

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

Brenda Lee Simas Porto

**Análise do perfil de ácidos graxos ômega em ovos  
naturais e enriquecidos por eletroforese capilar**

Juiz de Fora  
2011



Brenda Lee Simas Porto

## **Análise do perfil de ácidos graxos ômega em ovos naturais e enriquecidos por eletroforese capilar**

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

Orientador: Prof. Dr. Marccone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora  
2011

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu querido, amado e saudoso pai, Ely, que sempre me incentivou, me ajudou e me apoiou em tudo na vida. Meu grande amigo, exemplo de amor pela família.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por sempre iluminar meus caminhos e guiar minha vida.

Agradeço em especial, ao Thiago, meu esposo e meu amor! Por toda a sua paciência, compreensão, dedicação, apoio, carinho e amor. Por estar ao meu lado em todos os momentos bons e ruins, por acreditar em mim e por me fazer sentir única no mundo!

Aos meus pais, Ely e Inês, por todo seu apoio, compreensão e amor.

Ao meu orientador Marcone, que acreditou em mim, no meu potencial e me ajudou a crescer pessoal e profissionalmente.

A minha irmã Cindy, pelo carinho e amizade.

Aos meus avós, tios e primos por toda a torcida, apoio e amizade.

Aos meus sogros por me acolherem com tanto carinho em sua família.

Aos colegas do GQAQ pelo aprendizado, convivência e amizade.

Aos professores do Departamento de Química pelos ensinamentos, em especial ao professor Alexandre Leitão pelo apoio e incentivo na continuação dos estudos.

Aos colegas da Química pelas conversas, trocas de experiências, companheirismo e auxílio em tantos problemas que o trabalho experimental está sujeito. Muito obrigada a todos!

Ao Marcus Vinicius pela colaboração.

À coordenação da pós-graduação da Química.

À Simone, secretária da pós-graduação por estar sempre disposta a ajudar com boa vontade.

Agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Departamento de Química, ambos fizeram grande diferença na minha vida!

Agradeço também a CAPES pela bolsa concedida.

*“Nada existe além  
de átomos e espaço  
vazio, o resto não passa  
de opinião”.*

*Demócrito*

*“Eu prefiro ser essa  
metamorfose ambulante  
do que ter aquela velha  
opinião formada sobre  
tudo...”*

*Raul Seixas*

## RESUMO

Os ovos são considerados essenciais para uma dieta balanceada em função de sua composição protéica de alta qualidade, grande variedade de aminoácidos essenciais, ácidos graxos, vitaminas e minerais. A busca por alimentos de maior qualidade fez com que ovos enriquecidos com ácidos graxos poliinsaturados da família dos ômega 3 e com vitamina E passassem a ser produzidos. No entanto nenhuma diferença visual é encontrada entre ovos enriquecidos e naturais, e uma dúzia de ovos enriquecidos pode custar até 2,0 vezes o preço pago por uma dúzia de ovos naturais.

Por ainda haver espaço considerável para a viabilidade de novas propostas para análise de ácidos graxos poliinsaturados em alimentos é que este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de metodologia por eletroforese capilar capaz de diferenciar ovos enriquecidos e naturais usando o perfil de ácidos graxos  $\omega$  como marcador químico.

No presente trabalho foi desenvolvida metodologia de análise para a diferenciação qualitativa entre os ovos enriquecidos e naturais através do perfil de ácidos graxos ômega por eletroforese capilar com detecção direta por UV em 200 nm. O eletrólito consistiu de 12,0 mmol/L de tampão tetraborato (pH 9,2), 12,0 mmol/L de Brij 35, 17% de acetonitrila e 33% de metanol. O perfil de ácidos graxos ômega 3 foram analisados em amostras de ovos por eletroforese capilar e confirmado por espectrometria de massas com quadrupolo simples e ionização por *electrospray*, após preparo das amostras pelo método de Folch.

Os resultados mostraram que o perfil de ácidos graxos  $\omega$  analisados podem diferenciar ovos naturais de ovos enriquecidos em 10 minutos de corrida. O método desenvolvido apresenta como vantagens: curto tempo de análise, baixo custo, ausência de passos de derivatização no preparo das amostras e fácil interpretação de dados.

Palavras-chave: ômega-3, ovos, eletroforese capilar, ácidos graxos.

## ABSTRACT

Eggs are considered essential feed for a balanced diet due to their high protein composition associated with a wide variety of essential amino acids, fatty acids, vitamins and minerals. In order to achieve a healthier diet, modified eggs have been produced by addition of omega 3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E through hens' diet changing. However no visual difference is found between enriched and natural chicken eggs, and a dozen enriched eggs can cost up to 2.0 times the price paid for a dozen natural eggs.

By still having a considerable room for the viability of new proposals for analysis of polyunsaturated fatty acids in foods is that this work has as the main objective the development of a methodology by capillary electrophoresis able to differentiate enriched and natural eggs using the  $\omega$  fatty acid profile as a chemical marker.

In the present work it was developed a methodology for the analysis of qualitative differentiation between enriched and natural eggs through omega 3 fatty acid profiles by capillary electrophoresis under direct UV detection at 200 nm. The electrolyte background consisted of 12.0 mmol/L tetraborate buffer (pH 9.2) mixed with 12.0 mmol/L Brij 35, 17% acetonitrile and 33% methanol. Omega 3 fatty acid profile in egg samples were analyzed by capillary electrophoresis system and confirmed by single-quadrupole mass spectrometry with an electrospray ionization after the preparation sample of the sample by the Folch method.

The results showed that  $\omega$  fatty acid profiles analyzed can differentiate natural eggs from the and enriched eggs with time of run 10 minutes. The developed method the present as advantages short analysis time, low cost, absence of derivatization steps for sample preparation and easy data interpretation.

Key-words: omega 3, eggs, capillary electrophoresis, fatty acids.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1:</b> Exemplo de AG saturado e insaturado <i>cis - trans</i> . .....	18
<b>Figura 2.2:</b> Estrutura esquemática de isômeros <i>cis - trans</i> . .....	19
<b>Figura 2.3:</b> Abreviações para o ácido linolênico. ....	20
<b>Figura 2.4 :</b> Esquema para hidrólise básica dos glicerídeos. ....	24
<b>Figura 3.1 :</b> Esquema básico da Eletroforese Capilar onde “E” representa o eletrodo. O diâmetro do capilar foi ampliado desproporcionalmente para facilitar sua visualização.....	27
<b>Figura 3.2 :</b> Representação esquemática para a superfície interna de um capilar de sílica fundida .....	28
<b>Figura 3.3 :</b> Representação da migração de moléculas neutras e íons de diferentes cargas e tamanhos no interior do capilar. ....	29
<b>Figura 3.4 :</b> Esquema do mecanismo de separação de AG poliinsaturados por ECZ. .....	32
<b>Figura 3.5 :</b> Estrutura espacial para AG polinsaturados. ....	33
<b>Figura 4.1 :</b> Componentes de um espectrômetro de massas com infusão direta. ....	34
<b>Figura 4.2 :</b> Esquema para IES – a) capilar, b) contra-eletrodo, c) cone de amostragem. ....	36
<b>Figura 4.3 :</b> Analisador de massa do tipo quadrupolo. ....	37
<b>Figura 8.1 :</b> Esquema para o preparo da amostra, extração da fase lipídica e saponificação do triacilglicerol. A – Primeiro teste, B – Procedimento otimizado. .....	48



<b>Figura 9.1</b> : Teste com eletrólito de TAVARES, 2003. 1 - ácido oleico, 2 – ácido docosaheptaenóico, 3 - ácido linoleico, 4 - ácido linolênico e eicosapentaenóico coeluídos.....	51
<b>Figura 9.2</b> : Eletroferogramas representativos do planejamento fatorial fracionário para padrões de AG a 0,1mmol/L, 1 – AOL, 2 – ADH, 3 – ALI, 4 – ALN e 5 – AEP. Condições da análise: injeção 5,0s a 12,5 mbar, detecção direta em 200nm. ....	53
<b>Figura 9.3</b> : Eletroferogramas de padrões de ácidos graxos, 1 – AOL 0,2mmol/L, 2 – ADH 0,05mmol/L, 3 – ALI 0,1mmol/L, 4 – ALN 0,05 mmol/L e 5 – AEP 0,01mmol/L. Condições da análise: capilar de 50µm de diâmetro interno, 360µm de diâmetro externo, 48,5cm de comprimento total e 40,0cm de comprimento efetivo, injeção 7.5s a 12,5mbar, detecção direta em 200nm, voltagem 27KV, temperatura 27°C, 12,0mmol/L de Brij, 12,0mmol/L de TBS, 33% de MeOH e 17% de ACN. ....	56
<b>Figura 9.4</b> : Esquema da extração segundo o método de Folch. ....	58
<b>Figura 9.5</b> : Eletroferogramas para A) amostra de ovo enriquecido com AG ω-3 e B) amostra de ovo vermelho natural. ....	58
<b>Figura 9.6</b> : Eletroferogramas para A) amostra de ovo de codorna, B) amostra de ovo caipira e C) amostra de ovo branco.....	59
<b>Figura 9.7</b> : Amostras analisadas: A) ovo vermelho, B) ovo branco, C) ovo de codorna, D) ovo caipira e E) ovo enriquecido com AG ω-3.....	60
<b>Figura 9.8</b> : Espectro de massas para a amostra de ovo enriquecido. (ε) ALN, (β) AOL, (θ) AEP, (α) ALI, (σ) ADH.....	61
<b>Figura 9.9</b> : Composição nutricional dos ovos analisados, declarada pelo produtor no rótulo da embalagem.....	67
<b>Figura 9.10</b> : Eletroferograma da amostra de ovo enriquecido, 1 – PI, 2 – AOL, 3 – ADH, 4 – ALI e 5 – LNA. Condições da análise: capilar de 75µm de diâmetro interno, 360µm de diâmetro externo, 48,5cm de comprimento total e 40,0cm de	

comprimento efetivo, injeção 5,0s a 12,5mbar, detecção direta em 200nm, voltagem 27KV, temperatura 27°C, 12,0mmol/L de Brij, 12,0mmol/L de TBS, 33% de MeOH e 17% de ACN.....68

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 5.1</b> – Matriz de contrastes de um planejamento $2^3$ com triplicata no ponto central. ....	39
<b>Tabela 9.1</b> – Estudo exploratório do eletrólito e das condições experimentais de análise.....	54
<b>Tabela 9.2</b> – Avaliação do percentual de solvente orgânico no eletrólito. ....	56
<b>Tabela 9.3</b> – Níveis de concentração dos AG nas curvas de calibração. ....	63
<b>Tabela 9.4</b> – Valores usados na implementação do modelo de previsão.....	63
<b>Tabela 9.5</b> – Resultados estatísticos para os modelos de previsão. ....	64
<b>Tabela 9.6</b> – Estudo sobre a extração da fase lipídica da amostra.....	66
<b>Tabela 9.7</b> – Resultados da quantificação dos AG na amostra de ovo enriquecido.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAR – ácido araquidônico

ACN - acetonitrila

ADH – ácido docosahexaenóico

AEP – ácido eicosapentaenóico

AG – ácido graxo

AGE – ácido graxo essencial

AGL – ácido graxo livre

ALI – ácido linoleico

ALN – ácido linolênico

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOCS - *American Oil Chemist's Society*

AOL – ácido oleico

Brij 35 – éter lauril polioxietileno

CCE – comprimento de cadeia equivalente

CG – cromatografia a gás

CLAE – cromatografia a líquido de alta eficiência

DAD – *Diode Array* (arranjo de diodos)

EC – eletroforese capilar

ECZ – eletroforese capilar de zona

EM – espectrometria de massas

FEO – fluxo eletrosmótico

IES – ionização por “*electrospray*”

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

m/z – massa/carga

MeOH – metanol

$\mu_{Ap}$  – mobilidade aparente

$\mu_{Ef}$  – mobilidade eletroforética

$\mu_{EO}$  – mobilidade eletrosmótica

$\omega$  – ômega

p.f. – ponto de fusão

PI – padrão interno

TBS – tetraborato de sódio

UV – ultra violeta

$v_{Ap}$  – velocidade aparente

$v_{Ef}$  – velocidade eletroforética

$v_{EO}$  – velocidade eletrosmótica

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 – OS ÁCIDOS GRAXOS .....</b>	<b>17</b>
2.1 – ÓLEOS E GORDURAS .....	17
2.2 – DEFINIÇÃO DE ÁCIDO GRAXO .....	17
2.3 – CLASSIFICAÇÃO .....	17
2.4 – A ESTRUTURA QUÍMICA .....	18
2.5 – NOMENCLATURA .....	19
2.6 – A FAMÍLIA $\omega$ .....	20
2.7 – MÉTODOS DE ANÁLISE .....	21
2.8 – TRATAMENTO DA AMOSTRA .....	23
<b>3 – ELETROFORESE CAPILAR .....</b>	<b>25</b>
3.1 – DEFINIÇÃO .....	25
3.2 – MODOS DE ELETROFORESES .....	25
3.3 – ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA (ECZ) .....	26
3.4 – ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS POR ECZ .....	31
<b>4 – ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM) .....</b>	<b>34</b>
4.1 – INTRODUÇÃO DA AMOSTRA E IONIZAÇÃO POR <i>ELECTROSPRAY</i> (IES) .....	34
4.2 – ANALISADORES DE MASSAS DO TIPO QUADRUPOLO .....	36
<b>5 – PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS .....</b>	<b>38</b>
<b>6 – VALIDAÇÃO .....</b>	<b>41</b>
6.1 – LINEARIDADE .....	42
6.2 – REPETITIVIDADE .....	42
6.3 – LIMITE DE DETECÇÃO .....	43

6.4 – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.....	43
<b>7 – OBJETIVOS.....</b>	<b>45</b>
7.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	45
<b>8 – MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>46</b>
8.1 – REAGENTES E SOLUÇÕES .....	46
8.2 – INSTRUMENTAÇÃO .....	46
a) Eletroforese Capilar .....	46
b) Espectrômetro de massas .....	47
8.3 – PREPARO DAS AMOSTRAS.....	48
a) Eletroforese Capilar .....	48
b) Espectrômetro de massas .....	49
<b>9 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>10 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>70</b>
<b>11 – PERSPECTIVAS.....</b>	<b>71</b>
<b>12 – REFERÊNCIAS.....</b>	<b>72</b>
<b>APÊNDICE – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ANALYTICAL SCIENCES.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO – TABELA F .....</b>	<b>86</b>

## 1 – INTRODUÇÃO

Existe ainda hoje um grande tabu com relação à inclusão de ovos numa alimentação considerada mais saudável. Seu consumo diminuiu em muitos países desenvolvidos nas últimas quatro décadas devido a pesquisas com conclusões equivocadas feitas sobre ingestão de gordura saturada e do colesterol (MCNAMARA, 2000). Entretanto, acredita-se hoje que não existe relação entre o colesterol consumido via dieta e a boa saúde, ou seja, não há relação direta entre os níveis plasmáticos de lipídeos e o consumo de ovos (HARMAN *et al*, 2008; HU *et al*, 1999).

