelo de regressão para o C14:0 e C18:0 (Massart *et al.* 1997).

Para verificar a falta de ajuste do modelo de regressão foi aplicado o teste de hipótese *a priori* (do inglês, *Analysis of Variance* - ANOVA) (Danzer e Currie, 1998; Pimentel e Neto, 1996), de acordo com a Equação 6.

$$F_{calc} = \frac{\sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2 / (m - p)}{\sum \sum (y_{ij} - y_{im})^2 / (n - m)} \quad (6)$$

Onde n_i é o número de repetições no nível i , m é o número de níveis distintos da variável x , p é o número de parâmetros do modelo, $n = \sum n_i$ é o número total de medidas, $(y_e)_i$ é o valor da previsão do modelo em cada nível i , y_{im} é a média das observações em cada nível, y_{ij} é o valor das observações.

A avaliação da ANOVA é feita a partir do cálculo de F_{calc} , assim, se o F_{calc} for menor que o $F_{tabelado}$, dentro do intervalo de confiança estimado, não há falta de ajuste no modelo e o coeficiente angular da equação poderá ser utilizado como Fr na quantificação do referido AG.

Com isto, a Equação 5 será também utilizada na quantificação dos AG nas amostras de manteiga de garrafa, onde o valor do Fr é fixo para cada AG (Tabela 1) e desde que a concentração do PI seja mantida fixa e igual àquela usada na construção do modelo de regressão (0,50 mmol L⁻¹). Se fizermos o reajuste da Equação 5, chegamos à

Equação 7, que expressa o cálculo utilizado para a quantificação de cada AG nas amostras.

$$\%AG = \frac{A_{AG} \cdot [C13:0] \cdot V \cdot Fd \cdot MM_{AG}}{F_R \cdot A_{C13:0} \cdot m} \cdot 100 \quad (7)$$

Onde A_{AG} é a área do pico do AG na amostra; $A_{C13:0}$ é a área do PI; $[C13:0]$ é a concentração fixa de PI ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$); V é o volume do estoque da amostra em litros; Fd é o fator de diluição ($1\text{mL}/\text{volume de amostra}$); MM é a massa molar do ácido graxo; F_r é o fator de resposta (inclinação do modelo ajustado); m é a massa saponificada em miligramas.

3.4.2 Somatório total de áreas e padronização interna para GC-FID

A quantificação dos AG nas amostras de manteiga de garrafa foi adaptada do estudo de Sukhija e Palmquist (1988), na qual relaciona os valores das áreas com o valor da massa de PI.

Primeiramente faz-se o somatório total das áreas (STA) dos picos identificados e não identificados, excluindo a área do PI (A_{PI}). Em seguida relaciona-se a área do PI à massa utilizada, no caso 2 mg (ver item 3.3.2), de acordo com a seguinte relação:

$$\text{Teor total de AG} = \frac{(STA) \cdot 2 \text{ mg}}{A_{PI}} \quad (8)$$

Onde STA é o somatório total das áreas excluindo a área do PI, A_{PI} é a área do C13:0 metilado, e 2 mg a quantidade de PI utilizada na metilação.

Em seguida relaciona-se o teor total de AG (T_{AG}), que está em mg, com o valor da massa de amostra em g. No caso deste trabalho a massa utilizada para este cálculo foi a massa extraída, que é a diferença entre a massa de amostra pesada e a massa de resíduo restante no balão após a extração da amostra. A relação resultante será:

$$\text{Teor relativo de AG} = \frac{(T_{AG})}{m \text{ extraída}} \quad (9)$$

Onde T_{AG} é o teor total de AG em miligramas, **m extraída** é a massa de amostra que foi extraída em gramas.

Para calcular a massa de um AG de interesse em relação à massa extraída relaciona-se ao valor da área do referido AG e com o somatório total das áreas excluindo a área do PI juntamente com o teor relativo de AG (TR) calculado na expressão 9.

$$\text{massa relativa de AG} = \frac{(A_{AG}) \cdot TR}{STA} \quad (10)$$

Onde A_{AG} é a área do pico do AG de interesse, **TR** é o teor relativo de AG, e **STA** é o somatório total das áreas excluindo a área do PI.

Com a equação 10 obteremos a massa do AG em relação à massa extraída em mg g^{-1} . Esta notação é interessante quando a concentração do AG na amostra for naturalmente muito baixo. Mas podemos também expressar a massa relativa em termos de porcentagem, ou seja, em g de AG por 100 g de amostra. Para isto basta dividir o valor encontrado por 1000, que seria a conversão de mg para g, e em seguida multiplicar por 100, que se refere à quantidade de amostra. No caso deste trabalho os resultados encontrados serão apresentados em g de AG por 100 g de massa extraída, que corresponde à unidade $\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ de gordura.

Um outro termo utilizado nos resultados deste trabalho foi o percentual de área que corresponde à porcentagem de um AG em relação aos demais. Para o cálculo do percentual de área basta considerar que o somatório total das áreas excluindo o a área do PI é 100 % e a área do AG de interesse é uma fração, assim tem-se:

$$\% \text{ \textit{área AG}} = \frac{A_{AG}}{STA} \cdot 100 \quad (11)$$

Onde A_{AG} é a área do pico do AG de interesse e STA é o somatório total das áreas excluindo a área do PI.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O eletrólito utilizado nas análises consistiu de 15 mmol L⁻¹ de solução tampão NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH ~ 6,86); 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS; 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35®, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v de 1-octanol conforme descrito em um trabalho de Barra *et al.* (2012).

Os valores encontrados para os Fr (coeficiente angular) dos AG em questão foram apresentados na Tabela 1, onde podemos verificar também os valores de F_{calc}, que se apresentou menor que o F_{tabelado}, confirmando que, para um intervalo de confiança a 95%, não há falta de ajuste para os modelos apresentados.

Tabela 1. Valores obtidos na regressão, ANOVA e Fr para cada AG.

AG	F _{calc}	F _{tab} [#]	Coefficiente Angular (Fr)	Intercepto	R ²
^a C18:0	1,44	3,26	0,344(±0,018)	-0,011(±0,06)	0,954
^b C18:1 9c	0,89	3,26	0,453(±0,041)	-0,014(±0,06)	0,875
^b C16:0	0,69	3,26	0,557(±0,034)	-0,0004(±0,05)	0,941
^b C18:2 9c, 12c	0,24	3,26	0,534(±0,050)	-0,060(±0,07)	0,869
^b C18:3 9c, 12c, 15c	0,25	3,26	0,604(±0,027)	-0,056(±0,04)	0,968
^a C14:0	2,07	3,26	0,716(±0,037)	-0,022(±0,02)	0,957

[#] F_{tab} (v₁=4, v₂=12);

v₁: grau de liberdade do numerador;

v₂: grau de liberdade do denominador;

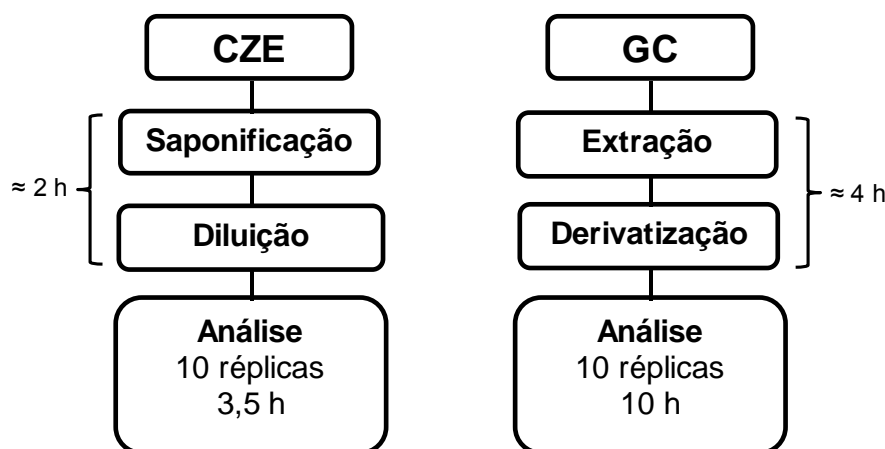
^a regressão ponderada;

^b regressão normal.

A comparação entre o método de análise alternativo por CZE e o método oficial por GC foi feita, neste trabalho, em relação ao tempo de preparo da amostra, ao tempo total de análise, qualitativamente e quantitativamente.

No fluxograma mostrado na Figura 6 é possível comparar os tempos para o preparo das amostras para cada método bem como o tempo total de análise levando-se em consideração um total de 10 réplicas.

Figura 6. Comparação entre os métodos no que diz respeito ao tempo no preparo da amostra e tempo total de análise.



Fonte: o autor.

É possível notar que o método alternativo por CZE apresenta um ganho bastante significativo na frequência analítica, pois o tempo gasto para preparar e analisar 10 réplicas é de aproximadamente 6 h, enquanto que para o método oficial por GC leva-se um tempo aproximado de 14 h, para os AG de interesse neste trabalho.

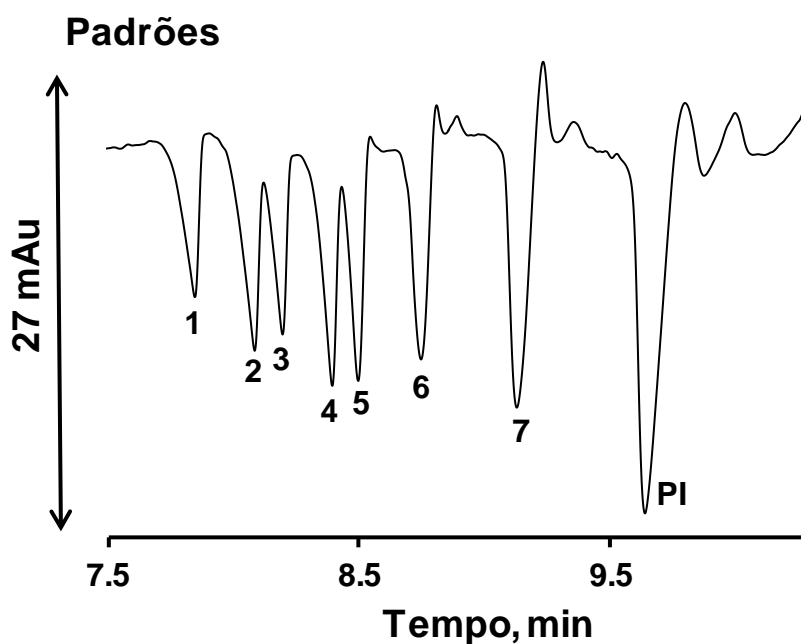
A seguir as discussões serão voltadas para a comparação qualitativa e quantitativa entre os métodos.

Conforme foi discutido no item 1.3.2 a ordem de migração dos ácidos graxos pelo método por CZE é: C18:0, C18:1 *trans* 9, C18:1 *cis* 9, C16:0, C18:2 *cis* 9, 12, C18:3 *cis* 9, 12, 15, C14:0, C13:0 (PI). Na Figura 7 apresenta-se o eletroferograma de uma mistura de padrões desses AG.