Atualmente os ovos são considerados essenciais para uma dieta balanceada em função de sua composição protéica de alta qualidade, além de conter uma grande variedade de aminoácidos essenciais, ácidos graxos (AG), vitaminas e minerais. A ingestão de ovos deve ser estimulada, pois ele pode ajudar no controle do peso, na manutenção da força muscular e redução da perda de massa muscular, na saúde da visão e numa gestação saudável por ser uma grande fonte de colina, que também é muito importante para a função cerebral em adultos (HU *et al*, 1999; MAJUMBER e WU, 2009; SHIMIZU *et al*, 2001).

A busca por alimentos de maior qualidade fez com que ovos enriquecidos passassem a ser produzidos. A dieta das poedeiras foi alterada para que aos ovos fossem incorporados AG poliinsaturados e também vitamina E. A ração diferenciada consiste de 560Kg de milho, 277Kg de farelo de soja, 53Kg de farinha de carne, 83 Kg de calcário, 3 Kg de sal, 20 Kg de óleo de linhaça e 4 Kg de um complexo vitamínico (SOUZA *et al*, 2008; TESEDO *et al*, 2006; U.S. Patent, 1999).

O consumo de ácidos graxos polinsaturados tem sido amplamente estudado e discutido, e cada vez mais existem alimentos com adição deste tipo de gordura (margarina, maionese, biscoito, leite em pó). No caso dos ovos, o valor agregado aos que são enriquecidos com AG polinsaturados chega a ser o dobro dos ovos comuns, e visualmente não é possível diferenciá-los. Sendo assim, este trabalho busca uma metodologia de análise que diferencie ovos comuns de ovos enriquecidos, que possa ser utilizada no controle da qualidade dos produtos acabados.



## 2 – OS ÁCIDOS GRAXOS

### 2.1 – ÓLEOS E GORDURAS

Os óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água e podem ser de origem animal, vegetal ou microbiana, formadas predominantemente pelo produto da condensação entre glicerol e ácidos graxos, chamados triacilglicerídeos. A diferença entre óleos e gorduras está em seu aspecto físico; as gorduras apresentam aspecto sólido na temperatura ambiente (p.f. > 20 °C, com predominância de ácidos graxos saturados ligados ao glicerol), enquanto que os óleos, por haver predominância de ácidos graxos mono e poliinsaturados ligados ao glicerol, são líquidos à temperatura ambiente. (MORETTO e FETT, 1989).

### 2.2 – DEFINIÇÃO DE ÁCIDO GRAXO

Os ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos, geralmente monocarboxílicos, alifáticos, não ramificados, saturados ou insaturados, apresentando, na maioria das vezes, cadeia hidrocarbonada longa com número par de átomos de carbono (MORETTO e FEET, 1989). Os AG incomuns apresentam número ímpar de átomos de carbono, ou ramificações, ou ainda, sustentam grupos funcionais distintos (-OH, -CO, etc). O grupo carboxila constitui a região polar dos AG, enquanto que o restante da cadeia é apolar (CURI *et al*, 2002).

### 2.3 – CLASSIFICAÇÃO

O tamanho da cadeia hidrocarbônica determina a classificação dos AG em (CURI *et al*, 2002):

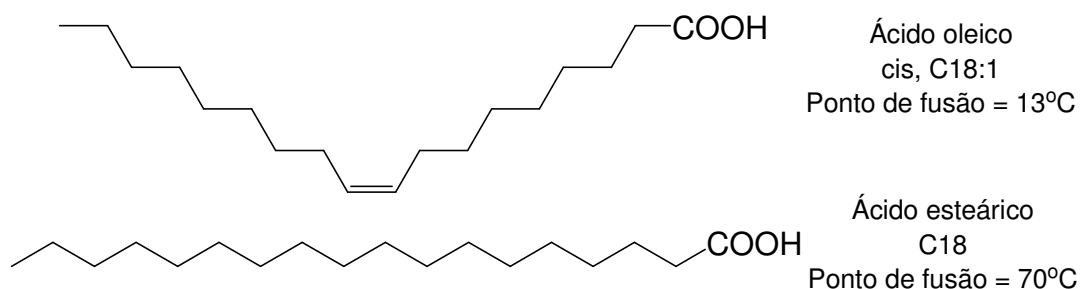
- Cadeia curta: de dois a quatro átomos de carbono
- Cadeia média: de seis a dez átomos de carbono
- Cadeia longa: acima de doze átomos de carbono

A presença ou não de insaturações na cadeia hidrocarbônica classifica-os como:

- Saturados: que não possuem insaturações na molécula
- Insaturados: que possuem uma (monoinsaturados) ou mais (poliinsaturados) insaturações

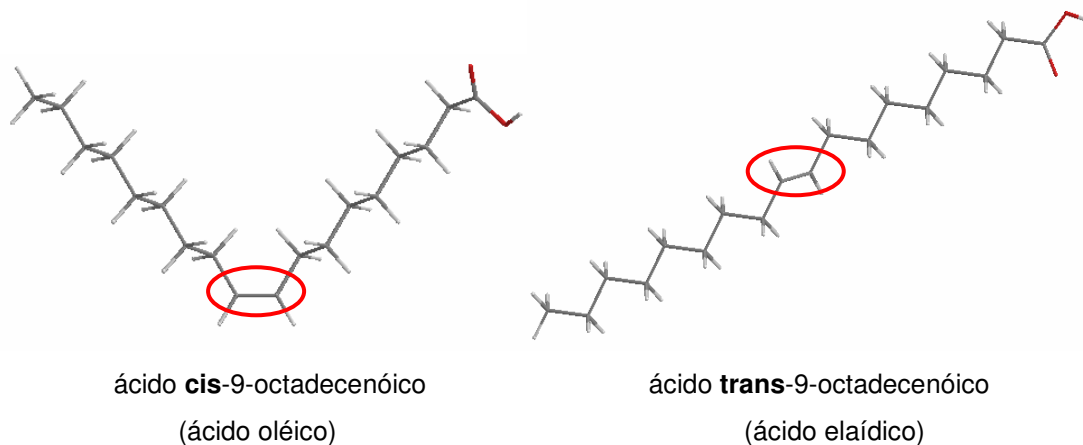
## 2.4 – A ESTRUTURA QUÍMICA

A cadeia hidrocarbônica de um AG saturado existe, geralmente, sob a forma estendida, uma vez que esta conformação linear, flexível é o estado de menor energia, ou seja, a cadeia estando estendida minimiza as repulsões entre os grupos metila vizinhos (SOLMONS e FRYHLE, 2006). Tal conformação linear permite um melhor empacotamento do mesmo, fazendo com que suas moléculas fiquem mais próximas, aumentando assim a interação entre as espécies. Em contraste, os AG insaturados contêm dobramentos rígidos em suas cadeias carbônicas, pois as duplas ligações não giram e uma angulação de  $30^\circ$  é produzida para cada dupla presente na conformação *cis*. Como conseqüência, os AG saturados possuem pontos de fusão maior que AG insaturados, como mostra a figura 1.



**Figura 2.1:** Exemplo de AG saturado e insaturado *cis* - *trans*.

A presença de insaturações restringe a rotação da cadeia hidrocarbônica, fazendo com que ocorra isomeria em torno da dupla ligação. O isômero chamado *cis* tem os dois hidrogênios ligados aos átomos da dupla ligação do mesmo lado de um plano imaginário traçado paralelamente à insaturação, enquanto que no isômero *trans* esses hidrogênios se encontram em lados opostos, figura 2.2.



**Figura 2.2:** Estrutura esquemática de isômeros *cis* - *trans*.

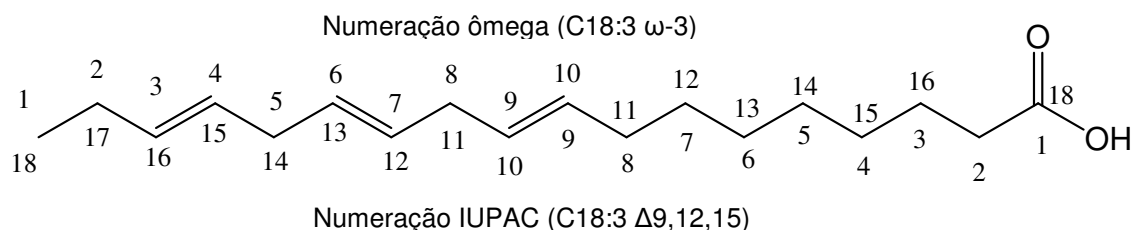
## 2.5 – NOMENCLATURA

Os ácidos graxos podem ser identificados por nomes comuns, que geralmente são derivados da fonte de origem do ácido, ou por nomes químicos que se baseiam em regras estabelecidas internacionalmente pela União Internacional de Química Pura e Aplicada, do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC* (IUPAC, 1976).

O nome sistemático completo de um AG sempre será iniciado pela palavra ácido, seguido por um prefixo referente ao número de carbonos da maior cadeia hidrocarbônica que contenha a carboxila e por fim, o sufixo *óico*, como ocorre com todos os ácidos carboxílicos. Por exemplo, para o ácido oléico, que possui 18 carbonos, seu nome sistemático seria: ácido - cis 9 - octadecanóico. Os átomos de carbono dos ácidos graxos são enumerados a partir do grupo carboxila, e a nomenclatura sistemática pode ser abreviada. Sendo assim poder-se-ia referir ao ácido oléico como 18-1  $\Delta$ 9, onde o 18 indica o número de carbonos, o 1 o número de insaturações e o  $\Delta$ 9 a localização da insaturação (CURI *et al*, 2002).

Existe ainda uma outra forma de se referir aos AG insaturados, conhecida como “família dos ácidos ômega”. Neste caso, a enumeração da cadeia hidrocarbônica começa a partir do primeiro carbono da extremidade oposta à carboxila (ao contrário das regras da IUPAC). Por exemplo, o ácido linolênico pode ser abreviado como: C18:3  $\Delta$ 9,12,15 ou como C18:3  $\omega$ -3, especificando apenas a

dupla ligação localizada no carbono de número 3 contado a partir do último carbono da cadeia (HIRAYAMA, 2006; SOLOMONS e FRYHLE, 2006), como mostra a figura 3:



**Figura 2.3:** Abreviações para o ácido linolênico.

Ao enumerar os carbonos a partir do carbono mais distante do grupo carboxílico, é possível agrupar os diferentes AG em “famílias” de acordo com a posição que estes apresentam a primeira dupla ligação em suas estruturas (CURI *et al*, 2002).

Os principais representantes dessa classe são o ácido oléico (ω-9) (AOL), o ácido linoleico (ω-6) (ALI) e o ácido linolênico (ω-3) (ALN). As fontes predominantes de AG ω-3 são óleos vegetais e óleos de peixes; o AG mais importante da família dos ω-6 é o ALI que é encontrado em óleos vegetais como de soja, de girassol e de milho (BENATTI *et al*, 2004).

## 2.6 – A FAMÍLIA ω

A importância dos lipídios na nutrição e desenvolvimento humano é reconhecida há muitas décadas. Os AG são constituintes estruturais das membranas celulares, cumprem funções energéticas e de reservas metabólicas, além de formarem hormônios e sais biliares (VALENZUELA e NIETO, 2003). Dentro da diversidade dos AG, existem aqueles que o organismo humano tem capacidade de síntese, porém outros não. Esses AG cuja biossíntese é inadequada devido à carência de enzimas dessaturases, que são capazes de inserir ligação dupla entre os carbonos 3-4 e 6-7, são denominados ácidos graxos essenciais AGE. São eles: o ALN (ω-3) e o ALI (ω-6). O ALN dá origem ao ácido eicosapentaenóico (AEP), que pertence a classe dos ômega 3, enquanto que o ALI, depois da biossíntese gera o

ácido araquidônico (AAR). Para suprir as necessidades fisiológicas, os mesmos devem estar em quantidades suficientes na alimentação (HIRAYAMA, 2006).

As famílias de ácidos graxos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 competem entre si pela enzima dessaturase. Logo, devido a essa natureza competitiva, cada ácido graxo pode interferir no metabolismo do outro, apresentando implicações nutricionais. Um excesso de  $\omega$ -6 irá reduzir o metabolismo de  $\omega$ -3, levando possivelmente a um déficit de seus metabólitos, incluindo o ácido docosahexaenóico (ADH), comprometendo o sistema imunológico.

Entretanto, o aumento exagerado de  $\omega$ -3 reduz a relação desses ácidos graxos ( $\omega$ -6: $\omega$ -3) a níveis baixos, de 3:1, propiciando assim alterações indesejáveis na coagulação sanguínea. Devido ao fato dos ácidos graxos essenciais necessitarem da mesma enzima para serem convertidos, ressalta-se a importante manutenção da proporção 5:1 entre  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 na dieta oral e enteral, pois esta proporção pode influenciar na formação de neurotransmissores e prostaglandinas, fatores que são vitais para manter a função cerebral normal (GUNSTONE, 2004; HIRAYAMA, 2006).

Desde 1980 diversos estudos têm investigado a importância dos AG polinsaturados na alimentação humana, pois eles auxiliam no desenvolvimento cerebral e visual do bebê antes e após o nascimento, contribuem para a diminuição dos níveis de triacilglicerídeos e colesterol total no sangue, prevenindo assim enfermidades cardiovasculares, aumentam a fluidez do sangue e também são utilizados como mediadores de alergias em processos inflamatórios, em tratamentos contra epilepsia, diminuem a pressão sanguínea, reduzem a agregação plaquetária e o risco de câncer de cólon. (VALENZUELA e NIETO, 2001 e 2003; GONZÁLES, 2002; ZEMDEGS, 2009; KRIS-ETHERTON, 2002).

Diante de tantas promessas, a indústria da alimentação resolveu adicionar  $\omega$ -3 em vários produtos alimentícios comumente consumidos pela população.

## 2.7 – MÉTODOS DE ANÁLISE

Tradicionalmente, os AG são analisados por Cromatografia a Gás (CG) (BRONDZ, 2002; SAMMAN *et al*, 2009; COLLINS *et al*, 1997; MAZZALLI e

BRGAGNOLO, 2007) e por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE) (BROWNE e ARMSTRONG, 2000; GREEN e YAVIN, 1993). Em princípio, os AG podem ser separados por CLAE em fase reversa utilizando, por exemplo, uma coluna de octadecilsilano, mas o longo tempo de análise e a baixa absorvidade molar dos solutos, no caso de detector de ultravioleta, torna difícil a quantificação direta, pois há a necessidade de derivatização visando a formação de adutos ou derivativos que apresentem alta absorvidade. Esta etapa pode gerar reações incompletas ou produtos secundários, que representa um dos agravantes no uso de CLAE (OLIVEIRA *et al*, 2003 (a)).