O padrão utilizado para a identificação do ácido graxo *trans* foi o ácido eláidico (C18:1 *trans* 9). Porém em produtos derivados da gordura do leite de ruminantes está presente o ácido vacênico (C18:1 *trans* 11). Tais isômeros têm a separação complicada por GC (Golay *et al.* 2009). Por CZE já foi feito um estudo no Grupo de Química Analítica e Quimiometria que mostrou que tais ácidos possuem o mesmo tempo de migração. Assim, o padrão de C18:1 *trans* 9 será utilizado apenas para a identificação qualitativa de ácidos graxos *trans* total nas amostras, e será representado nos resultados por C18:1 *trans* ou C18:1 *t*.

Figura 7. Eletroferograma de uma mistura de padrões dos AG. (1) C18:0, (2) C18:1 *trans* 9, (3) C18:1 *cis* 9, (4) C16:0, (5) C18:2 *cis* 9, 12, (6) C18:3 *cis* 9, 12, 15, (7) C14:0, (PI) C13:0, todos com concentração de 0,50 mmol L⁻¹.

Eletrólito: 15 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH ~ 6,86); 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS; 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v de 1-octanol. **Condições de análise:** injeção 4s x 12,5 mbar, + 19 kV, 25 °C, detecção indireta em 224 nm, capilar de TSH com 75 µm d.i., 40 cm de comprimento efetivo e 48,5 cm de comprimento total.

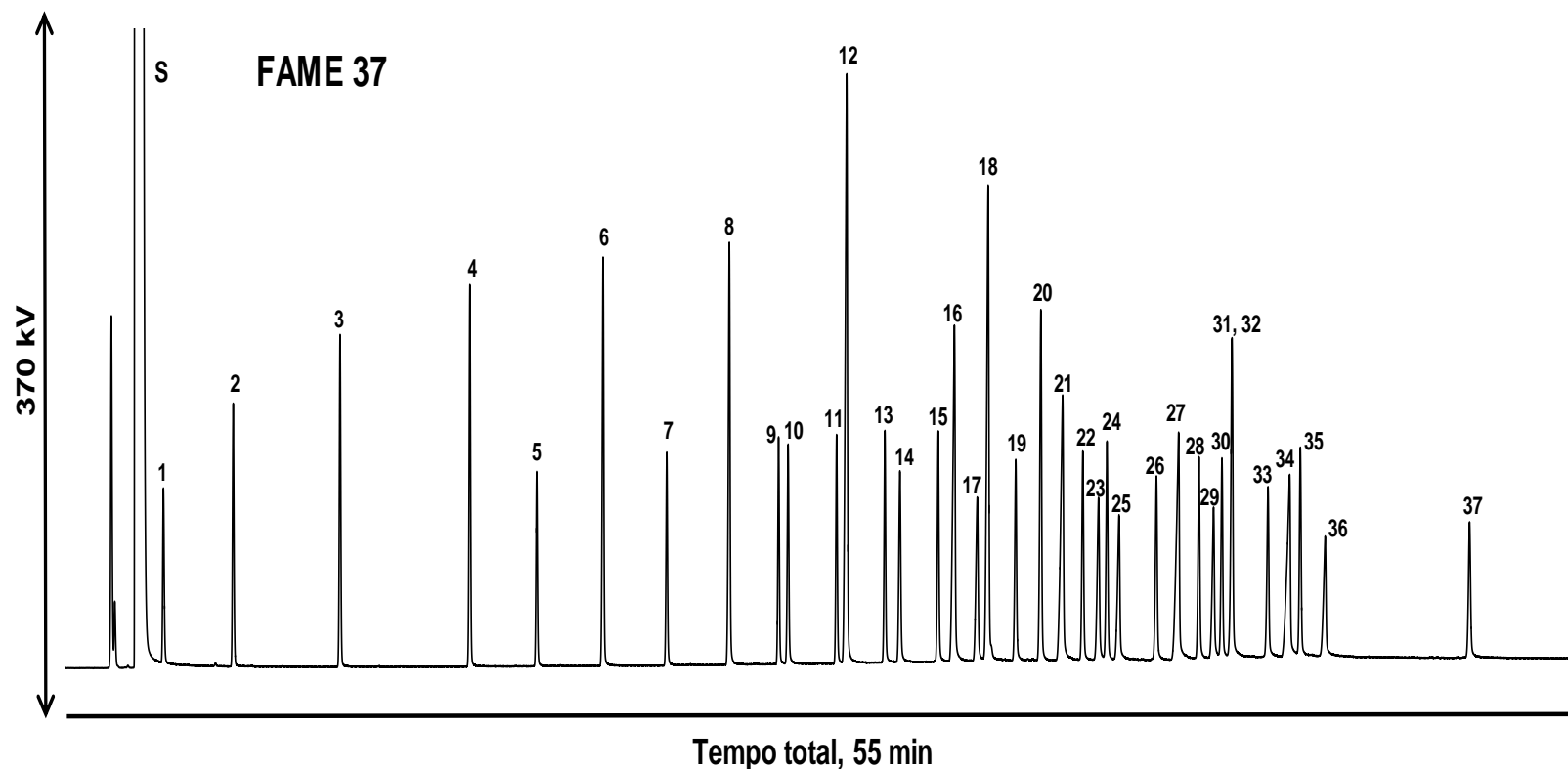


Fonte: o autor

Para o método por GC foi utilizada uma mistura de padrões contendo 37 padrões de metil ésteres de ácidos graxos, FAME MIX 37, na qual a ordem de eluição encontra-se no cromatograma apresentado na Figura 8. Os tempos de retenção de cada AG no FAME MIX 37 foram apresentados na Tabela 2.

Figura 8. Cromatograma FAME MIX 37 (S) Solvente – Diclorometano (1) C4:0, (2) C6:0, (3) C8:0, (4) C10:0, (5) C11:0, (6) C12:0, (7) C13:0, (8) C14:0, (9) C14:1, (10) C15:0, (11) C15:1, (12) C16:0, (13) C16:1, (14) C17:0, (15) C17:1, (16) C18:0, (17) C18:1 *trans* 9, (18) C18:1 *cis* 9, (19) C18:2 *trans* 9, 12, (20) C18:2 *cis* 9, 12, (21) C20:0, (22) C18:3 *cis* 6, 9, 12 *gama*, (23) C20:1 *cis* 11, (24) C18:3 *cis* 9, 12, 15 *alfa*, (25) C21:0, (26) C20:2 *cis* 11, 14, (27) C22:0, (28) C20:3 *cis* 8, 11, 14, (29) C22:1 *cis* 13, (30) C20:3 *cis* 11, 14, 17, (31) C20:4 *cis* 5, 8, 11, 14, (32) C23:0, (33) C22:2 *cis* 13, 16, (34) C24:0, (35) C20:5 *cis* 5, 8, 11, 14, 17, (36) C24:1 *cis* 15, (37) C22:6 *cis* 4, 7, 10, 13, 16, 19.

Condições de análise: FID em 270°C, temperatura da coluna programada para iniciar em 80°C e aumentar em 4°C a cada minuto até o valor de 220°C, mantendo essa temperatura durante 5 minutos, e em seguida de 220°C aumentando 4°C a cada minuto até o valor de 240°C, mantendo nesse valor durante 10 min, velocidade linear do H₂ em 23,6 cm/s, injeção em modo split na razão de 1:16, coluna CP-Sil 88 for FAME de 100 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,2 µm de espessura do filme.



Fonte: o autor

Tabela 2. Tempos de retenção de cada AG na mistura de padrões FAME MIX 37.

Pico	AG	FAME MIX 37 Tempo R. (min)
1	C4:0	10,54
2	C6:0	12,73
3	C8:0	16,10
4	C10:0	20,15
5	C11:0	22,24
6	C12:0	24,32
7	C13:0	26,31
8	C14:0	28,27
9	C14:1	29,82
10	C15:0	30,12
11	C15:1	31,64
12	C16:0	31,95
13	C16:1	33,15
14	C17:0	33,62
15	C17:1	34,82
16	C18:0	35,33
17	C18:1 <i>trans</i> 9	36,04
18	C18:1 <i>cis</i> 9	36,39
19	C18:2 <i>trans</i> 9, 12	37,25
20	C18:2 <i>cis</i> 9, 12	38,04
21	C20:0	38,72
22	C18:3 <i>cis</i> 6, 9, 12	39,35
23	C20:1 <i>cis</i> 11	39,84
24	C18:3 <i>cis</i> 9, 12, 15	40,11
25	C21:0	40,49
26	C20:2 <i>cis</i> 11, 14	41,66
27	C22:0	42,35
28	C20:3 <i>cis</i> 8, 11, 14	42,99
29	C22:1 <i>cis</i> 13	43,45
30	C20:3 <i>cis</i> 11, 14, 17	43,71
31*	C20:4 <i>cis</i> 5, 8, 11, 14	44,03
32*	C23:0	44,03
33	C22:2 <i>cis</i> 13, 16	45,15
34	C24:0	45,83
35	C20:5 <i>cis</i> 5, 8, 11, 14, 17 EPA	46,17
36	C24:1 <i>cis</i> 15	46,95
37	C22:6 <i>cis</i> 4, 7, 10, 13, 16, 19 DHA	51,47

*coeluem

As primeiras amostras de manteiga de garrafa analisadas foram das marcas A, B, C, D e E, sendo as duas primeiras obtidas no Mercado Municipal de Juiz de Fora e as três últimas em feiras livres de Salvador. Na Figura 9 estão apresentados trechos dos cromatogramas das amostras A, B, C, D e E. Os cromatogramas completos encontram-se nos APÊNDICES deste trabalho. Na Tabela 3 encontram-se os valores para o percentual de área para os picos de cada amostra.

Ao observar os cromatogramas da Figura 9 atentou-se para o fato de que a concentração do C18:2 *cis* 9, 12, pico 20, está elevada para as manteigas de garrafa das marcas A, B, C e E, diferente do que foi encontrado para a amostra da marca D.

Ao analisar duas marcas diferentes de manteiga de garrafa de Recife – PE Ambrósio *et al.* (2001) determinaram, entre outros AG, que o percentual de área do C18:2 era de 3.71 para a marca A e 2.60 para a marca B. Em um novo estudo, sobre a determinação da estabilidade da manteiga de garrafa, Ambrósio *et al.* (2003) analisaram as manteigas A e B de acordo com o tempo de armazenamento, tempo zero, 30, 90 e 120 dias, e o maior percentual em área encontrado para o C18:2 com o prazo de 120 dias foi de 3.68 para a manteiga B. Clemente *et al.* (2009) determinou o perfil dos AG em dez diferentes marcas de manteiga de garrafa produzidas na região de Salinas – MG e o maior percentual encontrado, entre tais marcas, para o C18:2 foi de 4.08.

Observando a Tabela 3 percebemos que a única marca que concorda com os valores de percentual descritos na literatura para o ácido linoleico é a marca D.