Entretanto, a principal técnica utilizada para determinação do perfil de AG em lipídeos é a CG (BRONDZ, 2002; SAMMAN *et al*, 2009; COLLINS *et al*, 1997; MAZZALLI e BRAGAGNOLO, 2007). Geralmente a metodologia permite a separação dos AG de cadeia curta sem a necessidade de passos de derivatização, uma vez que estes ácidos apresentam alta volatilidade. Entretanto, os de cadeia longa, por apresentarem baixa volatilidade e estabilidade térmica, de maneira geral, requerem etapa de derivatização, na qual os grupos carboxílicos são convertidos em grupos mais voláteis como trimetilsilil-ésteres ou metil-ésteres (NAGLI e SMIDOVICNIK, 1997; DELMONTE e RADER, 2007).

Desde 1990 a eletroforese capilar (EC) tem ganhado espaço na comunidade científica como uma técnica de separação alternativa em meio líquido para a análise de AG em óleos e gorduras. As grandes vantagens desta técnica frente aos métodos clássicos são: curto tempo de análise e ausência de passos de derivatização durante o processo de preparo das amostras (ERIM *et al*, 1995; OLIVEIRA *et al*, 2003 (b); BANNORE *et al*, 2008; OTIENO e MWONGEL, 2008). Os sistemas de eletrólitos mais comuns são compostos por tampões, cromóforos como p-anisato (ROLDAN-ASSAD e GAREIL, 1995) ou dodecilbenzenosulfonato de sódio (OLIVEIRA *et al*, 2001; SUROWIEC *et al*, 2004, LIU *et al*, 2005), além de outros aditivos como metanol (ROLDAN-ASSAD e GAREIL, 1995), etanol (BOHLIN *et al*, 2003), acetonitrila (LIU *et al*, 2005), 1-octanol (SUROWIEC *et al*, 2004, LIU *et al*, 2005), dodecilsulfato de sódio – SDS (BIER, 1959), polioxietileno 23 lauril éter - Brij 35® (OLIVEIRA, 2001, LIU *et al*, 2005) e ciclodextrinas (BIER, 1959, BOHLIN *et al*, 2003).

## 2.8 – TRATAMENTO DA AMOSTRA

A determinação de AG em alimentos engloba diversas etapas: extração da fase lipídica em condições amenas, reação de saponificação para se obter ácidos graxos livres (AGL) e, no caso da metodologia oficial de análise, derivatização dos AGL para poderem ser analisados por cromatografia a gás (CURI *et al*, 2002).

O método para extração de lipídeos totais mais comumente usado baseia-se nas diferenças de solubilidade dos lipídeos nos solventes. A escolha do solvente mais apropriado para a extração de lipídeos é um dos passos mais críticos na determinação de lipídeos em matrizes alimentares. Normalmente os solventes utilizados são: éter etílico, éter de petróleo, clorofórmio/metanol, tetracloretileno, hexano e isopropanol. Todos esses solventes extraem triacilglicerol, esteróis e AGL. Solventes mais polares como clorofórmio/metanol extraem lipídeos polares incluindo fosfolipídeos, esteróis, terpenos, ceras, hidrocarbonetos e outros materiais não lipídicos (KUS *et al*, 2009).

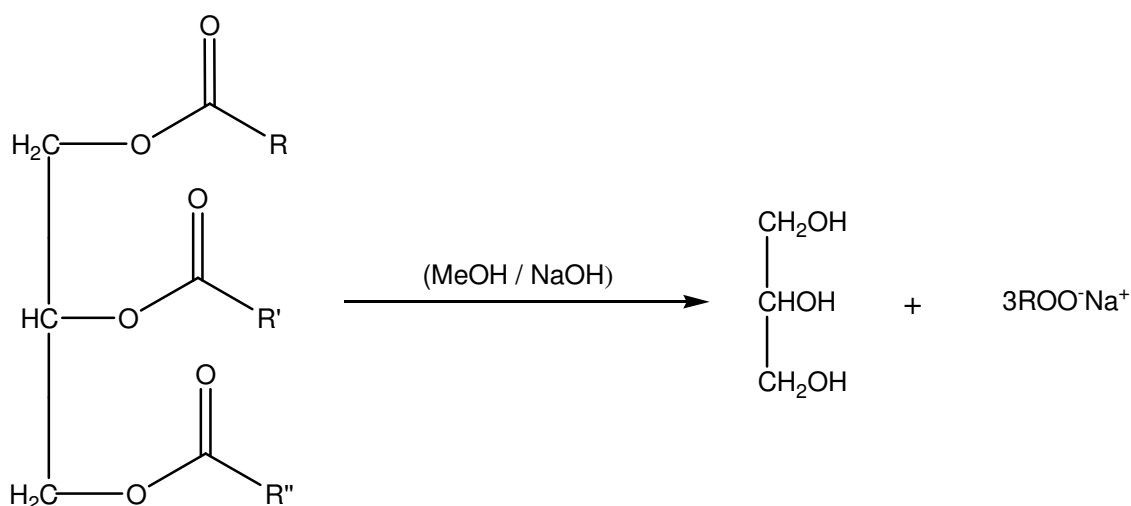
Há um consenso que a mistura clorofórmio-metanol seja utilizada para a caracterização da fração lipídica, pois esteróis e colesterol não são destruídos durante a extração. Esse método é aprovado pela *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC) para a análise de lipídios em alimentos que não têm metodologia específica (IVERSON *et al*, 2001; CARPENTER *et al*, 1993). Os métodos mais comumente usados com esses solventes são Folch (FOLCH *et al*, 1957) e Bligh e Dyer, (BLIGH e DYER, 1959).

Segundo a literatura (MAZZALI e BRAGAGNOLO, 2007; IVERSON *et al*, 2001), o método de extração de lipídeos em amostras biológicas desenvolvido por Bligh & Dyer (BLIGH e DYER, 1959) não apresenta diferenças significativas junto ao método desenvolvido por Folch *et al* (FOLCH *et al*, 1957) quando a composição lipídica da amostra não ultrapassa o valor de 3,0%. Para quantidades lipídicas acima deste valor, o método de extração desenvolvido por Folch é o mais indicado.

Considerando que a gema do ovo de galinha tem cerca de 30% de gordura (MILINSK *et al*, 2003), optou-se então, por trabalhar com a extração desenvolvida por Folch *et al* (FOLCH *et al*, 1957).

Depois de extrair a fase lipídica da amostra, é necessário que esta passe por um processo de hidrólise alcalina, quando são formados sais dos AG que estavam

anteriormente ligados ao glicerol. Tal reação, como exemplifica a figura 2.4, consiste em uma reação de saponificação, na qual ao extrato são adicionados alguns mililitros de solução alcoólica de uma base (normalmente solução de NaOH preparada em MeOH), em um banho térmico com temperatura controlada de 75-80°C sob refluxo contínuo em haste de vidro, resultando na formação de glicerol e sais de ácidos graxos (MORRISON e BOYD, 1981).



**Figura 2.4** : Esquema para hidrólise básica dos glicerídeos.

Para que os ácidos graxos poliinsaturados possam ser analisados por CG, seria ainda necessária uma etapa de derivatização, na qual os AG seriam transformados em ésteres metílicos, que são mais voláteis que seus compostos de origem, característica fundamental para análise por CG. Contudo, como a técnica utilizada neste trabalho foi a EC, o tratamento da amostra se encerra quando o resíduo da hidrólise básica é transferido para um balão volumétrico e adiciona-se solvente suficiente para completar o volume do balão.



## 3 – ELETROFORESE CAPILAR

### 3.1 – DEFINIÇÃO

A Eletroforese Capilar (EC) é definida como uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos que podem ser neutros, iônicos ou ionizáveis, através de uma solução de eletrólito contida no interior de um tubo capilar de sílica fundida, mediante a aplicação de um campo elétrico da ordem de KVolts/m (BAKER, 1995, TAVARES, 1996, SKOOG *et al*, 2006).

Historicamente, foi desenvolvida por Arne Tiselius, no início da década de 1930, para o estudo de proteínas no soro sanguíneo. Por este trabalho, Tiselius recebeu o Prêmio Nobel de Química de 1948 (TAVARES, 1996, SKOOG *et al*, 2006).

Por ser mais econômica no sentido de consumo de reagentes e solventes orgânicos, conseqüentemente a EC pode ser considerada mais ecologicamente correta, e tem gradualmente se estabelecido como técnica suporte para a Cromatografia Líquida de Alta eficiência (ALTRIA, 1999; VEUTHEY, 2005). A importância da EC tornou-se evidente com o projeto genoma humano e o sequenciamento de proteínas. A partir de então, tem sido utilizada em análises de rotinas farmacêuticas, forenses, clínicas e ambientais (ALTRIA e ELDER, 2004).

### 3.2 – MODOS DE ELETROFORESE

Esta técnica de separação é muito versátil, existindo assim diversos modos de EC, para diferentes aplicações, em matrizes e analitos de interesse distintos. Pode-se destacar: EC de afinidade, EC de peneiramento, EC em gel, EC em meio não aquoso, eletrocromatografia capilar, isotacoforese capilar e EC de zona (TAVARES, 1996).

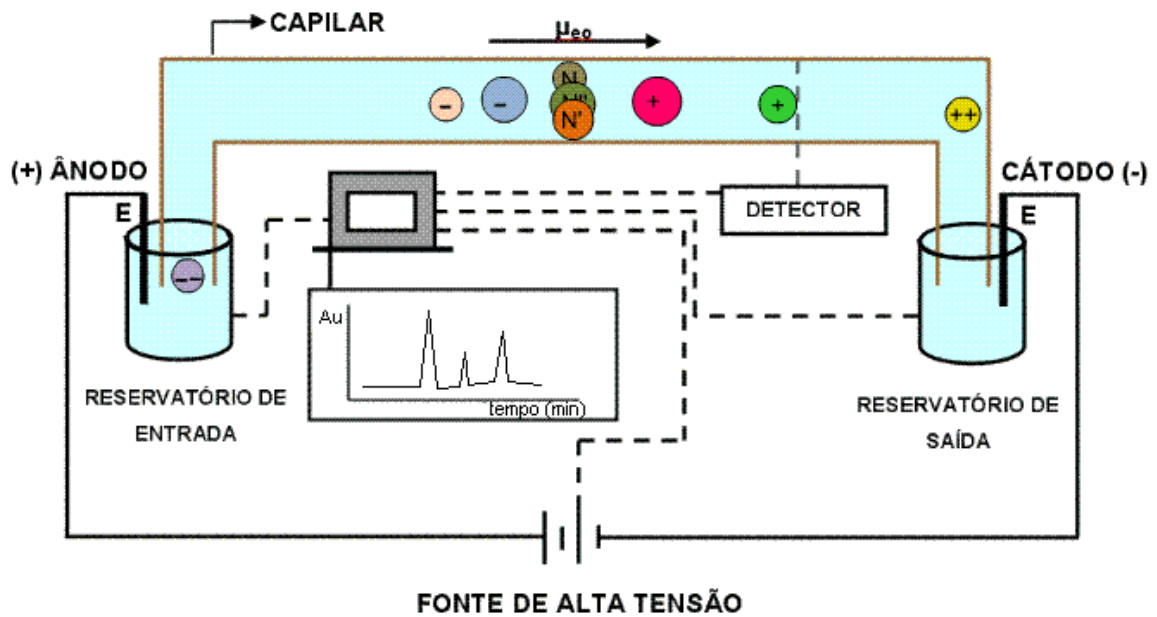
No presente trabalho apenas o modo de EC de zona foi utilizado, portanto seus fundamentos e aplicações serão descritos em maiores detalhes.

### 3.3 – ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA (ECZ)

Em ECZ, a separação dos analitos é conduzida em tubos capilares (canal de migração) com dimensões que podem variar de 15 a 100  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno, e 50 a 100 cm de comprimento. A geometria do capilar (elevada área superficial interna em comparação ao volume) favorece a dissipação do calor (oriunda do efeito Joule), sendo possível o estabelecimento de campos elétricos substancialmente elevados (100 - 600 V/cm), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede  $10^5$  pratos teóricos), alta resolução e curtos tempos de análise (BAKER, 1995; TAVARES, 1996).

A amostra é introduzida no capilar contendo um eletrólito, geralmente tamponado, como uma banda de pequena espessura, por métodos eletrocinético ou hidrodinâmico. Na injeção eletrocinética, um gradiente de potencial é estabelecido ao longo do capilar de forma que a amostra é inserida de maneira não representativa, ou seja, a injeção é preferencial aos constituintes que migram mais rapidamente. Na injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão, que pode ser estabelecido por diferentes mecanismos: pressurização ou vácuo no reservatório de solução, ou por gravidade, quando a amostra é introduzida por sifonagem. A injeção hidrodinâmica introduz no capilar uma alíquota representativa da composição do soluto na amostra. O volume injetado (na ordem de nL) depende do tempo de injeção, dimensões do capilar, viscosidade da solução tampão e da pressão fornecida (BAKER, 1995; TAVARES, 1996).

Durante uma corrida, uma fonte de corrente contínua de alta tensão é usada para estabelecer o campo elétrico constante ao longo do capilar, com valores típicos de voltagem no intervalo de -30 a 30 kV e corrente de -100 a 100  $\mu\text{A}$ . O operador é protegido contra o contato acidental com o sistema de alta voltagem pela inclusão deste sistema numa caixa de plástico, equipada com chaves de segurança. A fonte de alta tensão é conectada ao sistema de análise através de eletrodos de platina, imersos nos reservatórios de eletrólito, aos quais também ficam imersas as extremidades do capilar. Assim, o circuito elétrico é fechado quando há aplicação da voltagem, figura 3.1.



**Figura 3.1** : Representação esquemática da Eletroforese Capilar onde “E” representa o eletrodo. O diâmetro do capilar foi ampliado desproporcionalmente para facilitar sua visualização.

Quando o campo elétrico é estabelecido, cada zona (constituída de um analito) migra com velocidade constante, mas diferenciada, em função da razão carga/raio, proporcionando assim a separação. Numa dada condição, quanto maior for a carga e menor for o raio de um constituinte iônico, incluindo sua hidratação, mais rapidamente este migrará, figuras 3.1 e 3.3 (BAKER, 1995; TAVARES, 1996).

Para minimizar efeitos térmicos, o cartucho onde é acomodado o capilar possui uma abertura que permite a passagem de ar termostaticado, o que mantém a temperatura constante durante as corridas. Os comandos para o controle do equipamento e aquisição de dados são feitos mediante interface com um computador.

Toda a análise é monitorada por um sistema de detecção. Quando cada analito passa por uma “janela” de detecção, situada no próprio capilar próximo à extremidade de saída, ele é acusado pelo sistema de detecção que indica a presença de uma banda de pequena espessura (pico). Isto gera um gráfico do sinal analítico em função do tempo, denominado “eletroferograma”.

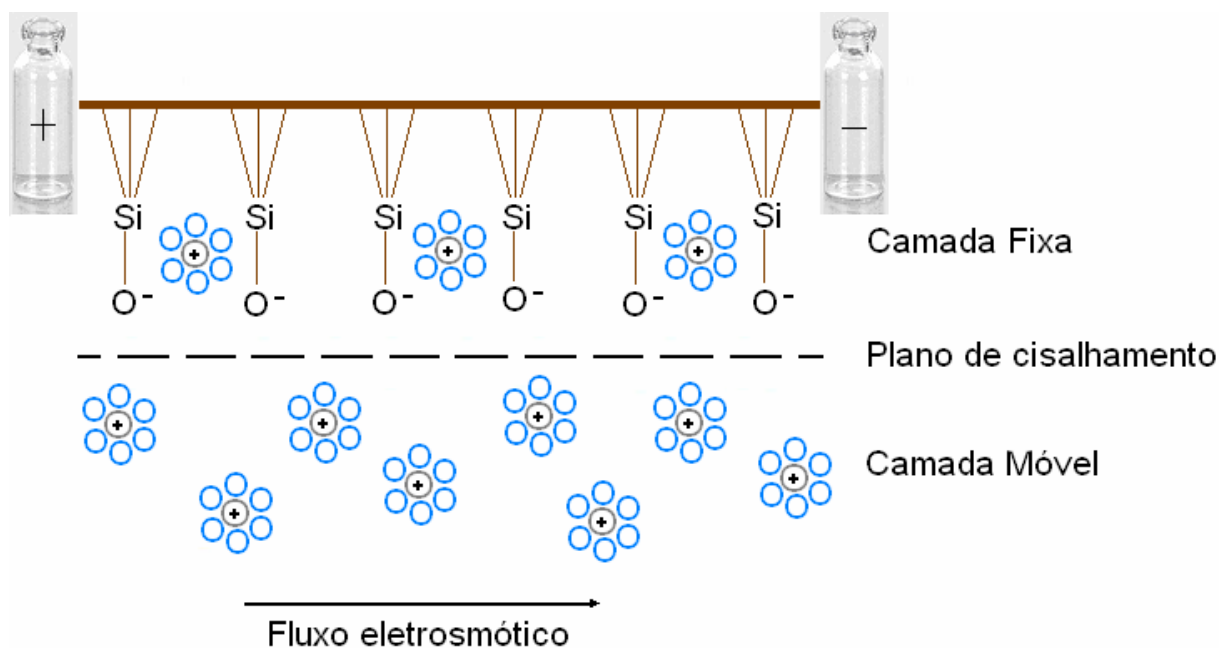
Uma característica importante em análises por EC é a presença de um fluxo da solução de eletrólito (geralmente no sentido introdução-deteção). Nesta técnica de separação, além dos solutos, a solução tampão contida no capilar também se

move através do capilar sob a influência do campo elétrico aplicado, denominado fluxo eletroosmótico - FEO.

Quando uma solução de eletrólito é inserida no capilar, sua superfície interna se torna eletricamente carregada, devido a dois fenômenos: ionização ou adsorção (BAKER, 1995; TAVARES, 1996).

Em capilares de teflon o FEO ocorre em função da adsorção dos íons eletricamente carregados da solução de eletrólito na parede interna do capilar.

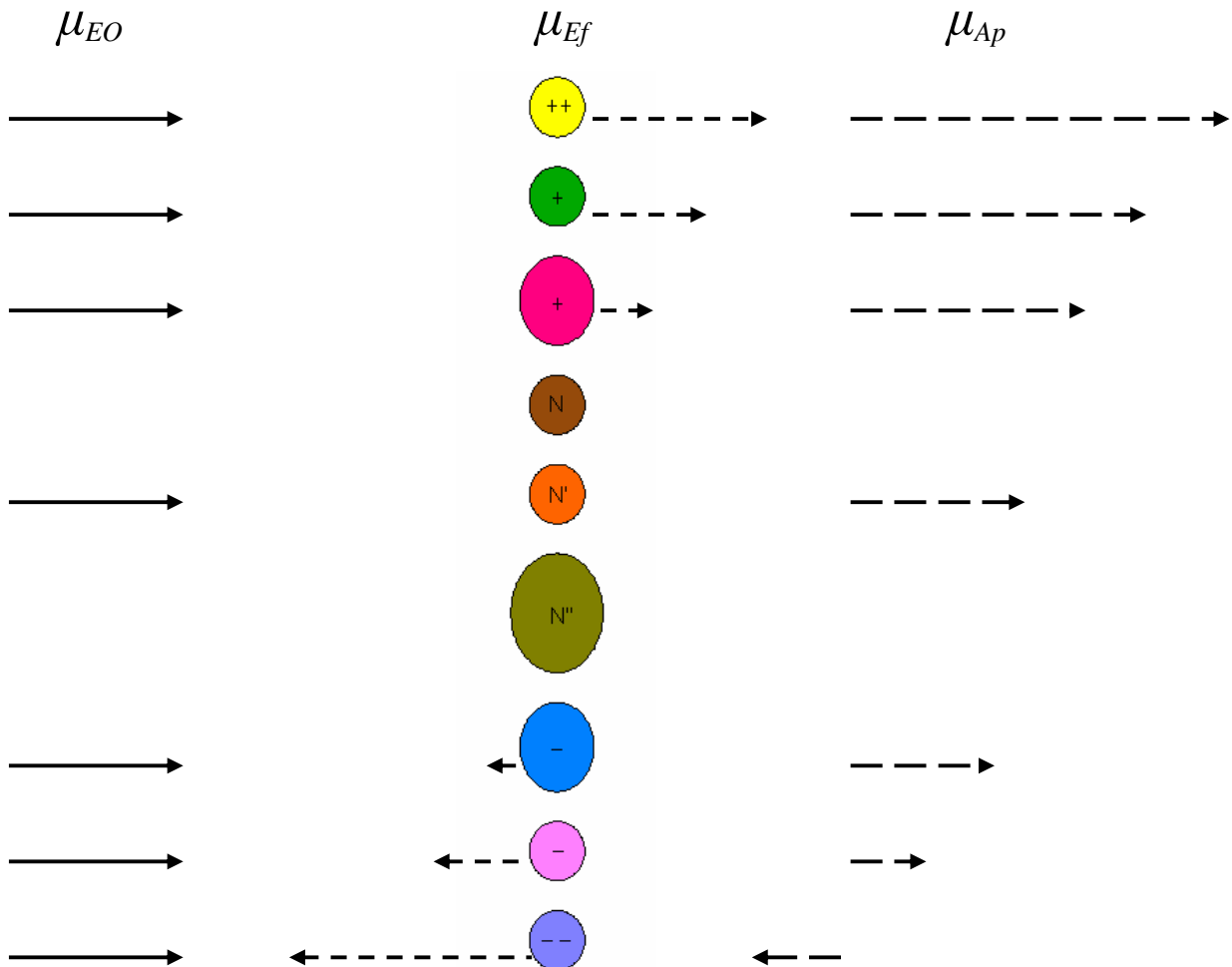
No caso dos capilares de sílica fundida funcionalizada, os grupos silanóis (Si-OH) da superfície interna que possuem caráter ácido ( $pK_a$  5,9) se ionizam formando grupos silanatos (Si-O<sup>-</sup>), se o pH do eletrólito for maior ou igual a três. Quando uma diferença de potencial é aplicada os íons em solução são distribuídos, de forma não homogênea, nas proximidades da parede interna do capilar, formando a dupla camada elétrica, que é composta pelas camadas fixa e móvel.



**Figura 3.2** : Representação esquemática para a superfície interna de um capilar de sílica fundida

A superfície negativamente carregada atrai cátions da solução de eletrólito, formando uma camada interna de cátions, denominada camada fixa. Esta camada interna não tem carga positiva suficiente para neutralizar a superfície negativa do capilar. Portanto, uma camada externa, chamada de camada móvel, é formada nas proximidades da primeira camada, gerando a dupla camada difusa. Quando é

aplicada a diferença de potencial nas extremidades do capilar, os cátions da camada móvel são empurrados em sentido ao catodo. Como estes íons estão solvatados, eles acabam arrastando o leito aquoso, induzindo então o FEO, figura 3.2 (BAKER, 1995; TAVARES, 1996).



**Figura 3.3 :** Representação da migração de moléculas neutras e íons de diferentes cargas e tamanhos no interior do capilar.

O FEO é caracterizado por um perfil radial constante da velocidade, não contribuindo, portanto, para o alargamento das bandas. Esta peculiaridade diferencia a EC dos métodos cromatográficos em fase líquida, que apresenta uma variação parabólica para o perfil da velocidade dentro da coluna, característica do fluxo induzido por pressão. O controle adequado do FEO é de grande importância para a eficiência da separação, por isso as propriedades físico-químicas da solução de eletrólito devem ser controladas. Entre estas propriedades destacam-se o pH,

concentração e força iônica do tampão, viscosidade, adição ou não de solvente orgânico e a temperatura de trabalho.

A velocidade aparente ( $v_{Ap}$ ) de um analito no interior do capilar, quando um campo elétrico é aplicado está diretamente ligada ao FEO, figura 3.3. A velocidade aparente é a soma vetorial da velocidade eletroforética – movimento próprio do analito, pois dependendo da carga, ele pode ser atraído pelo ânodo ou pelo cátodo – com a velocidade eletrosmótica – movimento do fluxo eletrosmótico, ou seja:

$$v_{Ap} = v_{Ef} + v_{EO} \quad (\text{Equação 3.1})$$

onde  $v_{Ef}$  é a velocidade eletroforética do analito e  $v_{EO}$  é a velocidade do fluxo eletrosmótico.

Uma maneira de se expressar o quanto um analito ou o fluxo eletrosmótico se movimenta considerando-se o campo elétrico envolvido é através do conceito de mobilidade, dado pela Equação 3.2:

$$\mu_{Ef} = \frac{v_{Ef}}{E} = \frac{v_{Ef} L}{V} \quad (\text{Equação 3.2})$$

onde,  $E$  é o campo elétrico aplicado, obtido a partir da voltagem  $V$  sobre o comprimento total do capilar  $L$ . Da mesma maneira se calcula a mobilidade eletrosmótica,  $\mu_{EO}$ . A relação da mobilidade eletroforética de um soluto com sua carga e seu raio é dada pela expressão:

$$\mu_{Ef} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (\text{Equação 3.3})$$

onde  $q$  é a carga do soluto,  $r$  é o seu raio e  $\eta$  é a viscosidade do eletrólito. Desta expressão, é possível entender que, em função da carga, a mobilidade eletroforética de cátions será positiva, a de ânions será negativa e a de compostos neutros será nula (figura 3.3).

Dependendo da magnitude de  $\mu_{EO}$ , é possível que determinados analitos sejam arrastados no sentido injeção-deteção, mesmo que tenham tendência em migrar no sentido contrário (analitos que possuem carga de mesmo sinal do eletrodo da extremidade da saída), ou seja, se  $\mu_{EO}$  for maior do que o módulo de  $\mu_{Ef}$ . Dessa forma, numa mesma corrida eletroforética é possível, de maneira ilustrativa, analisar ânions e cátions, com uma única banda de compostos neutros (caso houver) no centro do eletroferograma, juntamente com o sinal do fluxo, entre o grupo de cátions e o grupo de ânions (BAKER, 1995; TAVARES, 1996).

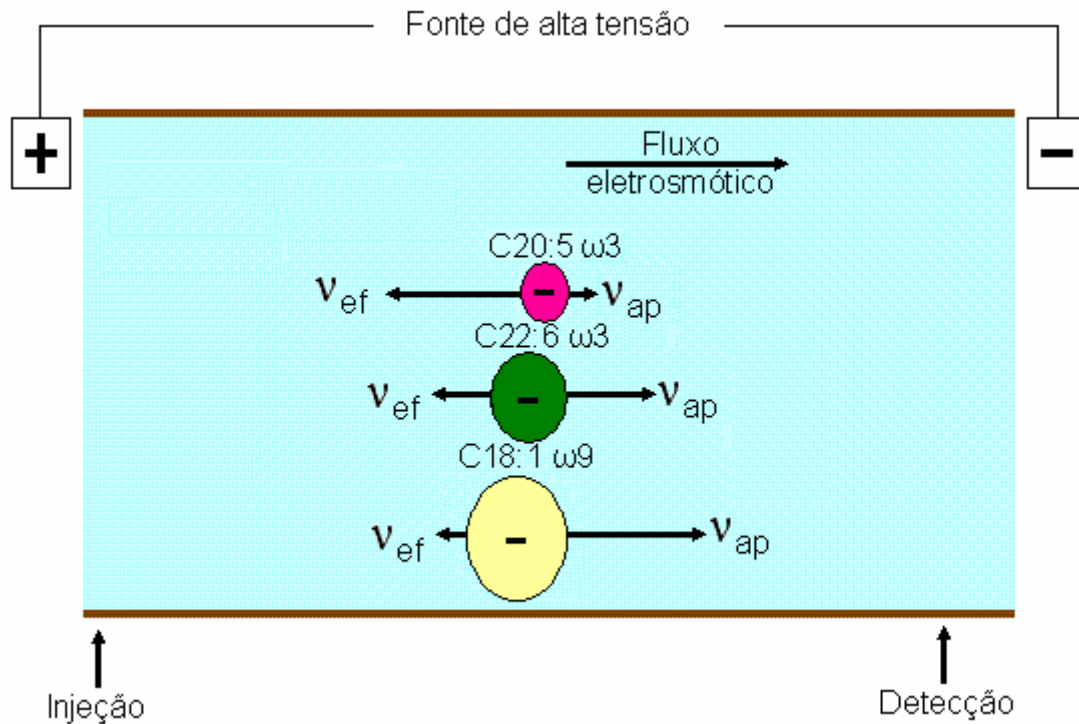
### 3.4 – ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS POR ECZ

Os AG de cadeia longa (acima de 10 carbonos) apresentam característica semelhante a de ácidos fracos cujo pKa é em torno de 5, e portanto, de maneira geral, para estes AG a separação é realizada em contra-fluxo (velocidades dos fluxos eletrosmótico e eletroforético na mesma direção, porém em sentido contrário), em tampão com pH 8 (para mantê-los em sua forma aniônica), mediante deteção indireta por UV. Vários cromóforos têm sido considerados para a análise indireta por UV, dentre os quais destacam-se o p-anisato, dietilbarbiturato e o dodecilbenzenossulfonato de sódio. Normalmente, utiliza-se grande porcentagem de solventes orgânicos no intuito de aumentar a solubilidade dos AG no meio condutor (ROLDAN-ASSAD e GAREIL, 1995, OLIVEIRA *et al*, 2001, SUROWIEC *et al*, 2004, LIU *et al*, 1995, BIER, 1959, BOHLIN *et al*, 2003).