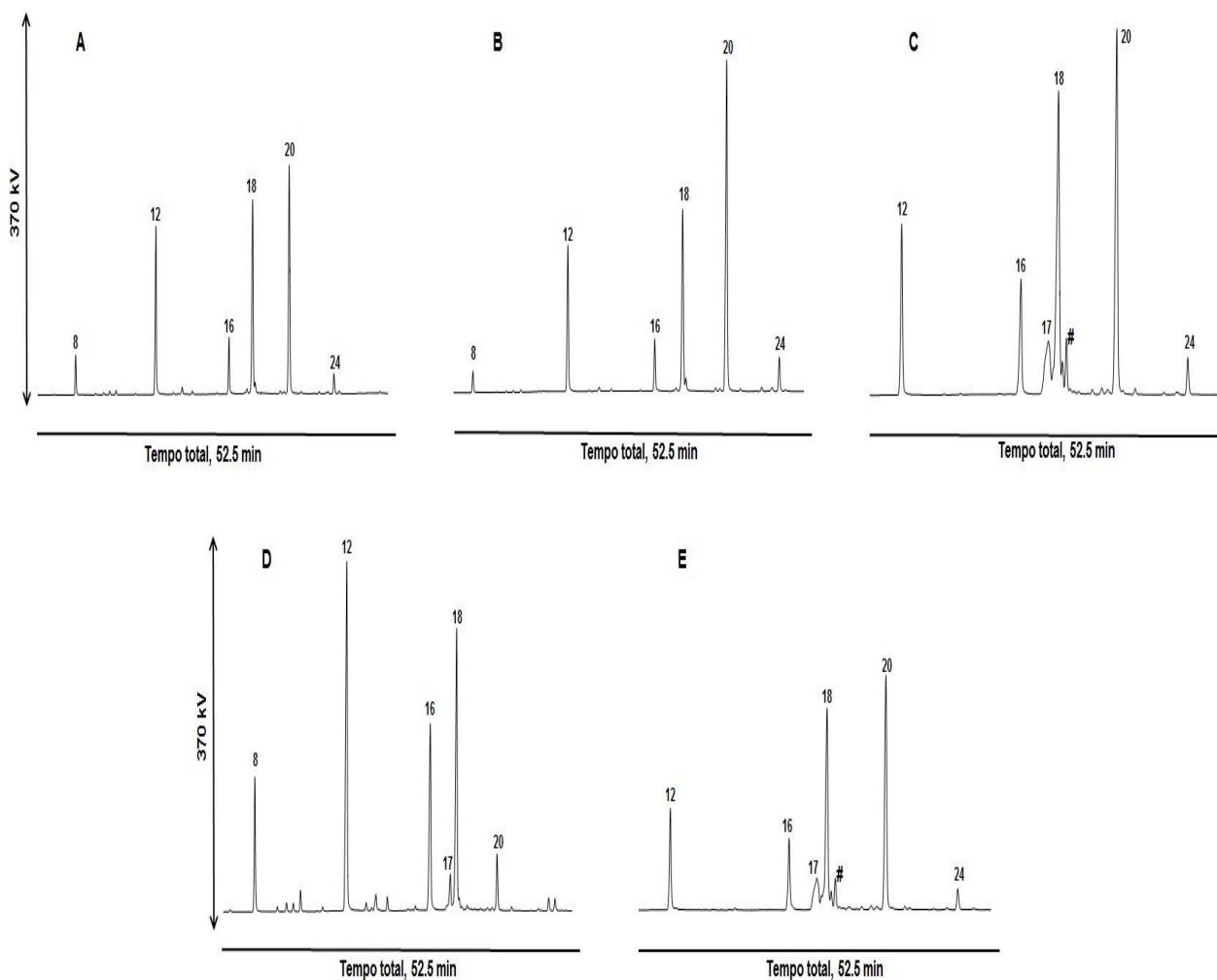
Tabela 3. Valores dos percentuais em área dos principais AG encontrados nas amostras A, B, C, D e E pelo método por GC.

Amostras	C18:0	C18:1 <i>t</i>	C18:1 <i>9c</i>	C16:0	C18:2 <i>cc</i>	C18:3 <i>ccc</i>	C14:0
A1	5,55	0,74	22,62	16,21	24,83	2,00	3,25
A2	6,29	0,89	26,51	19,41	29,18	2,38	3,92
B1	5,15	---	23,05	15,13	42,77	3,70	1,89
B2	5,15	---	23,28	15,10	42,28	3,61	1,89
C1	9,10	10,11	34,75	10,40	27,22	2,30	---
C2	8,74	9,23	35,16	10,55	28,64	2,36	---
D1	15,46	3,34	24,18	28,77	3,76	---	8,15
D2	15,43	3,52	23,30	30,00	1,45	---	7,82
E1	7,24	7,32	34,21	11,25	32,18	2,22	---
E2	8,48	8,87	33,75	10,27	28,36	2,36	---

--- ausente

Figura 9. Cromatograma de diferentes marcas (A, B, C, D e E) de manteiga de garrafa. (8) C14:0, (12) C16:0, (16) C18:0, (17) C18:1 *trans*, (18) C18:1 *cis* 9, (20) C18:2 *cis* 9, 12, (24) C18:3 *cis* 9, 12, 15 *alfa*, (#) possível isômero de posição do C18:1 *cis* 9.

Condições de análise: FID em 270°C, temperatura da coluna programada para iniciar em 80°C e aumentar em 4°C a cada minuto até o valor de 220°C, mantendo essa temperatura durante 5 minutos, e em seguida de 220°C aumentando 4°C a cada minuto até o valor de 240°C, mantendo nesse valor durante 10 min, velocidade linear do H₂ em 23,6 cm/s, injeção em modo split na razão de 1:16, coluna CP-Sil 88 for FAME de 100 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,2 µm de espessura do filme.



Fonte: o autor

Estas observações em relação ao percentual discrepante entre as amostras para o C18:2 *cis* 9, 12, juntamente com a comparação dos valores descritos em trabalhos anteriores chamou a atenção para uma possível fraude para as marcas A, B, C e E. O que ajuda a corroborar com este fato é que por se tratar de um produto derivado do leite, tanto a manteiga em barra, quanto a manteiga de garrafa devem possuir baixos teores de ácido linoleico em sua composição (Jensen, 2002).

De acordo com Decreto Nº 2244, de 4 de junho de 1997, no Art. 568, relacionado ao Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, entende-se por manteiga o produto gorduroso obtido exclusivamente pela bateção e malaxagem, com ou sem modificação biológica do creme pasteurizado, derivado exclusivamente do leite de vaca, por processos tecnologicamente adequados. A matéria gorda da manteiga deverá estar composta exclusivamente de gordura láctea (BRASIL, 1997).

Apesar de não existir um decreto semelhante exclusivo para a manteiga de garrafa, sabe-se que o seu processo de fabricação passa pela etapa de produção da manteiga, diferenciando-se apenas na etapa da fusão. Assim, a manteiga de garrafa deve ser também um produto derivado exclusivamente do leite de vaca.

Dentre as possibilidades de fraudar um alimento como a manteiga de garrafa os melhores candidatos seriam os óleos vegetais. De acordo com a Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 1999), o teor de ácido linoleico em diferentes óleos vegetais varia entre 15 a 70 %. Para exemplificar, ainda de acordo com a ANVISA (1999), o teor de ácido linoleico encontrado no óleo de girassol varia entre 55 – 75 %, no óleo de milho entre 34 – 62 % e no óleo de soja entre 44 – 62 %. Ao observar a Tabela 3 percebemos que os teores de ácido linoleico para as marcas A, B, C e E estão mais coerentes com os valores encontrados para os teores de óleos vegetais, apoiando a conclusão de que as referidas marcas não se tratam de um derivado vindo exclusivamente do leite, mas sim uma possível mistura com óleos vegetais.

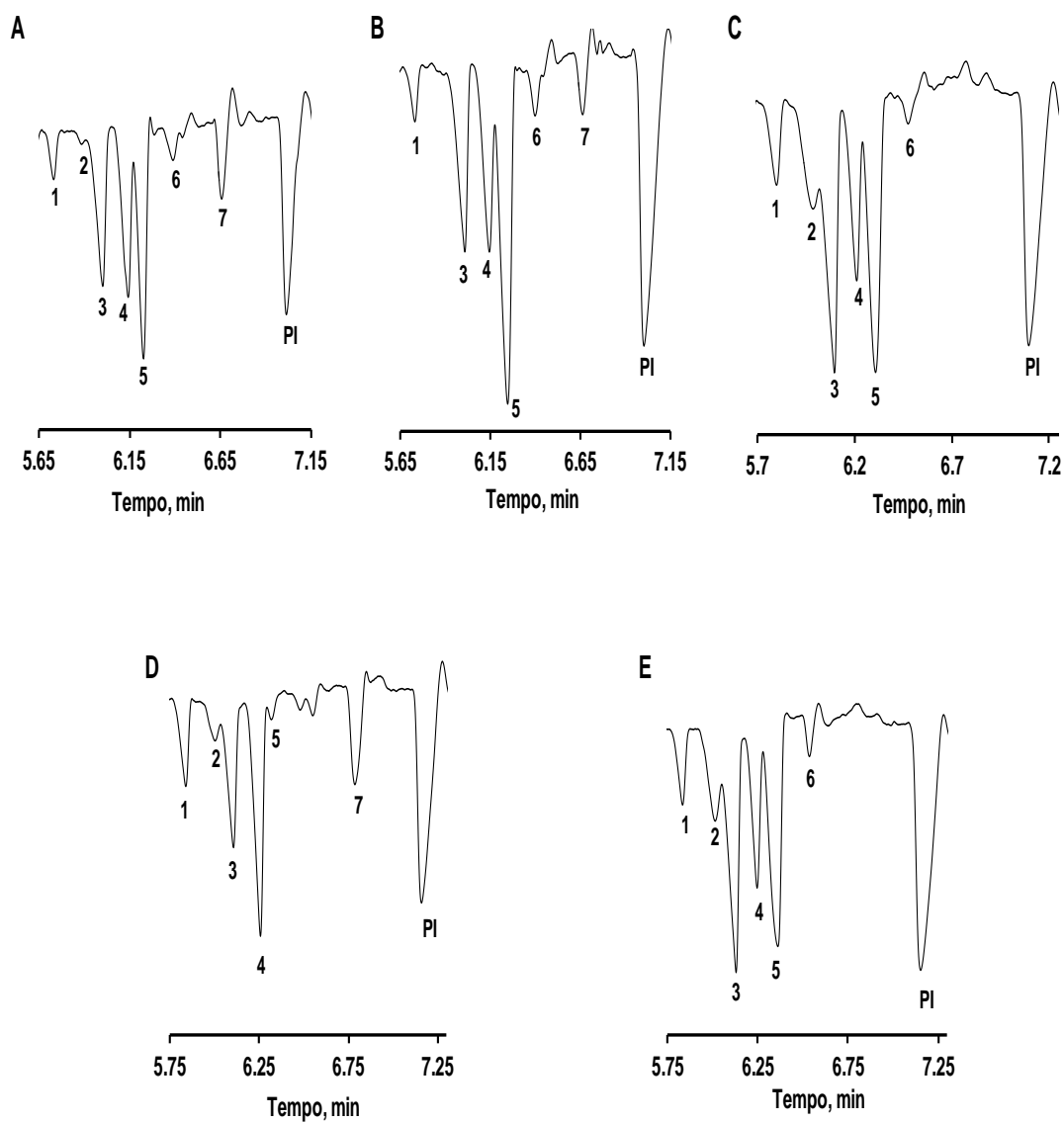
Outra importante observação foi feita em relação aos elevados teores de AG trans nas amostras C e E. Sabe-se que na gordura do leite esses teores chegam a 3 % (Jensen, 2002) e em óleos vegetais não foram considerados teores significativos de AG

trans para diferentes tipos de óleos (ANVISA, 1999). Um estudo feito por Sanibal e Mancini Filho (2004), mostrou que o óleo de soja submetido ao processo de fritura em um intervalo de tempo de 0 a 50 horas de fritura apresentou um aumento de AG trans de 0 para 11,43 %, concordando com os teores encontrados para as amostras C e E.