A ordem de eluição dos AG saturados de cadeia longa é do C18 para o C10, pois quanto maior o tamanho, menor é a resistência ao fluxo eletrosmótico, logo maior é a velocidade aparente deste AG. Contudo, quando na amostra estão presentes AG saturados e insaturados não é tão simples prever a ordem de eluição, pois as insaturações modificam o tamanho da cadeia do AG insaturado, se este for comparado ao AG saturado com o mesmo número de carbonos na cadeia. Pode-se ter, todavia, uma previsão da ordem de eluição através do cálculo do comprimento de cadeia equivalente (CCE):

$$CCE = N_c - 2N_{c=c} \quad (\text{Equação 3.4})$$

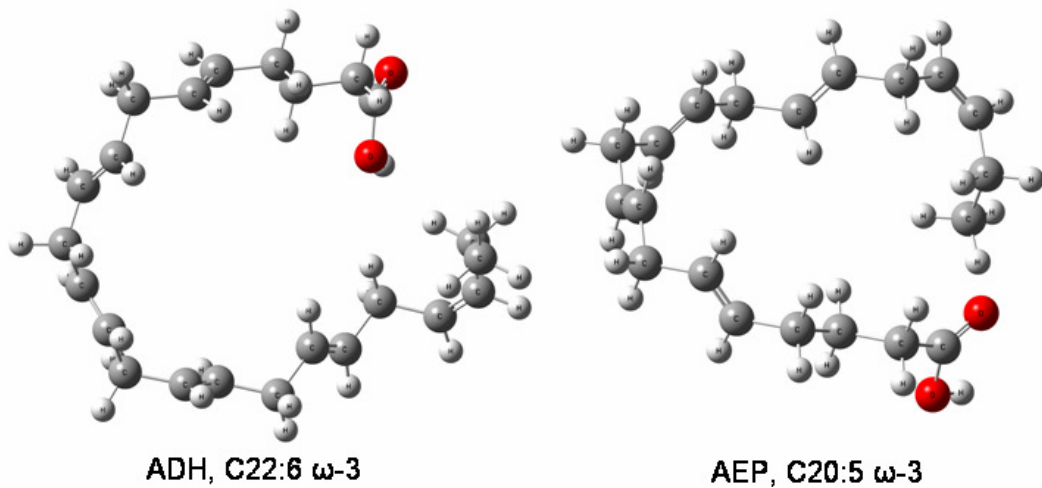
onde  $N_c$  e  $N_{c=c}$  correspondem ao número total de carbonos e ao número total de duplas ligações, respectivamente.



**Figura 3.4** : Esquema do mecanismo de separação de AG poliinsaturados por ECZ.

Então, por exemplo, os ácidos C22:6  $\omega$ -3 e C20:5  $\omega$ -3 estivessem presentes numa mesma análise, pode-se prever que eluiriam bem próximos pois possuem o mesmo CCE (=10), figura 3.4 (GUTNIKOV, 1995). Contudo, esta é apenas uma estimativa, pois ambos possuem muitas insaturações, o que faz com que suas cadeias sejam enoveladas, figura 3.5, e não estendidas como ocorre com AG saturados. Para a análise simultânea de AG saturados e insaturados com tamanho entre 10 e 20 carbonos, incluindo espécies *cis-trans*, utilizam-se ciclodextrinas modificadas (atuam como discriminadores entre isômeros geométricos *cis*) e tensoativos (aniônicos e/ou neutros), além de solventes orgânicos para facilitar a separação (OLIVEIRA *et al*, 2003 (a); CARDOZO *et al*, 2002; BALESTEROS *et al*, 2007; CASTRO *et al*, 2010, OTIENO, 2008; DRANGE e LUNDANES, 1997; OLIVEIRA *et al*, 2001 e BANNORE *et al*, 2008).



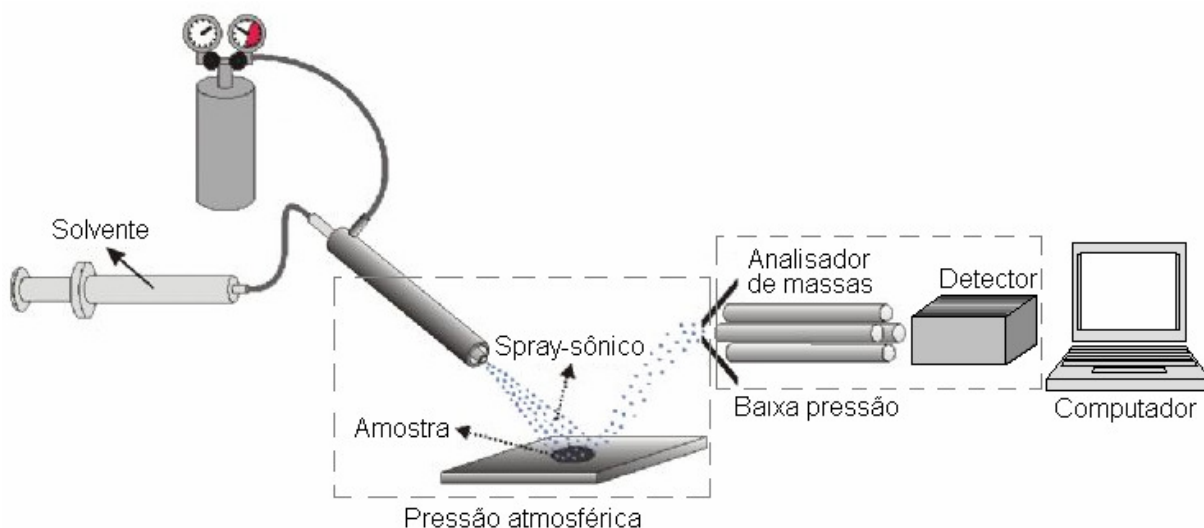


**Figura 3.5** : Estrutura espacial para AG polinsaturados.

Como já foi mencionado anteriormente, os ácidos graxos encontrados em óleos e gorduras estão, predominantemente, na forma de triacilglicerídeos. No entanto, os ácidos graxos são analisados por EC na sua forma livre, ou seja, sem estarem ligados ao glicerol e carregados negativamente. Para que isso ocorra é necessário que se faça o tratamento adequado da amostra.

## 4 – ESPECTROMETRIA DE MASSAS (EM)

A espectrometria de massas é uma poderosa ferramenta que foi usada, no princípio, para determinação de massas atômicas sendo empregada, na atualidade, na busca de informações sobre a estrutura de compostos orgânicos, na análise de misturas orgânicas complexas, na análise elementar e na determinação da composição isotópica dos elementos. Esta técnica fornece informações para profissionais de diversas áreas como químicos, biólogos, farmacêuticos, físicos entre outros (CROTTI *et al*, 2006).



**Figura 4.1** : Componentes de um espectrômetro de massas com infusão direta (Adaptado de VIEIRA, 2011).

### 4.1 – INTRODUÇÃO DA AMOSTRA E IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY (IES)

As amostras podem ser introduzidas em um espectrômetro de massas de várias maneiras, sendo que a infusão direta e a infusão através de uma coluna capilar são as mais comuns. A infusão capilar pode introduzir pequenas quantidades da amostra no espectrômetro de massas sem destruir o vácuo. Esta técnica

geralmente está acoplada a outras técnicas de separação incluindo a CLAE e a CG, que primeiramente separam os componentes de uma mistura para posterior análise.

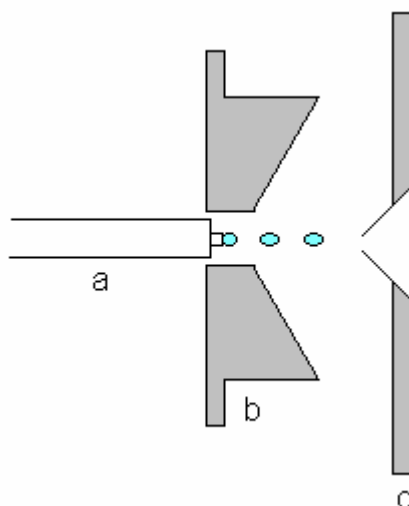
Existem várias técnicas de ionização, e isso se deve à grande variedade de amostras e espécies de interesse. Amostras sólidas, líquidas ou gasosas, contendo espécies voláteis, ou não, e com interesses que englobam desde a análise elementar até a determinação da composição de proteínas, requerem diferentes processos de ionização.

Dentre as técnicas de ionização, IES destaca-se como uma alternativa para geração de íons a partir de espécies pouco voláteis presentes em fase líquida. Em 1984, Yamashita e Fenn, demonstraram a aplicabilidade da fonte de *electrospray* como um método de ionização branda. Embora seja normalmente considerada como uma fonte de ionização, o *electrospray* é, na realidade, um processo de transferência de íons pré-existentes em solução para a fase gasosa. Pode-se dizer que a efetiva ionização é um efeito secundário (MORAES e DO LAGO, 2003).

Durante a ionização por *electrospray*, três tipos de íons podem ser gerados: íons moleculares, moléculas protonadas/desprotonadas e moléculas cationizadas ou anionizadas. Reações redox produzem íons moleculares  $[(M^+)]$  ou  $[(M^-)]$ ; reações ácido/base resultam na formação de moléculas protonadas  $[(M+H)^+]$  ou desprotonadas  $[(M-H)^-]$  e coordenação com cátions, geralmente da família dos metais alcalinos, ou ânions, principalmente cloretos, leva à formação de moléculas cationizadas  $[(M+Na)^+]$ , ou anionizadas  $[(M+Cl)^-]$ . Substâncias que apresentam grupamentos básicos, principalmente aminas, amidas e ésteres, normalmente são analisadas no modo positivo, dada a relativa facilidade com que as mesmas são protonadas. Por outro lado, substâncias contendo funções ácidas, tais como ácidos carboxílicos e fenóis, são mais facilmente desprotonadas e, conseqüentemente, são analisadas no modo negativo (CROTTI *et al*, 2006).

A IES envolve a formação de um “*spray*” eletrostático, a partir do qual são geradas pequenas gotas carregadas e destas são liberados os íons. Uma representação esquemática da IES é apresentada na figura 4.2. Toda a região da fonte está à pressão atmosférica. Quando um potencial positivo, por exemplo, é aplicado na solução, os íons positivos tendem a se afastar para uma região menos positiva, isto é, em direção ao contra-eletródo. Assim, a gota sendo formada na ponta do capilar estará enriquecida em íons positivos. Este tipo de separação de carga é chamado de processo eletroforético. Conforme a densidade de carga

aumenta na gota, o campo elétrico formado entre o capilar e o contra eletrodo aumenta provocando a deformação da gota. A gota ganha a forma de um cone que é denominado de cone de Taylor (MORAES e DO LAGO, 2003).



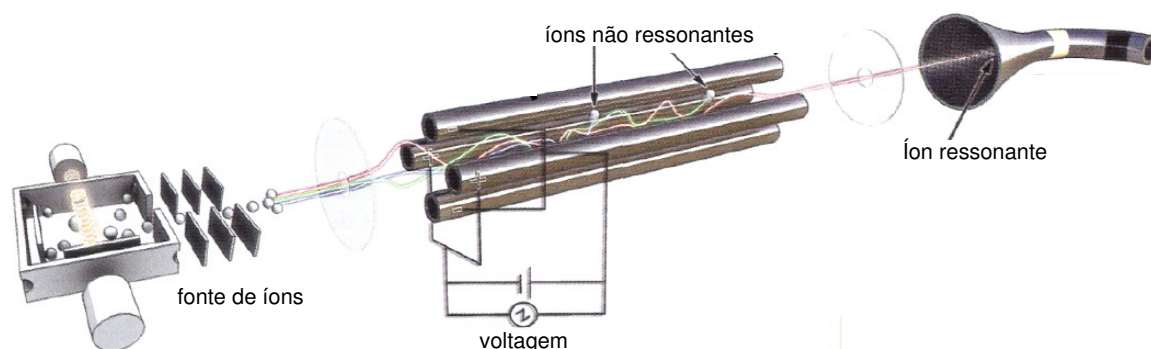
**Figura 4.2** : Esquema para IES – a) capilar, b) contra-eletródo, c) cone de amostragem.

Esta gota na forma de cone permanece “presa” ao capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície da gota e o aumento da repulsão entre os íons vençam a tensão superficial do líquido, ocorrendo então a liberação de pequenas gotas com alta densidade de carga. A frequência deste processo depende da magnitude do campo elétrico, da tensão superficial do solvente e da condutividade da solução.

## 4.2 – ANALISADORES DE MASSAS DO TIPO QUADRUPOLO

Os analisadores de massas separam os íons de acordo com a relação existente entre suas massas e cargas, ou seja, a razão  $m/z$ . O quadrupolo linear é o analisador de massas mais popular devido a sua simplicidade, preço relativamente baixo e facilidade de ser entendido e operado. O quadrupolo é composto de quatro barras de metal cilíndricas, figura 4.3. Um par de barras é mantido em um potencial elétrico positivo, enquanto o outro a um potencial negativo. Uma combinação de corrente contínua (DC) e radiofrequência (Rf) é aplicada nas barras. O par positivo

de barras atuará como um filtro para massas mais elevadas, enquanto que o par negativo agirá para massas pequenas (VIEIRA, 2011).



**Figura 4.3** : Analisador de massa do tipo quadrupolo (Adaptado de VIEIRA, 2011).

Os quadrupolos operam a uma resolução constante, mantendo a razão Rf/DC constante. Considerando-se uma dada amplitude Rf e DC, somente os íons que apresentarem determinada razão  $m/z$ , a qual esteja em ressonância com o campo aplicado, irão passar pelas barras do quadrupolo e serão detectados. Os demais íons que entrarem no quadrupolo terão suas trajetórias instáveis e, como consequência, atingirão as barras e serão eliminados pela bomba de vácuo (MORAES e DO LAGO, 2003; VIEIRA, 2011).

## 5 – PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

Em qualquer área de pesquisa, existe o interesse de se alcançar pelo menos melhoramentos em algum estudo que se esteja realizando, bem como saber quais variáveis são importantes para o sistema que se trabalha.

O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que vem sendo muito utilizada em estudos e pesquisas envolvendo a otimização de sistemas complexos, contendo duas ou mais variáveis e que se deseja saber sobre a presença ou não de efeitos interativos (sinergia ou antagonismo), que eventualmente podem levar a resultados que não seria possível conseguir por métodos univariados. Além disso, o planejamento fatorial é uma ferramenta auxiliar interessante capaz de ajudar o usuário a planejar sistematicamente os experimentos antes da execução de maneira a obter os dados de forma organizada e concatenada, no formato de tabelas com todas as informações necessárias sobre o experimento, facilitando a explicação, entendimento e a redação de relatórios para o estudo proposto. Os métodos estatísticos requerem que as observações, ou os erros sejam variáveis aleatórias distribuídas independentemente. Os experimentos com suas réplicas devem ser realizados de forma aleatória, de modo a garantir a distribuição equânime de todos os fatores não considerados (NETO *et al*, 2007).

Para executar um planejamento fatorial precisa-se em primeiro lugar especificar os níveis em que cada fator será estudado, isto é, os valores dos fatores que serão empregados nos experimentos (“+” para o nível alto e “-” para o nível baixo). Um planejamento fatorial completo requer a execução de experimentos em todas as possíveis combinações dos níveis dos fatores.

Em geral, se houver  $n_1$  níveis do fator 1,  $n_2$  do fator 2,..., e  $n_k$  do fator k, o planejamento será um fatorial  $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$ , ou seja, se forem três fatores, com dois níveis cada um, então serão realizados  $2^3$  experimentos, isto é, oito experimentos no total. Esse é o número mínimo necessário para um planejamento fatorial completo. Pode-se querer todavia, estimar o erro experimental a partir de ensaios repetidos, e nesse caso precisar-se-ia de mais experimentos, que na tabela 1 estão representados pelo zero, que corresponde a valores intermediários para ambos os níveis.

**Tabela 5.1** – Matriz de contrastes de um planejamento  $2^3$  com triplicata no ponto central.

Ensaio	$X_1$	$X_2$	$X_3$	Resposta
1	+	+	+	$R_1$
2	-	+	+	$R_2$
3	+	-	+	$R_3$
4	-	-	+	$R_4$
5	+	+	-	$R_5$
6	-	+	-	$R_6$
7	+	-	-	$R_7$
8	-	-	-	$R_8$
9	0	0	0	$R_9$
10	0	0	0	$R_{10}$
11	0	0	0	$R_{11}$

O número de ensaios necessários para se fazer um planejamento fatorial completo aumenta rapidamente com o número de fatores:

$$ne = n^k \quad (\text{Equação 5.1})$$

onde  $ne$  é o número de experimentos,  $n$  é o número de níveis e  $k$  o número de fatores.

Em muitos casos não se conhece, a priori, a relação completa de todas as variáveis que poderiam afetar significativamente a resposta do sistema. Para não correr o risco de excluir fatores que poderiam vir a ser importantes, deve-se estudar nesse estágio inicial, o maior número possível de variáveis. Pode-se fazer isso usando fatoriais fracionários em vez de fatoriais completos (NETO *et al*, 2007). Nestes casos, o número de experimentos é dado por:

$$ne = n^{k-p} \quad (\text{Equação 5.2})$$

onde  $p$  é um número inteiro que indica o quão fracionado será o planejamento experimental.

As variáveis que se mostram estatisticamente significativas num estudo exploratório, como no caso do planejamento fatorial fracionário, podem ser novamente submetidas a um novo planejamento experimental, mantendo-se fixas as variáveis que não se mostraram importantes.



## 6 – VALIDAÇÃO

A necessidade de mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, é cada vez mais reconhecida e exigida. Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões incorretas e conseqüentemente a prejuízos irreparáveis, quer sejam financeiros ou não. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve sofrer uma avaliação denominada validação (RIBANI *et al*, 2004).

Existem várias definições de validação de métodos e pode-se dizer que os conceitos continuam evoluindo. Segundo a ANVISA: “A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (ANVISA, 2003).

Dois tipos de validação podem ser descritos, a validação no laboratório e a validação completa. O primeiro procedimento é utilizado nas etapas preliminares do desenvolvimento de uma metodologia e na publicação de artigos para revistas científicas, em que são avaliadas todas as características de desempenho da validação da metodologia, porém sem verificar a reprodutibilidade. O segundo tipo, a validação completa, envolve todas as características de desempenho e um estudo interlaboratorial, que é utilizado para verificar como a metodologia se comporta com uma determinada matriz em vários laboratórios, estabelecendo a reprodutibilidade da metodologia. Só assim o método desenvolvido pode ser aceito como uma metodologia oficial para uma determinada aplicação (FARIA *et al*, 2008; RIBANI *et al*, 2004).

As características de desempenho analítico típicas que devem ser consideradas na validação são: seletividade (estudo do efeito de matriz), linearidade e faixa de aplicação, repetitividade, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

Neste trabalho, apenas algumas destas características de desempenho foram avaliadas, foram elas: linearidade, repetitividade, limite de detecção e limite de quantificação.

## 6.1 – LINEARIDADE

A linearidade de um método analítico é a sua capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003).

Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, cinco concentrações diferentes. Havendo relação linear aparente,  $R^2$  próximo de 0,9, os resultados dos testes deverão ser tratados por métodos estatísticos apropriados para determinação do coeficiente de correlação, intersecção com o eixo Y, coeficiente angular, soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e desvio padrão relativo (ANVISA, 2003).

A linearidade pode também ser verificada através da aplicação do teste de hipótese de linearidade *a priori*, que compara o desvio padrão residual,  $s_{y,x}$ , com o desvio padrão dos valores  $y_{i,j}$  em relação às suas médias  $\bar{y}_i$ , que é dado por  $s_y$  (Equação 5.1). O teste é realizado pela comparação entre  $F_{\text{falta de ajuste}}$  e  $F_{\text{crítico}_{\text{falta de ajuste}}}$  ( $\alpha; f1=p-2; f2=m-p$ ), se  $F_{\text{falta de ajuste}} \leq F_{\text{crítico}_{\text{falta de ajuste}}}$  ( $\alpha; f1=p-2; f2=m-p$ ), o modelo é considerado linear e sem evidências de falta de ajuste, podendo então ser usado na quantificação dos analitos nas amostras (DANZER e CURRIE, 1998).

$$F_{\text{calc}} = \frac{s_{y,x}^2}{s_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p-2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / (m-p)} \quad (\text{Equação 6.1})$$

onde  $m_i$  é o número de medidas de cada ponto,  $p$  é o número de pontos e  $m$  é o produto entre  $p$  e  $m_i$ .

## 6.2 – REPETITIVIDADE

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados de testes individuais obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, ou seja, amostra homogênea (ANVISA, 2003). É geralmente expressa

através da estimativa do desvio padrão relativo, também conhecido como coeficiente de variação (CV).

$$CV(\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (\text{Equação 6.2})$$

onde  $s$  é o desvio padrão dos resultados e  $\bar{x}$  é a média dos resultados.

### 6.3 – LIMITE DE DETECÇÃO

Limite de detecção é a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. No caso de métodos instrumentais a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base e pode ser determinado pela equação 5.3 (ANVISA, 2003).

$$LD = 3 \times \frac{s_{\text{ruído}} \times C_a}{H_{\text{máx}} - H_{\text{min}}} \quad (\text{Equação 6.3})$$

onde  $s_{\text{ruído}}$  é a estimativa do desvio padrão da linha base (ruído),  $C_a$  é a concentração do analito,  $H_{\text{máx}}$  é a altura máxima do pico do analito e  $H_{\text{min}}$  é a altura mínima do pico do analito.

### 6.4 – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Pode ser determinado por meio do ruído, da mesma forma que o limite de detecção. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1 (ANVISA, 2003).

$$LQ = 10 \times \frac{s_{\text{ruído}} \times C_a}{H_{\text{máx}} - H_{\text{min}}} \quad (\text{Equação 6.4})$$

onde  $s_{\text{ruído}}$  é a estimativa do desvio padrão da linha base (ruído),  $C_a$  é a concentração do analito,  $H_{\text{máx}}$  é a altura máxima do pico do analito e  $H_{\text{min}}$  é a altura mínima do pico do analito.

## 7 – OBJETIVOS

O presente trabalho teve como foco a implementação de metodologia analítica alternativa para análise do perfil de ácidos graxos poliinsaturados, por eletroforese capilar de zona, capaz de diferenciar ovos naturais de ovos enriquecidos.

### 7.1 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Seguem abaixo os objetivos propostos no projeto de mestrado:

- i - Otimizar e validar a metodologia proposta no presente trabalho, além de sua aplicação para análise em amostras de ovos, naturais e enriquecidos.
- ii - Utilizar planejamento de experimentos como ferramenta auxiliar na otimização do método de forma multivariada e sistemática.
- iii - Empregar espectrometria de massas para verificar inequivocamente a presença dos analitos nas amostras analisadas.

## 8 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 8.1 – REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água foi purificada por deionização (Sistema Milli-Q, Millipores, Bedford, USA). Metanol (MeOH), acetonitrila (ACN), clorofórmio (CLO), tetraborato de sódio (TBS) e hidróxido de sódio (NaOH) foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Polioxietileno-23-dodeciléter (Brij 35) foi obtido da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os padrões de ácido oléico (C18:1 cis-9), ácido elaídico (C18:1 trans-9), ácido linoleico (C18:2 cis-9,12), ácido linolênico (C18:3 cis-9,12,15), ácido eicosapentaenóico (C20:5 cis-5,8,11,14,17) e ácido docosaheptaenóico (C22:6 cis-4,7,10,13,16,19) foram obtidos também da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

Soluções estoque de Brij 35 e TBS foram preparadas na concentração de 100,0mmol/L. A solução de Brij 35 foi mantida sob refrigeração à 5°C para evitar a formação de mofo.

Soluções de estoques individuais dos ácidos graxos foram preparadas em metanol na concentração de 20,0 mg/g e estocadas no freezer até o momento das análises. Mistura dos padrões foram preparadas no dia da injeção a partir da diluição adequada dos estoques em metanol.

Soluções de NaOH foram preparadas nas concentrações de 0,5 mol/L para lavagem do capilar entre corridas e de 1,0 mol/L para condicionamento inicial do capilar. Foi preparada também solução metanólica de NaOH na concentração de 0,5 mol/L para saponificação das amostras.

### 8.2 – INSTRUMENTAÇÃO

#### a) Eletroforese Capilar

Os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar (Agilent Technologies, modelo HP3D CE; Palo Alto, USA) disponível no

Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, equipado com detector de DAD. Para as análises foi utilizado comprimento de onda em 200nm, temperatura controlada no interior do cartucho em 27°C e controle, aquisição e tratamento dos dados em software (ChemStation Versão A.06.01). Capilares de sílica fundida com revestimento externo de polimida (Polymicro Technologies, Phoenix, USA), com comprimento total de 48,5 cm e comprimento efetivo de 40 cm, 50 e 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente a 12,5 mbar durante 5 segundos para capilar de 75µm e 7,5 segundos para capilar de 50µm. O sistema eletroforético foi operado em polaridade normal e voltagem constante de +27 kV.

Quando um capilar novo era utilizado, este era condicionado por fluxo de solução aquosa de NaOH a 1,0 mol/L durante 30 minutos, água deionizada por 15 minutos e solução de eletrólito por 15 minutos. Entre as corridas, o capilar foi condicionado com solução aquosa de NaOH a 0,5 mol/L por 2 minutos (para evitar a adsorção da amostra na superfície interna do capilar), água deionizada por 2 minutos e solução de eletrólito por 3 minutos. No fim do dia o capilar era condicionado por flush de 5 minutos de NaOH a 1,0 mol/L e em seguida, água deionizada por 5 minutos, após esse procedimento o capilar era guardado para posterior utilização.

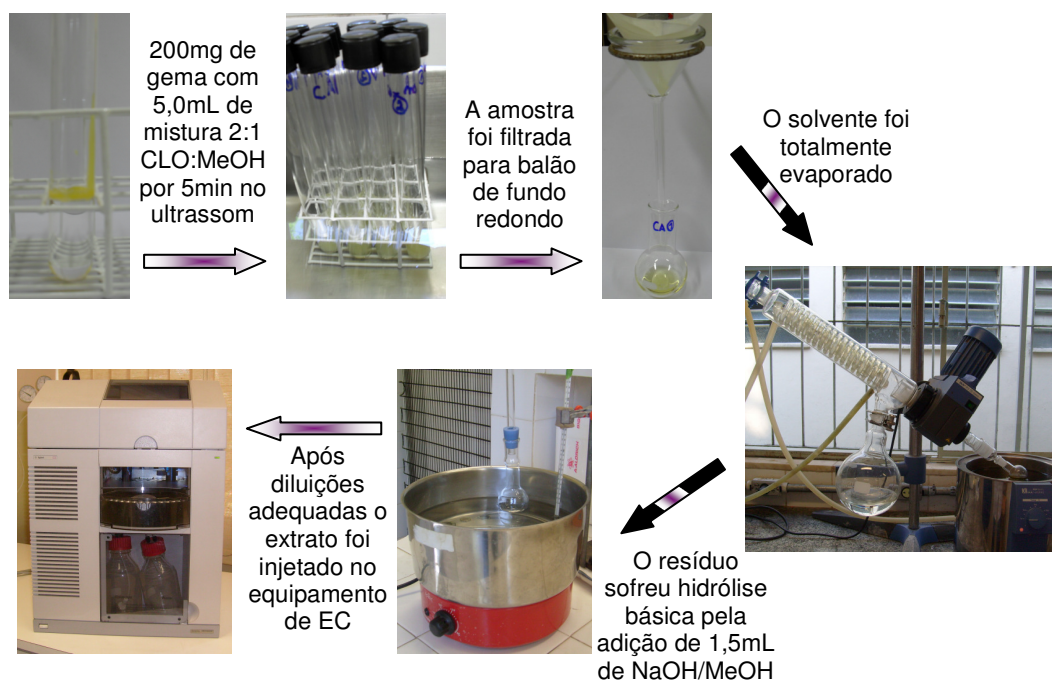
## b) Espectrômetro de massas

Com o intuito de verificar inequivocamente a presença dos ácidos graxos da família dos  $\omega$ -3 na amostra de ovo enriquecido, utilizou-se a espectrometria de massas com fonte de ionização electrospray via infusão direta. O espectrômetro de massas utilizado (Waters Micromass, modelo ZQ 2000 LC/MS, Manchester, UK) encontra-se no Instituto de Tecnologia em Fármacos FarManguinhos, Fundação Oswaldo Cruz e é equipado com analisador do tipo quadrupolo simples. A voltagem aplicada no capilar foi de 2,5 kV e a voltagem aplicada no cone de amostragem foi de 30 kV. A dessolvatação ocorreu na temperatura de 150°C e a análise sob o modo negativo de ionização. O fluxo do gás de dessolvatação, do gás de nebulização (a 80 psi) e do cone gás foram 160, 50 e 50 L/h de N<sub>2</sub>, respectivamente.

### 8.3 – PREPARO DAS AMOSTRAS

#### a) Eletroforese Capilar

As amostras foram adquiridas no comércio local. Em um tubo de vidro temperado de 30 mL (com rosca e tampa) foram pesados 200 mg de gema de ovo. A ele foram adicionados 5,0 mL de uma mistura 2:1 clorofórmio:metanol (FOLCH *et al*, 1957). Para ser homogeneizada a mistura foi levada por 5 minutos ao banho ultrassônico. Em seguida foi filtrada para um balão de fundo redondo e levada ao rotaevaporador até que todo o solvente fosse evaporado. Ao resíduo foram adicionados 1,5 mL de solução metanólica de NaOH a 0,5 mol/L para que ocorresse a hidrólise básica das moléculas de triacilglicerol (reação de saponificação). O balão permaneceu sob refluxo, em banho-maria, à temperatura de 80°C por 20 minutos. Após o término da reação, o produto foi transferido para um balão volumétrico de 5,0mL e avolumado com MeOH. Em seguida, 20µL do extrato foram diluídos em balão de 1,0 mL para posterior injeção no equipamento de eletroforese capilar. Segue um esquema elucidando o processo de preparo de amostra descrito acima.