As amostras A, B, C, D e E, também foram analisadas pelo método por CZE e os eletroferogramas encontram-se na Figura 10. Os resultados encontrados para as amostras A, B, C, D e E por CZE serão avaliados apenas qualitativamente, pois devido a uma alteração no método para o comprimento do capilar (de 40 cm de comprimento efetivo para 31,5 cm) e na voltagem (de +19 kV para +16 kV), os valores encontrados na quantificação não foram coerentes para uma mesma amostra. Com isto podemos comparar as Figuras 9 e 10 e perceber a presença, ou ausência, dos AG em concordância entre os diferentes métodos propostos.

Figura 10. Eletroferogramas de amostras de manteiga de garrafa de diferentes marcas A, B, C, D e E. (1) C18:0, (2) C18:1 *trans*, (3) C18:1 *cis* 9, (4) C16:0, (5) C18:2 *cis* 9, 12, (6) C18:3 *cis* 9, 12, 15, (7) C14:0, (PI) C13:0.

Eletrólito: 15 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH ~ 6,86); 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS; 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v de 1-octanol. **Condições de análise:** injeção 4s x 12,5 mbar, + 16 kV, 25 °C, detecção indireta em 224 nm, capilar de TSH com 75 µm d.i., 31,5 cm de comprimento efetivo e 40 cm de comprimento total.



Fonte: o autor

Com a finalidade de comparar quantitativamente o método de análise alternativo por CZE e o método oficial por GC novas análises foram realizadas com diferentes amostras. As duas amostras foram obtidas no Mercado Municipal de Juiz de Fora, sendo uma amostra rotulada como manteiga de garrafa denominada neste trabalho por “G” e outra de manteiga em barra, ou amostra “M”.

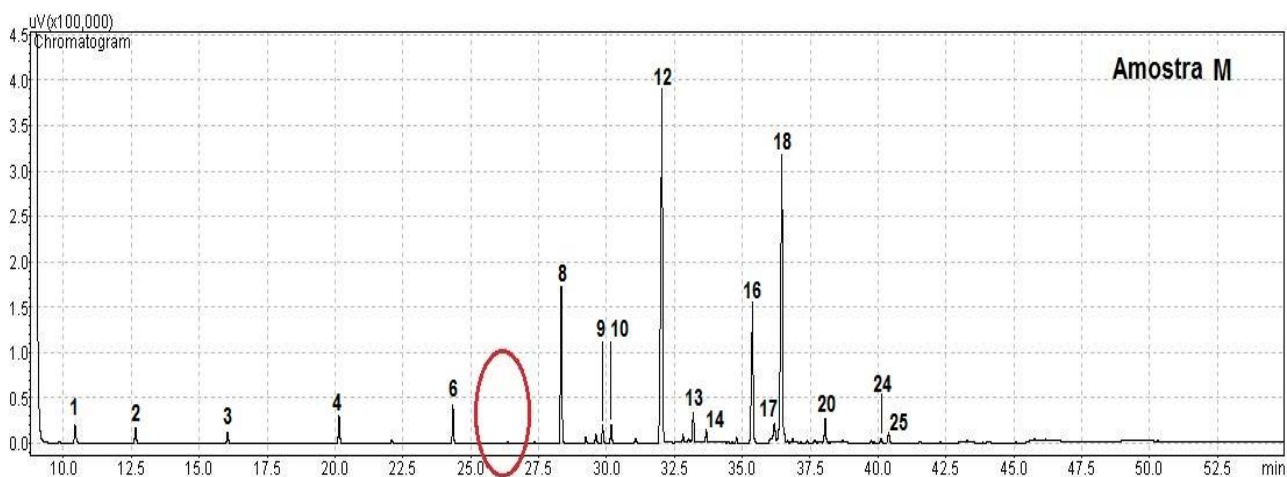
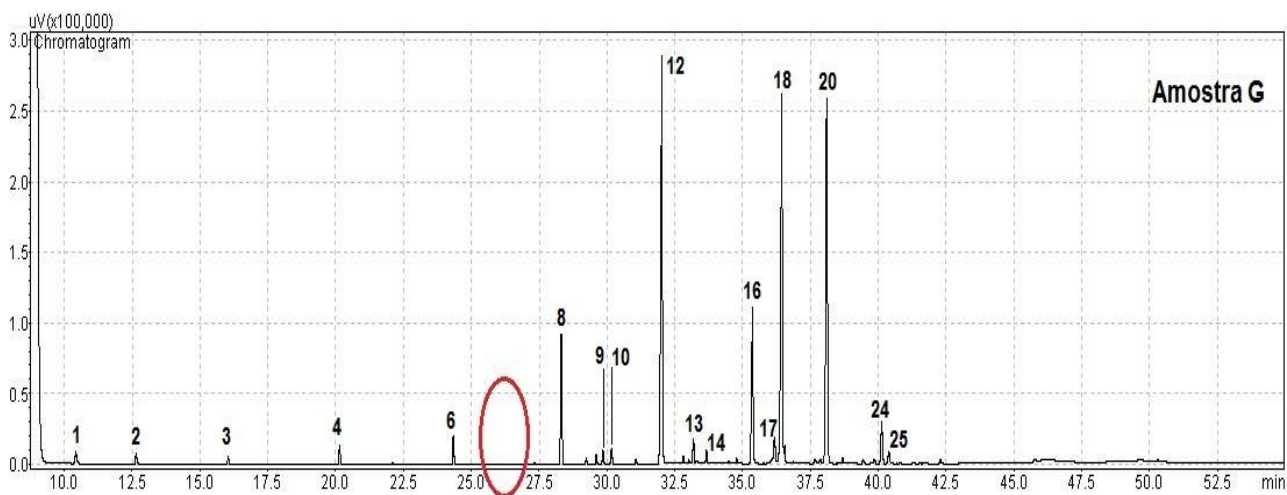
Para poder comparar quantitativamente os métodos, quantificou-se as amostras por CZE e por GC utilizando como padrão interno o C13:0, conforme descrito nos itens 4.1 e 4.2, respectivamente para cada método. A princípio foi certificado que as amostras G e M não continham o C13:0 em sua composição, os cromatogramas encontram-se na Figura 11.

Na Figura 12 encontram-se os cromatogramas de réplicas autênticas de G e M com os picos identificados, incluindo o PI. Os tempos de retenção dos picos identificados e dos não identificados para cada réplica estão apresentados em tabelas nos APÊNDICES. Na Figura 13 tem-se os eletroferogramas de réplicas autênticas das amostras G e M.

O resultado da quantificação, bem como o resultado da comparação estatística entre os métodos constam na Tabela 4.

Figura 11. Cromatograma das amostras G e M com destaque para a região que evidencia a ausência de C13:0 nas amostras. (1) C4:0, (2) C6:0, (3) C8:0, (4) C10:0, (6) C12:0, (8) C14:0, (9) C14:1, (10) C15:0, (12) C16:0, (13) C16:1, (14) C17:0, (16) C18:0, (17) C18:1 *trans*, (18) C18:1 *cis* 9, (20) C18:2 *cis* 9, 12, (24) C18:3 *cis* 9, 12, 15 *alfa*, (25) C21:0.

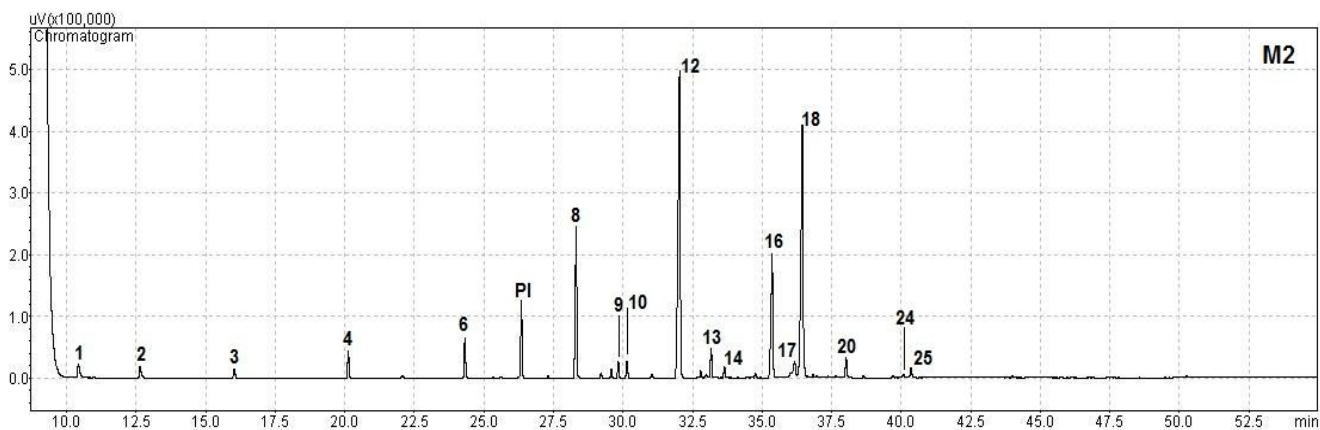
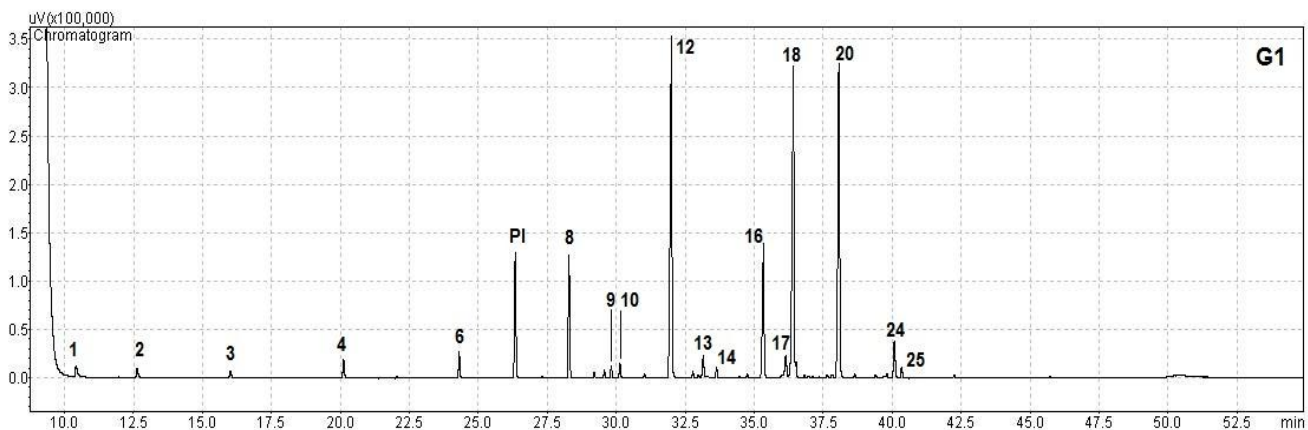
Condições de análise: FID em 270°C, temperatura da coluna programada para iniciar em 80°C e aumentar em 4°C a cada minuto até o valor de 220°C, mantendo essa temperatura durante 5 minutos, e em seguida de 220°C aumentando 4°C a cada minuto até o valor de 240°C, mantendo nesse valor durante 10 min, velocidade linear do H₂ em 23,6 cm/s, injeção em modo split na razão de 1:16, coluna CP-Sil 88 for FAME de 100 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,2 µm de espessura do filme.



Fonte: o autor.

Figura 12. Cromatogramas de réplicas autênticas das amostras G e M. (1) C4:0, (2) C6:0, (3) C8:0, (4) C10:0, (6) C12:0, (PI) C13:0, (8) C14:0, (9) C14:1, (10) C15:0, (12) C16:0, (13) C16:1, (14) C17:0, (16) C18:0, (17) C18:1 *trans*, (18) C18:1 *cis* 9, (20) C18:2 *cis* 9, 12, (24) C18:3 *cis* 9, 12, 15 *alfa*, (25) C21:0.

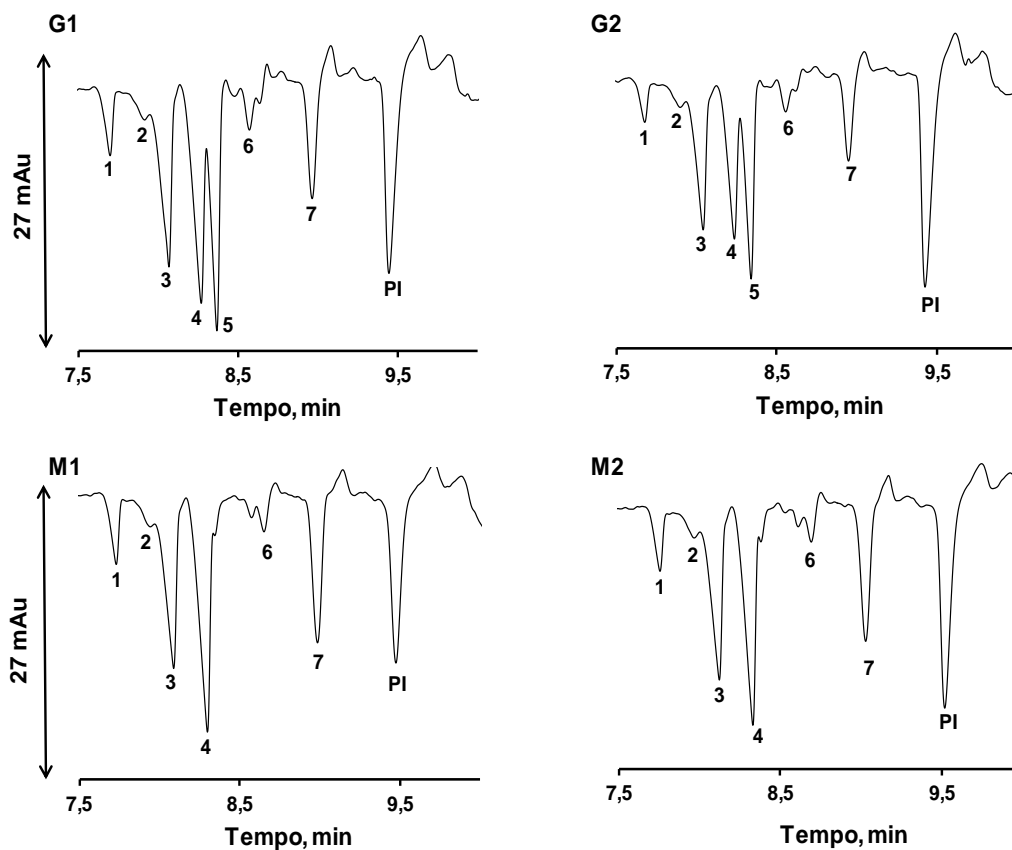
Condições de análise: FID em 270°C, temperatura da coluna programada para iniciar em 80°C e aumentar em 4°C a cada minuto até o valor de 220°C, mantendo essa temperatura durante 5 minutos, e em seguida de 220°C aumentando 4°C a cada minuto até o valor de 240°C, mantendo nesse valor durante 10 min, velocidade linear do H₂ em 23,6 cm/s, injeção em modo split na razão de 1:16, coluna CP-Sil 88 for FAME de 100 m de comprimento, 0,25 mm d.i. e 0,2 µm de espessura do filme.



Fonte: o autor.

Figura 13. Eletroferogramas de réplicas autênticas das amostras G e M. (1) C18:0, (2) C18:1 *trans*, (3) C18:1 *cis* 9, (4) C16:0, (5) C18:2 *cis* 9, 12, (6) C18:3 *cis* 9, 12, 15, (7) C14:0, (PI) C13:0.

Eletrólito: 15 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH ~ 6,86); 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS; 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v de 1-octanol. **Condições de análise:** injeção 4s x 12,5 mbar, + 19 kV, 25 °C, detecção indireta em 224 nm, capilar de TSH com 75 µm d.i., 40 cm de comprimento efetivo e 48,5 cm de comprimento total.



Fonte: o autor

Tabela 4. Teores dos AG (g 100 g⁻¹ de gordura) nas amostras G e M determinados por CZE e por GC.

AMOSTRA	C18:0		C18:1 9c		C16:0		C18:2 cc		C18:3 ccc		C14:0	
	CE	GC	CE	GC	CE	GC	CE	GC	CE	GC	CE	GC
Manteiga de Garrafa												
G1	6,04	5,71	13,57	15,43	14,83	15,75	13,11	14,38	1,10	1,46	4,40	4,18
G2	5,97	5,60	14,53	15,22	13,80	15,30	13,85	14,26	1,43	1,46	4,00	3,98
Média	6,01	5,66	14,05	15,33	14,32	15,52	13,48	14,32	1,27	1,46	4,20	4,08
Desvio Padrão	0,047	0,082	0,683	0,148	0,730	0,322	0,519	0,081	0,234	0,003	0,282	0,140
Manteiga												
M1	7,85	8,36	19,99	19,47	25,20	23,63	*	1,05	*	0,17	7,90	7,76
M2	7,10	8,58	21,31	19,92	23,99	24,20	*	1,07	*	0,19	7,97	8,06
Média	7,47	8,47	20,65	19,70	24,60	23,92		1,06		0,18	7,93	7,91
Devio Padrão	0,534	0,156	0,931	0,313	0,858	0,400		0,012		0,009	0,048	0,212
^aTeste t (p-valor)		0,52		0,84		0,72		--		--		0,39
^aNormalidade		0,32		0,92		0,61		--		--		0,92
^bLOD (mmol L⁻¹)		0,0818		0,0725		0,0573		0,0583		0,0608		0,0472
^bLOQ (mmol L⁻¹)		0,2725		0,2416		0,1910		0,1944		0,2027		0,1572
^bFaixa Linear (mmol L⁻¹)		0,15-1,10		0,15-1,10		0,15-1,10		0,15-1,10		0,15-1,10		0,15-1,10

*abaixo do LOQ;

^ap-valor > 0,05;

^bValores calculados para CZE;

LOD: limite de detecção;

LOQ: limite de quantificação;

Normalidade: Teste de Shapiro-Wilk.

Novamente foi possível perceber que a marca G comercializada como sendo manteiga de garrafa possui um alto teor para o ácido linoleico, diferentemente da manteiga em barra da marca M. Com isto conclui-se que a amostra da marca G não se trata de um produto derivado apenas do creme do leite, ao contrário da marca M.

No rótulo da amostra G observa-se que no item “Ingredientes” consta que o produto origina-se exclusivamente do creme do leite. Tal afirmação se opõe aos resultados encontrados para o teor de ácido linoleico neste produto.

Os limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ) foram calculados neste trabalho de acordo com Faria *et al*, representados nas equações 12 e 13 a seguir,

$$LOD = \frac{3 \times S_{ruído} \times C_{analito}}{H_{máxima} - H_{mínima}} \quad (12)$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{ruído} \times C_{analito}}{H_{máxima} - H_{mínima}} \quad (13)$$

Onde, $S_{ruído}$ é o desvio padrão do ruído, $C_{analito}$ é a concentração do analito, $H_{máxima}$ é a altura máxima do pico e $H_{mínima}$ é a altura da base do pico.

Foi realizado um teste t pareado, pois trata-se da comparação de um conjunto de dados de amostras diferentes. Os resultados mostram que, dentro de um intervalo de confiança a 95 %, não existe diferença significativa entre o método alternativo por CZE e o método oficial por GC (p-valor > 0,05). A comparação só não foi possível para os AG C18:2 9c, 12c, e 18:3 9c, 12c, 15c, devido ao número de réplicas ser insuficiente para a realização do teste, pois para as réplicas da amostra M a concentração desses AG ficaram abaixo do (LOQ) do método proposto por CZE.

5 CONCLUSÕES

Foi possível concluir que os métodos por GC e por CZE são complementares visto que o GC apresenta um perfil mais amplo dos AG revelando quais são majoritários e, assim, estes podem ser analisados por CZE com maior frequência analítica.

A manteiga de garrafa é um produto que deveria ser derivado exclusivamente do leite, mas foi possível notar que, com a falta de uma legislação específica e de fiscalização dos órgãos responsáveis, vem ocorrendo adulterações deste produto com a adição de óleos vegetais, que tornam o custo da produção de manteiga de garrafa mais rentável. Além disto algumas marcas têm utilizado, possivelmente, óleos vegetais submetidos a longos processos de fritura, que leva a formação de altos teores de AG trans, sendo um fato de grande importância quando se fala em saúde humana.