**Figura 8.1** : Esquema para o preparo da amostra, extração da fase lipídica e saponificação do triacilglicerol, procedimento otimizado.



## b) Espectrômetro de massas

Em um tubo balão de fundo redondo foi pesada 1,0g de gema de ovo, a ele foram adicionados 25,0 mL de uma mistura 2:1 clorofórmio:metanol (FOLCH *et al*, 1957). Para ser homogeneizada a mistura foi levada por 20 minutos ao banho ultrassônico. Em seguida foi filtrada para um balão de fundo redondo e levada ao rotaevaporador até que todo o solvente fosse evaporado, o extrato foi dissolvido em metanol e injetado no equipamento de espectrometria de massas.

## 9 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para encontrar uma solução de eletrólito capaz de detectar e posteriormente separar os ácidos graxos da família dos  $\omega$ -3 foi feito um levantamento bibliográfico e em seguida alguns testes.

Foram preparados eletrólitos que utilizavam tampão fosfato de sódio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) (CASTRO *et al*, 2010), 1-octanol (SUROWIEC, 2004), Brij 35 e ACN (LIU *et al*, 1995), MeOH (ROLDAN-ASSAD e GAREIL, 1995), tampão tris/HCl e TBS (TAVARES *et al*, 2003) e dodecilbenzenosulfonato de sódio (OLIVEIRA *et al*, 2001). Todas as soluções de eletrólito foram utilizadas injetando-se solução de mistura de padrões de ácidos graxos insaturados na concentração de 0,5 mmol/L.

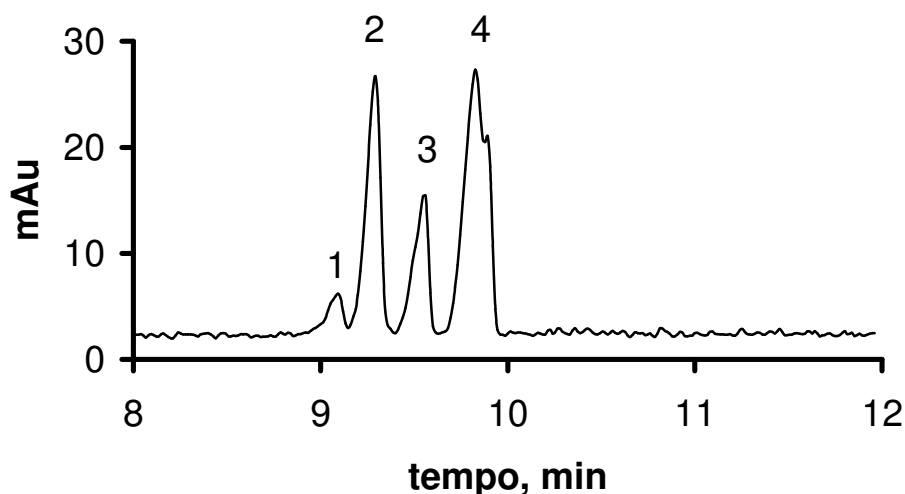
Dos testes realizados, o que se mostrou mais promissor foi o eletrólito utilizado por Tavares em 2003 na análise de ácidos graxos insaturados em óleo de peixe. Sua composição consistia de: 10mmol/L de Brij 35, 10mmol/L de TBS, 25% de MeOH e 25% de ACN.

O eletroferograma obtido neste teste, figura 9.1, apresenta quatro picos, no entanto, a mistura dos padrões de AG continha AOL, ALI, ALN, AEP e ADH. Observando-se o eletroferograma pôde-se verificar que no quarto pico parecia haver coeluição de dois AG. Para descobrir quais AG estavam coeluídos foi feita uma série de injeções com mistura de padrões e enfim descobriu-se que a coeluição era devida aos ALN e AEP, enquanto que os outros picos eram relativos ao AOL, ADH e ALI, respectivamente.

Como não se conhecia muito a respeito do sistema lançou-se mão de um Planejamento Fatorial de caráter exploratório e qualitativo. Dessa forma poder-se-ia obter informações a respeito dos fatores que mais influenciavam na estabilidade do sistema e possivelmente trilhar um caminho para a busca da separação do ALN com o AEP.

Foram selecionados como fatores do Planejamento a concentração do Brij 35, pois ele auxilia na separação de compostos com ligação do tipo *cis*, também a concentração do TBS que é a substância que define o pH aparente do eletrólito, voltagem e temperatura aplicadas ao sistema, que estão diretamente ligadas ao fluxo eletroosmótico e à viscosidade do eletrólito, respectivamente e ainda, a

proporção de solventes MeOH:ACN (mantendo-se fixa a porcentagem total), sua adição contribui para a solubilização dos AG no eletrólito, evitando que estes formem micelas.



**Figura 9.1** : Teste com eletrólito de TAVARES, 2003. 1 – ácido oléico, 2 – ácido docosahexaenóico, 3 – ácido linoleico, 4 – ácido linolênico e ácido eicosapentaenóico coeluídos.

Visto que foram selecionados cinco fatores e quanto maior o número de níveis por fator, maior o número de experimentos que devem ser feitos, optou-se por dois níveis para cada fator selecionado. O planejamento a ser feito seria então um Planejamento Fatorial  $2^5$ , que levaria a 32 experimentos. Como o objetivo desta série de experimentos era conhecer o sistema que se estava trabalhando, de forma qualitativa, optou-se por fazer um Planejamento Fatorial Fracionário  $2^{5-1}$ , ou seja, a fração meia do Planejamento Fatorial Completo  $2^5$ , onde o número de experimentos cairia pela metade, de 32 para apenas 16.

A fração meia foi obtida ao se construir um planejamento  $2^4$  completo para os fatores 1, 2, 3 e 4, e atribuindo ao fator 5 os sinais do produto das colunas 1, 2, 3 e 4, ou seja, para encontrar o nível de solvente que será usado no experimento basta multiplicar os sinais dos outros fatores, por exemplo, para o experimento 6: “+ vezes – vezes + vezes – = +”, portanto, no experimento 6, deve-se utilizar 27% de MeOH e 23% de ACN, tabela 9.1.

Para estipular quais seriam os níveis estudados dos fatores escolhidos, pensou-se em avaliar o comportamento do sistema frente à variação acima e abaixo

dos valores obtidos na literatura (TAVARES *et al*, 2003). Por exemplo, para o TBS foi utilizada a concentração de 10,0 mmol/L, logo, os níveis escolhidos para serem experimentados foram 8,0 e 12,0 mmol/L. A matriz de contrastes, bem como os níveis selecionados para cada fator estão apresentados na tabela 9.1.

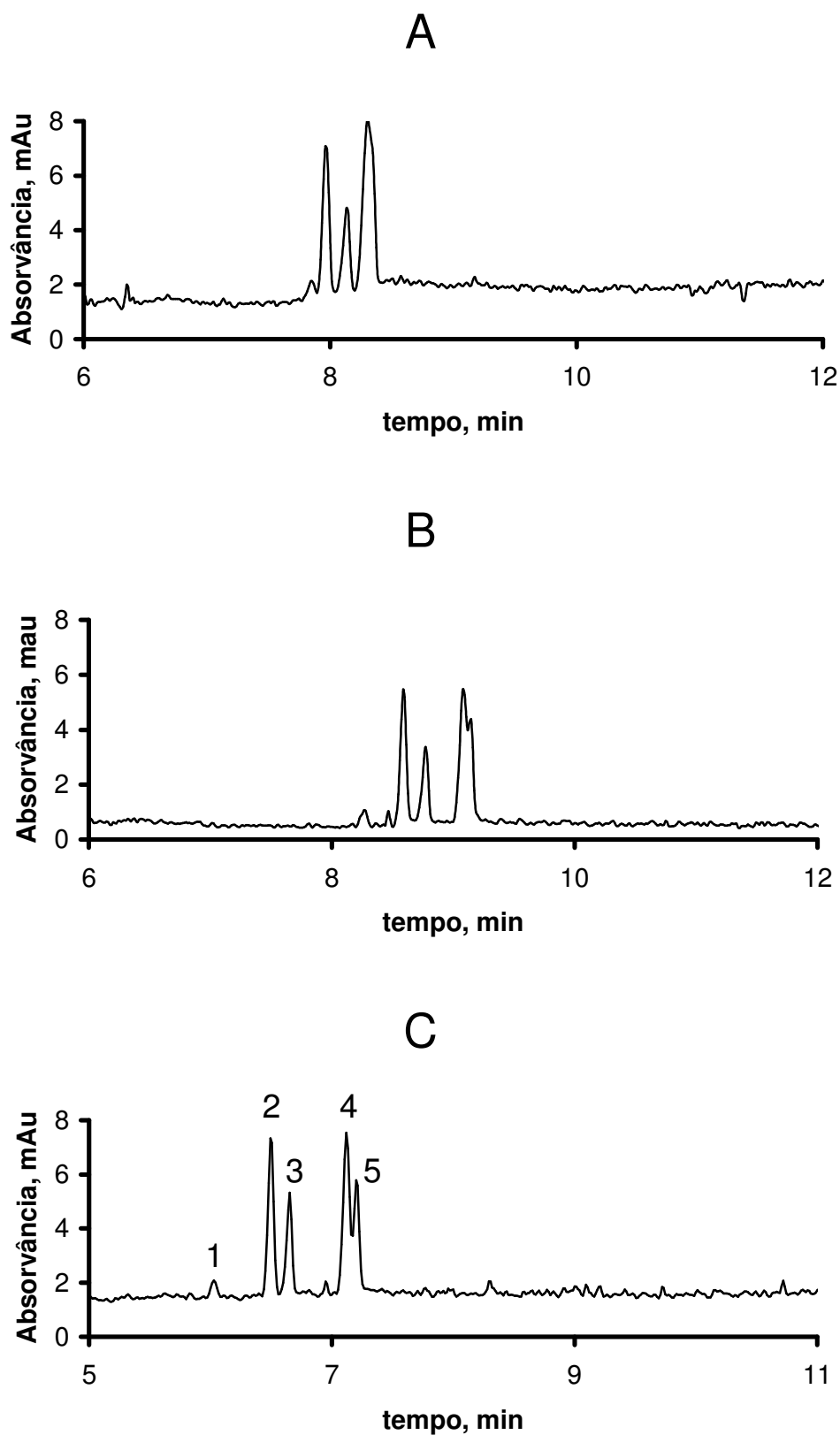
Foram escolhidas como respostas do experimento, a resolução do par crítico (ALN e AEP), calculada através da equação 9.1, e também o tempo de eluição dos compostos pela coluna capilar. Na tabela 9.1 a resolução foi considerada com valor igual a zero quando os picos coeluíram totalmente.

$$R = \frac{(2,35/2) \times (t_{i+1} - t_i)}{w_{50i} + w_{50i+1}} \quad (\text{Equação 9.1})$$

onde  $R$  é a resolução na meia altura,  $t_i$  é o tempo de saída do primeiro pico,  $t_{i+1}$  é o tempo de saída do segundo pico,  $w_{50i}$  a diferença de tempo na meia altura do primeiro pico e  $w_{50i+1}$  a diferença de tempo na meia altura do segundo pico.

A partir do planejamento realizado, poderiam ser calculados os efeitos e quais deles seriam significativos para o sistema, porém, como parte da resposta escolhida para avaliar o sistema foi uma resposta qualitativa, a influência dos fatores foi estudada caso a caso, comparando os eletroferogramas com a matriz de contrastes, bem como as resoluções calculadas, presentes na tabela 9.1.

O eletroferograma A da figura 9.2 é representativo para os experimentos 1, 2, 5, 9, 11, 13, 14 e 15, pois estes apresentaram perfil semelhante, não havendo portanto qualquer separação entre o par crítico. O eletroferograma B representa os experimentos 3, 6, 7 e 10, onde houve mínima separação do ALN e AEP. Por fim, o eletroferograma C é representativo para os ensaios 4, 8, 12 e 16, sendo que estes foram os que apresentaram as melhores separações, todos com resoluções próximas de 0,7.



**Figura 9.2** : Eletroferogramas representativos do planejamento fatorial fracionário para padrões de AG a 0,1mmol/L, 1 – AOL, 2 – ADH, 3 – ALI, 4 – ALN e 5 – AEP. Condições da análise: injeção 5,0s a 12,5 mbar, detecção direta em 200nm.

**Tabela 9.1** – Estudo exploratório do eletrólito e das condições experimentais de análise.

Ensaio	TBS (mmol/L)	Brij (mmol/L)	Voltagem (kV)	Temperatura (°C)	MeOH/ACN (%V/V)	Resolução
1	-1	-1	-1	-1	1	0
2	1	-1	-1	-1	-1	0
3	-1	1	-1	-1	-1	0,6
4	1	1	-1	-1	1	0,7
5	-1	-1	1	-1	-1	0
6	1	-1	1	-1	1	0,4
7	-1	1	1	-1	1	0,5
8	1	1	1	-1	-1	0,7
9	-1	-1	-1	1	-1	0
10	1	-1	-1	1	1	0,5
11	-1	1	-1	1	1	0
12	1	1	-1	1	-1	0,7
13	-1	-1	1	1	1	0
14	1	-1	1	1	-1	0
15	-1	1	1	1	-1	0
16	1	1	1	1	1	,7

TBS (-) 8,0mmol/L e (+) 12,0mmol/L; Brij (-) 8,0mmol/L e (+) 12,0mmol/L; Voltagem (-) 23KV e (+) 27KV;  
 Temperatura (-) 23°C e (+) 27°C; MeOH/ACN (-) 23/27% e (+) 27/23%

A análise da tabela 9.1 permite notar que todos os ensaios onde foi possível observar uma pequena melhora na separação do ALN e AEP (4, 8, 12 e 16) estão com níveis altos tanto para Brij quanto para TBS. Comparando-se os ensaios 4 e 16, onde os componentes do eletrólito se mantiveram constantes e apenas a voltagem e a temperatura variaram, percebe-se que não houve diferença significativa na separação. O mesmo ocorre quando se compara os ensaios 8 e 12. Contudo, ao comparar-se os tempos de eluição dos compostos nestes quatro ensaios, percebeu-se que o ensaio 16 possui um tempo de saída de cerca de 7 minutos, com temperatura e voltagem em níveis altos, enquanto que nos ensaios 4, 8 e 12 o tempo de saída foi de cerca de onze minutos para os três casos onde a temperatura ou a voltagem estavam no nível baixo. Logo, escolheu-se o ensaio 16 como o melhor para a separação do par crítico.