A metodologia por CZE otimizada sinaliza positivamente para análise simultânea de AG saturados e insaturados em manteiga de garrafa, apresentando como vantagens: preparo menos laborioso da amostra, tempo de análise curto, baixo consumo de solventes, uso de colunas não dedicadas e alta frequência analítica para os AG estudados neste trabalho. Além disso, os resultados estatísticos obtidos não apresentaram diferenças significativas em um intervalo de 95% de confiança quando métodos por CZE e GC foram comparados.

Desta maneira, com este trabalho foi possível propor um método alternativo por CZE para a identificação de adulteração em amostras de manteiga de garrafa.

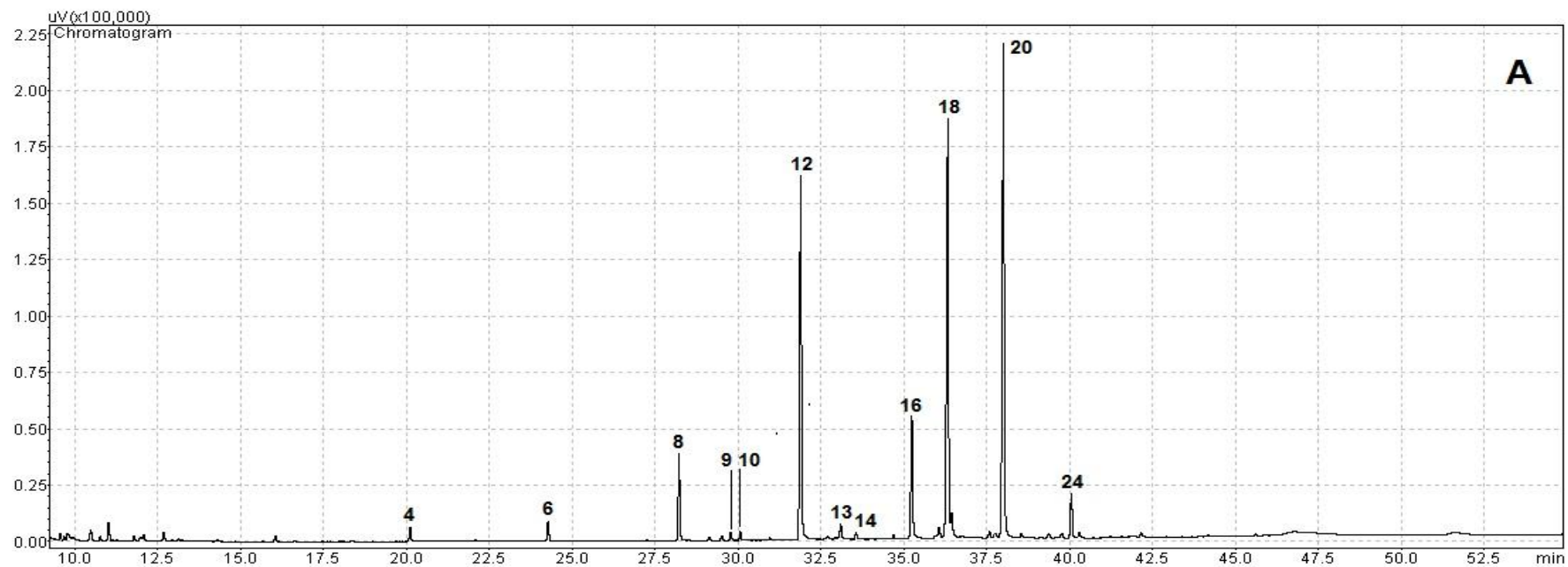
REFERÊNCIAS

- Agilent Technologies (2010). **Separation of Fatty Acid Methyl Esters (FAME) on an Agilent J&W Select CP-Sil 88 for FAME GC Column** <<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/SI-02178.pdf>>
- Ambrósio CMB, Guerra NB, Mancini Filho J (2003). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 23 (3): 314-320
- Ambrósio CMB, Guerra NB, Mancini Filho J (2001). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 21 (3): 351-354
- ANVISA (1999). **Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999**. BRASIL: Diário Oficial da União
- AOCS (1996). **Official Method Ce 1f-96** (Reapproved 1997 and revised 2002). Editor, AOCS Press, Champaign, IL.
- AOCS (1999). **Official method Cd 14d-99**. 5th ed., Editor, American Oil Chemists' Society, Champaign, IL.
- Bailey-Hall E, Nelson EB, Ryan AS (2008). **Lipids**:181-186
- Baker DR (1995). **Capillary Electrophoresis**. New York: Wiley-Interscience.
- Balesteros MR, Faria, AF, Oliveira, MAL (2007). **J. Brazilian Chem. Society**, 18:554-558.
- Barra PMC, Barra MM, Azevedo MS, Fett R, Micke GA, Costa ACO, Oliveira MAL (2012). **Food Control** 23:456-461
- Barra PMC, Oliveira MAL, Nery-Enes B, Cardoso LM, Cesário CC, Moreira AVB, Pinheiro-Sant'Ana HM, Peluzio MCG (2013). **Química Nova** 36:1430-1433
- Barra PMC (2014). **Determinação de ácidos graxos em amostras alimentícias e biológicas utilizando eletroforese capilar de zona**. 134 p. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2014.
- Beerman C, Jelinek J, Reinecker T, Hauenschild A, Boehm G, Klör HU (2003). **Lipids in Health and Disease** 2:1-10
- Bohlin ME, Ohman M, Hamberg M, Blomberg LG (2003). **J Chromatogr. A** 985:471-478.
- BRASIL. **Decreto Nº 2244, de 4 de junho de 1997**. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial.

- Castro PM, Barra MM, Ribeiro MCC, Aued-Pimentel S, Silva SA, Oliveira MAL (2010). **J Agric Food Chem** 58:1403-1409
- Christie WW (1993). **In: Advances in Lipid Methodology – Two** p. 69-111
- Christie WW (2001). **Inform** 12:147-152
- Clemente MG, Abreu LR, Pinto SM, Rezende CPA (2009). **Ciênc. Agrotec.** 33(6):1615-1620
- Costa RG, Queiroga RCRE, Pereira RAG (2009). **R. Bras. Zootec.**
- Danzer K, Currie, LA (1998). **Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry Part 1: Fundamentals and Single Component Calibration Pure Appl. Chem.** 70(4):993-1014.
- Delmonte P, Yurawecz MP, Mossoba MM, Cruz-Hernandez C, Kramer JKG (2004). **Journal of AOAC International** 87:563-568.
- Drange E, Lundanes E (1997). **J Chrom A** 771:301-309
- Faria AF, Souza MVN, Oliveira MAL (2008). **J. Braz. Chem. Soc.** 19(3):389-396
- Gareil P, Collet J (1996). **J Capillary Electrophoresis** 3:77-82
- Golay PA, Giuffrida F, Dionisi F, Destailats F (2009). **J. AOAC Int.** 92(5):1301-1309
- Graziola F, Solis VS, Curi R (2002). **In: Curi et al. Entendendo a Gordura – Os ácidos graxos.** São Paulo: Manole, cap. 2, p. 7-23
- Hara A, Radin, NS (1973). **Analytical Biochemistry** 90:420-426
- Huang Z, Wang B, Crenshaw AA (2006). **Food Chemistry** 98:593-598
- Ichihara K, Waku K, Yamaguchi C, Saito K, Shibahara A, Miyatani S, Yamamoto K (2002). **Lipids** 37:523-526
- Jensen RG (2002). **Journal of Dairy Science** 85(2):295-350
- Lepage G, Roy CC (1984). **J Lipid Res** 25 (12):1391-1396
- Liu X, Cao Y, Chen Y (2005). **J Chromatogr. A** 1095:197–200
- Massart DL *et al* (1997). **Handbook of chemometrics and qualimetrics: part A.** Elsevier
- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2006). **Instrução Normativa nº 68, de 12 dezembro de 2006.** Brasília, BRASIL: República Federativa do Brasil – Imprensa Nacional. [Internet document]
<http://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelink.php?numlink=1-77-23-2006-12-12-68>
- Mossoba MM, Milosevic V, Milosevic M, Kramer JKG, Azizian H (2007). **Analytical and Bioanalytical Chemistry** 389:87-92

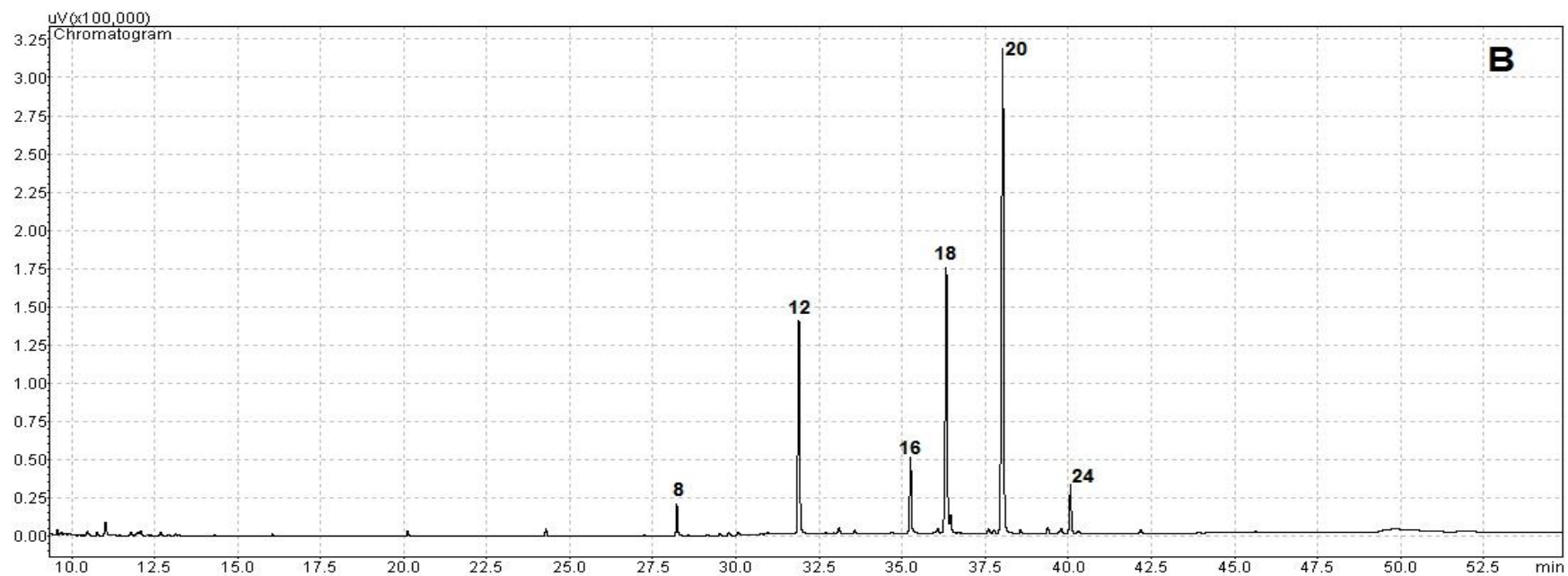
- Oliveira MAL, Micke GA, Bruns R, Tavares MFM (2001). **J Chromtogr. A** 924:533-539
- Oliveira MAL, Solis VS, Gioielli LA, Polakiewicz B, Tavares MFM (2003). **Electrophoresis** 24:1641-1647
- Oliveira MAL, Porto BLS, Faria IDL, Oliveira PL, Barra PMC, Castro RJC, Sato RT (2014). **Molecules** 19:14094-14113
- Pimentel MF, Neto BB (1996). **Química Nova**, 19(3):268-277
- Porto BSL, Souza MVN, Oliveira, MAL (2011). **Analytical Sciences** 27:541-546.
- Ruiz-Rodriguez A, Reglero G, Ibañez E (2010). **J PharmaceutBiomed Anal** 51:305-326
- Sanibal EAA , Mancini Filho J (2004). **Ciênc.Tecnol.Aliment.**, 24(1):027-031
- Shantha NC, Napolitano G (1992). **J Chrom A** 624:37-51
- Skoog DA, Crouch SR, Pasquini C (2009). **Princípios de Química Analítica**, Thomson 6ª Edição
- Sukhija PS, Palmquist DL (1988). **J Agric. Food Chem.** 36:1202-1206
- Surowiec I, Kamla I, Kenndler E (2004). **J Chromatogr. A**, 1024:245–254
- Tavares MF (1996). **Química Nova**, 19(2):173-181
- Vianni R, Braz-Filho R (1996). **Química Nova**, 19(4):400-4

APÊNDICES



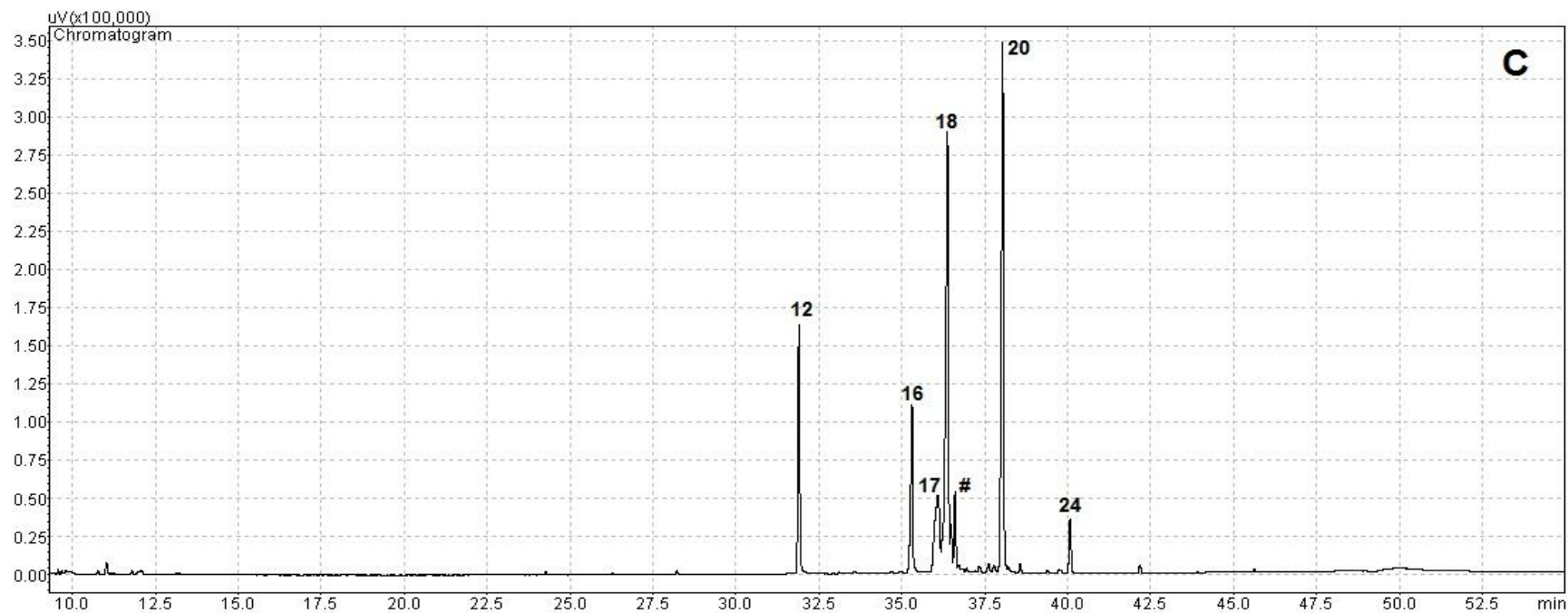
Apêndice 1. Cromatograma – Amostra de manteiga de garrafa da marca A. (4) C10:0, (6) C12:0, (8) C14:0, (9) C14:1, (10) C15:0, (12) C16:0, (13) C16:1, (14) C17:0, (16) C18:0, (18) C18:1 *cis* 9, (20) C18:2 *cis* 9, 12, (24) C18:3 *cis* 9, 12, 15 *alfa*.

Condições de análise: FID em 270°C, temperatura da coluna programada para iniciar em 80°C e aumentar em 4°C a cada minuto até o valor de 220°C, mantendo essa temperatura durante 5 minutos, e em seguida de 220°C aumentando 4°C a cada minuto até o valor de 240°C, mantendo nesse valor durante 10 min, velocidade linear do H₂ em 23.6 cm/s, injeção em modo split na razão de 1:16, coluna CP-Sil 88 for FAME de 100 m de comprimento, 0.25 mm d.i. e 0.2 µm de espessura do filme.



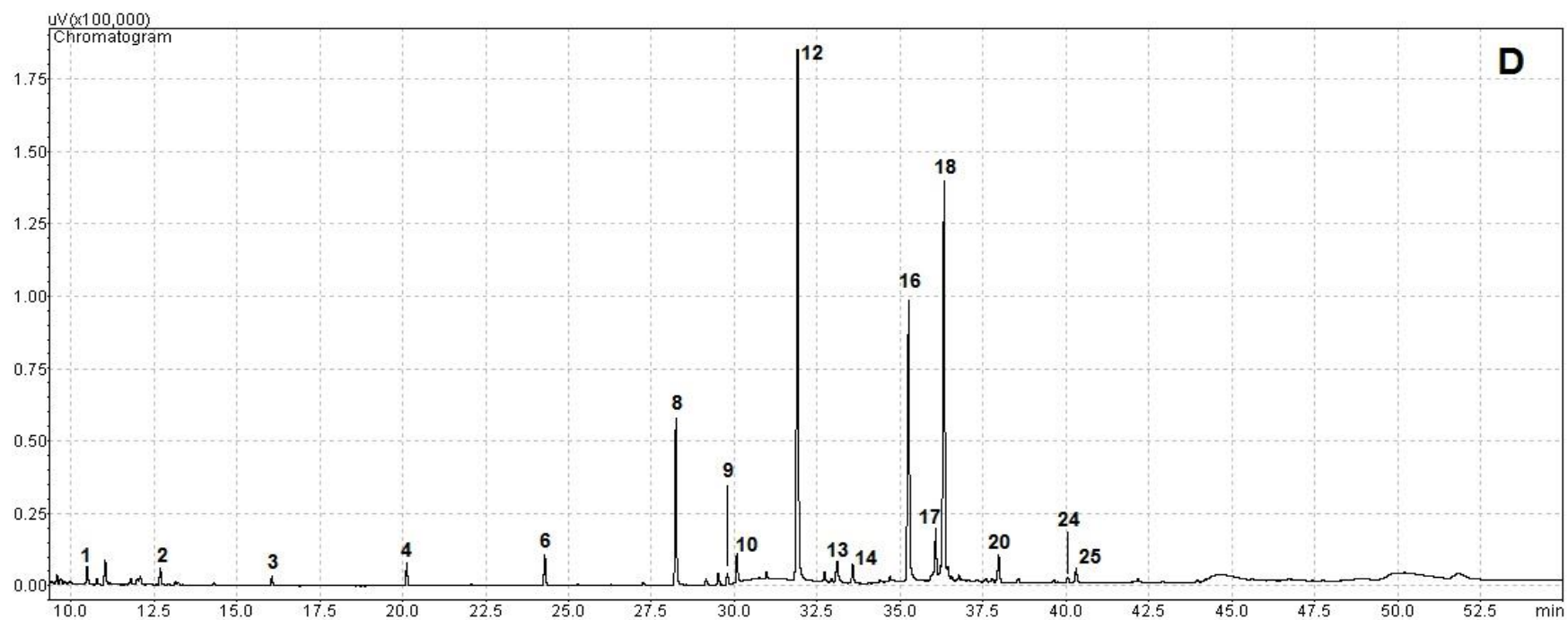
Apêndice 2. Cromatograma – Amostra de manteiga de garrafa da marca B. (8) C14:0, (12) C16:0, (16) C18:0, (18) C18:1 *cis* 9, (20) C18:2 *cis* 9, 12, (24) C18:3 *cis* 9, 12, 15 *alfa*.

Condições de análise: FID em 270°C, temperatura da coluna programada para iniciar em 80°C e aumentar em 4°C a cada minuto até o valor de 220°C, mantendo essa temperatura durante 5 minutos, e em seguida de 220°C aumentando 4°C a cada minuto até o valor de 240°C, mantendo nesse valor durante 10 min, velocidade linear do H₂ em 23.6 cm/s, injeção em modo split na razão de 1:16, coluna CP-Sil 88 for FAME de 100 m de comprimento, 0.25 mm d.i. e 0.2 µm de espessura do filme.



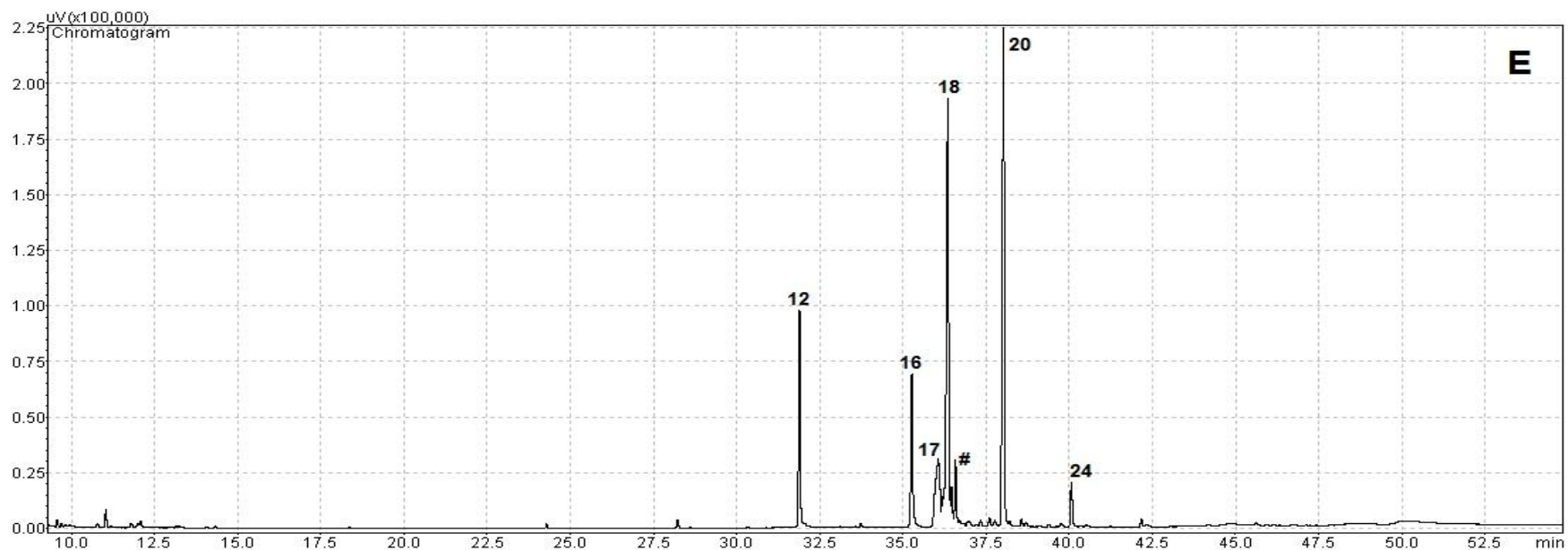
Apêndice 3. Cromatograma – Amostra de manteiga de garrafa da marca C. (12) C16:0, (16) C18:0, (17) C18:1 *trans*, (18) C18:1 *cis* 9, (20) C18:2 *cis* 9, 12, (24) C18:3 *cis* 9, 12, 15 *alfa*, (#) possível isômero de posição do C18:1 *cis* 9.

Condições de análise: FID em 270°C, temperatura da coluna programada para iniciar em 80°C e aumentar em 4°C a cada minuto até o valor de 220°C, mantendo essa temperatura durante 5 minutos, e em seguida de 220°C aumentando 4°C a cada minuto até o valor de 240°C, mantendo nesse valor durante 10 min, velocidade linear do H₂ em 23.6 cm/s, injeção em modo split na razão de 1:16, coluna CP-Sil 88 for FAME de 100 m de comprimento, 0.25 mm d.i. e 0.2 µm de espessura do filme.



Apêndice 4. Cromatograma – Amostra de manteiga de garrafa da marca D. (1) C4:0, (2) C6:0, (3) C8:0, (4) C10:0, (6) C12:0, (8) C14:0, (9) C14:1, (10) C15:0, (12) C16:0, (13) C16:1, (14) C17:0, (16) C18:0, (17) C18:1 *trans*, (18) C18:1 *cis* 9, (20) C18:2 *cis* 9, 12, (24) C18:3 *cis* 9, 12, 15 *alfa*, (25) C21:0.

Condições de análise: FID em 270°C, temperatura da coluna programada para iniciar em 80°C e aumentar em 4°C a cada minuto até o valor de 220°C, mantendo essa temperatura durante 5 minutos, e em seguida de 220°C aumentando 4°C a cada minuto até o valor de 240°C, mantendo nesse valor durante 10 min, velocidade linear do H₂ em 23.6 cm/s, injeção em modo split na razão de 1:16, coluna CP-Sil 88 for FAME de 100 m de comprimento, 0.25 mm d.i. e 0.2 µm de espessura do filme.



Apêndice 5. Cromatograma – Amostra de manteiga de garrafa da marca E. (12) C16:0, (16) C18:0, (17) C18:1 *trans*, (18) C18:1 *cis* 9, (20) C18:2 *cis* 9, 12, (24) C18:3 *cis* 9, 12, 15 *alfa*, (#) possível isômero de posição do C18:1 *cis* 9.

Condições de análise: FID em 270°C, temperatura da coluna programada para iniciar em 80°C e aumentar em 4°C a cada minuto até o valor de 220°C, mantendo essa temperatura durante 5 minutos, e em seguida de 220°C aumentando 4°C a cada minuto até o valor de 240°C, mantendo nesse valor durante 10 min, velocidade linear do H₂ em 23.6 cm/s, injeção em modo split na razão de 1:16, coluna CP-Sil 88 for FAME de 100 m de comprimento, 0.25 mm d.i. e 0.2 µm de espessura do filme.

Pico	AG	G1		
		Tempo R. (min)	Área	% área
1	C4:0	10,42	57150	0,77
2	C6:0	12,63	42309	0,57
3	C8:0	16,02	27262	0,37
4	C10:0	20,12	68598	0,93
	--	22,06	9064	0,12
6	C12:0	24,30	94344	1,28
7	C13:0*	26,34	439966	5,98
	--	27,30	8457	0,11
8	C14:0	28,29	441170	5,99
	--	29,20	17503	0,23
	--	29,57	29896	0,41
9	C14:1	29,82	41706	0,57
10	C15:0	30,13	50361	0,68
	--	31,03	12256	0,17
12	C16:0	32,00	1663161	22,6
	--	32,78	21078	0,29
	--	32,98	9470	0,13
13	C16:1	33,15	78399	1,07
	--	33,31	4542	0,06
14	C17:0	33,63	36334	0,49
	--	34,46	2332	0,03
	--	34,75	13369	0,18
16	C18:0	35,33	603274	8,20
17	C18:1 <i>trans</i>	36,14	128416	1,74
18	C18:1 <i>cis 9</i>	36,42	1629509	22,1
	--	36,83	5555	0,08
	--	36,96	3616	0,05
	--	37,12	3667	0,05
	--	37,36	4067	0,06
	--	37,64	14607	0,20
	--	37,84	13917	0,19
20	C18:2 <i>cis 9, 12</i>	38,07	1518041	20,6
	--	38,64	15265	0,21
	--	39,40	13246	0,18
	--	39,81	24635	0,33
24	C18.3 <i>cis 9, 12, 15</i>	40,08	153653	2,09
25	C21:0	40,35	46264	0,63
	--	42,25	14039	0,19

-- não identificados

*padrão interno

Apêndice 6. Tempos de retenção, área e porcentagem de área para a réplica G1 da amostra da marca G.

Pico	AG	G2		
		Tempo R. (min)	Área	% área
1	C4:0	10,42	56934	0,78
2	C6:0	12,63	41750	0,57
3	C8:0	16,02	25031	0,34
4	C10:0	20,11	66275	0,91
	--	22,06	6289	0,09
6	C12:0	24,30	89865	1,24
7	C13:0*	26,34	421090	5,80
	--	27,30	7472	0,10
8	C14:0	28,28	424061	5,84
	--	29,20	17628	0,24
	--	29,57	27577	0,38
9	C14:1	29,82	41332	0,57
10	C15:0	30,13	46835	0,64
	--	31,03	12125	0,17
12	C16:0	31,99	1629489	22,4
	--	32,78	20500	0,28
	--	32,98	9303	0,13
13	C16:1	33,15	76163	1,05
	--	33,32	4817	0,07
14	C17:0	33,63	34573	0,48
	--	34,46	3109	0,04
	--	34,75	12618	0,17
16	C18:0	35,33	596327	8,21
17	C18:1 <i>trans</i>	36,14	129726	1,78
18	C18:1 <i>cis</i> 9	36,42	1621722	22,3
	--	36,82	10025	0,14
	--	36,96	6705	0,09
	--	37,13	5958	0,08
	--	37,36	2987	0,04
	--	37,63	14704	0,20
	--	37,84	13685	0,19
20	C18:2 <i>cis</i> 9, 12	38,07	1519479	20,9
	--	38,64	16184	0,22
	--	39,40	12326	0,17
	--	39,81	25009	0,34
24	C18.3 <i>cis</i> 9, 12, 15	40,08	155407	2,14
25	C21:0	40,35	44765	0,62
	--	42,25	16033	0,22

-- não identificados

*padrão interno

Apêndice 7. Tempos de retenção, área e porcentagem de área para a réplica G2 da amostra da marca G.

Pico	AG	M1		
		Tempo R. (min)	Área	% área
1	C4:0	10,42	84836	1,14
2	C6:0	12,64	69317	0,94
3	C8:0	16,02	44406	0,60
4	C10:0	20,12	120963	1,63
	--	22,06	13397	0,18
6	C12:0	24,31	166977	2,25
7	C13:0*	26,34	425698	5,74
	--	27,30	6920	0,09
8	C14:0	28,30	738652	9,97
	--	29,21	19303	0,26
	--	29,58	37245	0,50
9	C14:1	29,82	73186	0,99
10	C15:0	30,14	70610	0,95
	--	31,03	16329	0,22
12	C16:0	32,02	2248475	30,3
	--	32,78	26368	0,36
	--	32,99	11570	0,16
13	C16:1	33,16	134772	1,81
14	C17:0	33,64	49104	0,66
	--	34,75	18537	0,25
16	C18:0	35,35	795175	10,7
17	C18:1 <i>trans</i>	36,15	160281	2,16
18	C18:1 <i>cis 9</i>	36,43	1852889	25,0
	--	36,82	10384	0,14
	--	37,36	7536	0,10
	--	37,65	24364	0,33
20	C18:2 <i>cis 9, 12</i>	38,01	100063	1,35
	--	38,64	9463	0,13
	--	39,71	8748	0,12
24	C18.3 <i>cis 9, 12, 15</i>	40,08	16556	0,22
25	C21:0	40,35	50242	0,68

-- não identificados

*padrão interno

Apêndice 8. Tempos de retenção, área e porcentagem de área para a réplica M1 da amostra da marca M.

Pico	AG	M2		
		Tempo R. (min)	Área	% área
1	C4:0	10,42	118161	1,30
2	C6:0	12,64	94855	1,04
3	C8:0	16,03	59710	0,66
4	C10:0	20,12	155519	1,70
	--	22,07	17565	0,19
6	C12:0	24,32	215650	2,37
7	C13:0*	26,35	420758	4,62
	--	27,30	11810	0,13
8	C14:0	28,31	924510	10,1
	--	29,21	27027	0,30
	--	29,58	47107	0,52
9	C14:1	29,83	91486	1,00
10	C15:0	30,14	91951	1,01
	--	31,04	21159	0,23
12	C16:0	32,04	2774466	30,4
	--	32,79	35438	0,39
	--	33,00	15502	0,17
13	C16:1	33,17	166835	1,83
14	C17:0	33,64	60914	0,67
	--	34,76	24397	0,28
16	C18:0	35,36	983476	10,80
17	C18:1 <i>trans</i>	36,17	188530	2,07
18	C18:1 <i>cis 9</i>	36,45	2283706	25,1
	--	36,83	13608	0,15
	--	37,37	8207	0,1
	--	37,66	27151	0,30
20	C18:2 <i>cis 9, 12</i>	38,02	122498	1,34
	--	38,65	12230	0,13
	--	39,71	10457	0,11
24	C18.3 <i>cis 9, 12, 15</i>	40,08	21374	0,23
25	C21:0	40,36	63953	0,70

-- não identificados

*padrão interno

Apêndice 9. Tempos de retenção, área e porcentagem de área para a réplica M2 da amostra da marca M.