Como conclusões gerais sobre o Planejamento Fatorial Fracionário, pôde-se perceber que níveis mais altos de TBS e Brij 35 indicavam melhor separação do par crítico, níveis baixos de voltagem e temperatura comprometiam o tempo de eluição, e ainda, que a relação percentual dos solventes pareceu influenciar na separação do ALN e AEP.

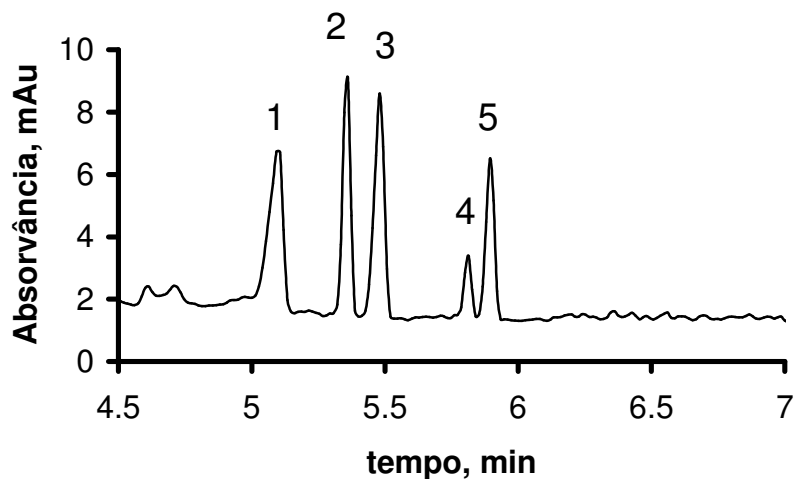
Testes para avaliar o efeito da concentração em níveis mais altos de Brij 35 e TBS foram realizados, mas nenhuma melhora significativa do sistema foi encontrada.

Para verificar melhor a influência do percentual de solvente orgânico no sistema, foram feitos nove experimentos, tabela 9.2, mantendo-se constante todas as outras condições obtidas no ensaio 16 do Planejamento Fatorial Fracionário feito anteriormente.

Dos nove experimentos da avaliação do solvente na composição do eletrólito, o ensaio 1 foi o que proporcionou a melhor separação entre o ALN e o AEP, figura 9.3. Pôde-se perceber, analisando os eletroferogramas, que quanto maior a quantidade de MeOH e menor de ACN, melhor era a separação do par crítico, ALN e AEP. Para verificar se esta tendência melhoraria ainda mais a separação, resolveu-se extrapolar o experimento representado pela tabela 9.2 no sentido de aumentar a porcentagem de metanol e conseqüentemente, diminuir a de ACN, até se obter 50% de MeOH e 0% de ACN, contudo, a separação do par crítico ficou novamente comprometida. Sendo assim, decidiu-se que o ensaio 1, da avaliação do percentual de solvente orgânico no eletrólito foi o ótimo obtido experimentalmente.

**Tabela 9.2** – Avaliação do percentual de solvente orgânico no eletrólito.

Experimentos	1	2	3	4	5	6	7	8	9
% MeOH	33	31	29	27	25	23	21	19	17
% ACN	17	19	21	23	25	27	29	31	33



**Figura 9.3** : Eletroferogramas de padrões de ácidos graxos, 1 – AOL 0,2mmol/L, 2 – ADH 0,05mmol/L, 3 – ALI 0,1mmol/L, 4 – ALN 0,05 mmol/L e 5 – AEP 0,01mmol/L. Condições da análise: capilar de 50 $\mu$ m de diâmetro interno, 360 $\mu$ m de diâmetro externo, 48,5cm de comprimento total e 40,0cm de comprimento efetivo, injeção 7.5s a 12,5mbar, detecção direta em 200nm, voltagem 27KV, temperatura 27°C, 12,0mmol/L de Brij, 12,0mmol/L de TBS, 33% de MeOH e 17% de ACN.

Para verificar se o resultado da separação se repetiria o eletrólito cuja composição era de 12,0 mmol/L de Brij 35 e TBS, 33% de MeOH e 17% de ACN, obtido do ensaio 1 presente na tabela 9.2, foi preparado três vezes e injetado duas vezes cada um, verificou-se que a separação se repetiu com os padrões, mas, pôde-se verificar também que o tempo de saída dos compostos não foi reproduzido, o que é comum de acontecer na técnica de eletroforese capilar.

Uma das soluções que podem ser implementadas para tentar corrigir este problema é fazer uso de um padrão interno (PI). Como se sabe, a escolha do PI é muito importante e deve ser feita com cuidado, pois a substância escolhida deve comportar-se de forma semelhante aos analitos, contudo, não pode estar presente na amostra, além de ter que estar, obrigatoriamente, separada de todos os outros compostos presentes.



Segundo a literatura (MAZALLI e BRAGAGNOLO, 2007; MILINSKA *et al*, 2003; HUANG *et al*, 1990), ácidos graxos trans não estão presentes em ovos, sejam enriquecidos ou não com ácidos graxos da família dos  $\omega$ -3.

Com a metodologia já otimizada para os padrões, resolveu-se aplicá-la nas amostras. Primeiramente pensou-se em injetar a amostra apenas realizando uma reação de hidrólise básica como tratamento da mesma (CASTRO *et al*, 2010). Todavia, isso não foi possível, pois no produto da saponificação estavam presentes muitos resíduos sólidos que se acredita que fossem as proteínas, abundantes nesse tipo de alimento. Foi então necessário um cuidadoso estudo a respeito de extração de gordura em amostras biológicas, bem como em alimentos.

A literatura reporta (MAZZALI e BRAGAGNOLO, 2007; IVERSON *et al*, 2001) que para amostras com grande percentual de gordura a extração mais indicada é a extração que utiliza mistura de clorofórmio e metanol (FOLCH *et al*, 1957). Ao aplicar-se esta metodologia, figura 9.4, verificou-se que com a adição de solução aquosa de KCl ao extrato, foram necessárias cerca de duas horas para se alcançar a separação das fases orgânica e aquosa, Resolveu-se então testar a extração com CLO e MeOH sem a adição da solução salina aquosa. Os eletroferogramas obtidos desse teste estão apresentados na figura 9.5.

Ao comparar-se os eletroferogramas apresentados na figura 9.5 pôde-se perceber que a metodologia desenvolvida consegue facilmente diferenciar ovos enriquecidos de ovos naturais.

O mesmo procedimento realizado para ovos enriquecidos e naturais foi repetido, a título de curiosidade, para diferentes amostras de ovos, figura 9.6 E 9.7. Todos os ovos analisados apresentaram perfil de AG semelhante entre si, a única exceção, como era de se esperar foi o perfil de AG obtido para os ovos enriquecidos.

Em cada uma das amostras os picos foram identificados por adição de padrão, contudo, não foi encontrado na amostra de ovo enriquecido, figura 9.5 A, pico relativo ao AEP.

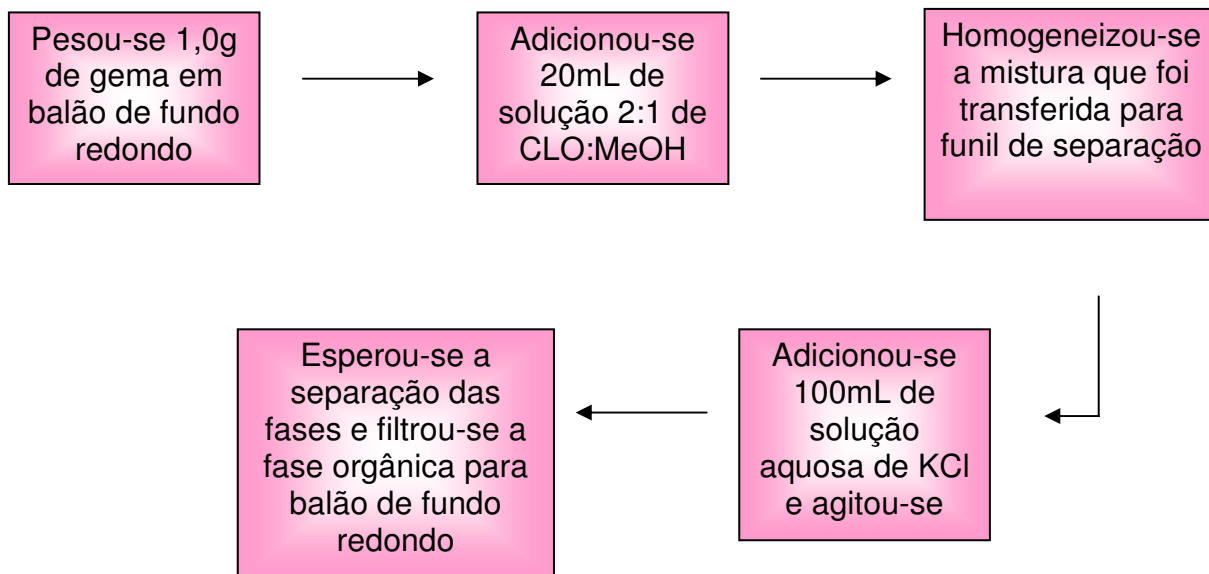


Figura 9.4 : Esquema da extração segundo o método de Folch.

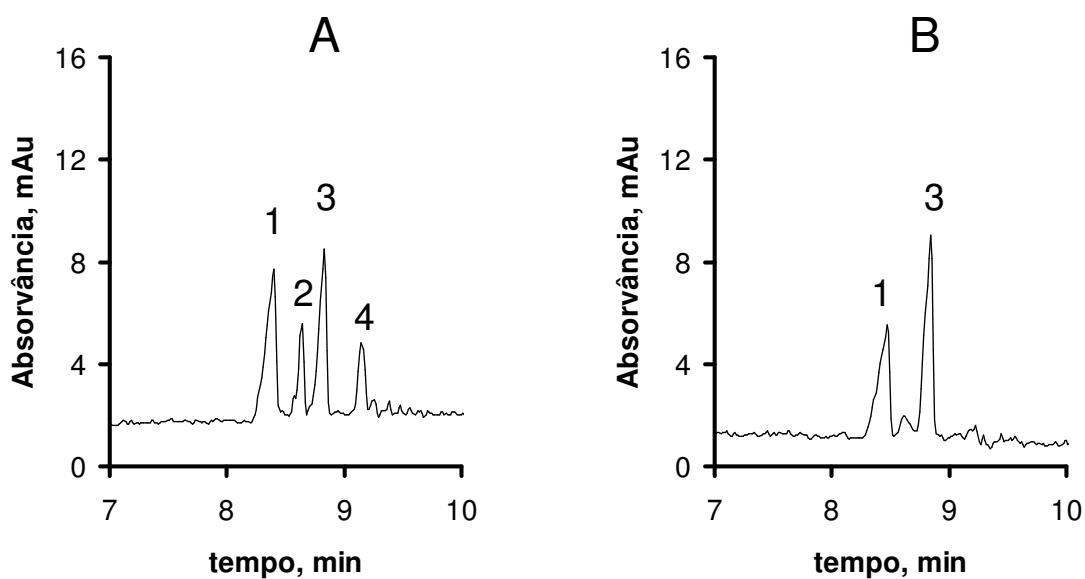
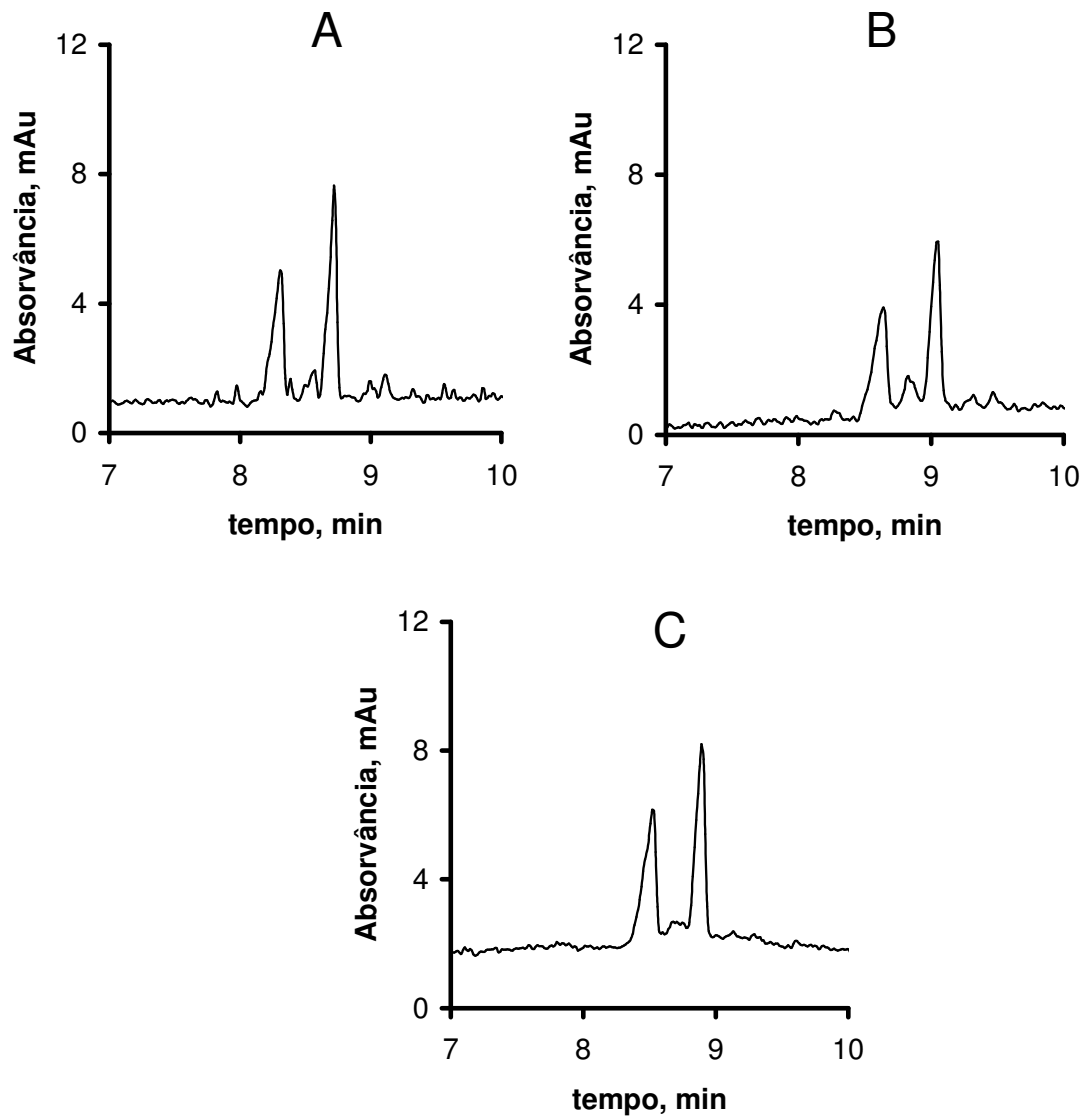
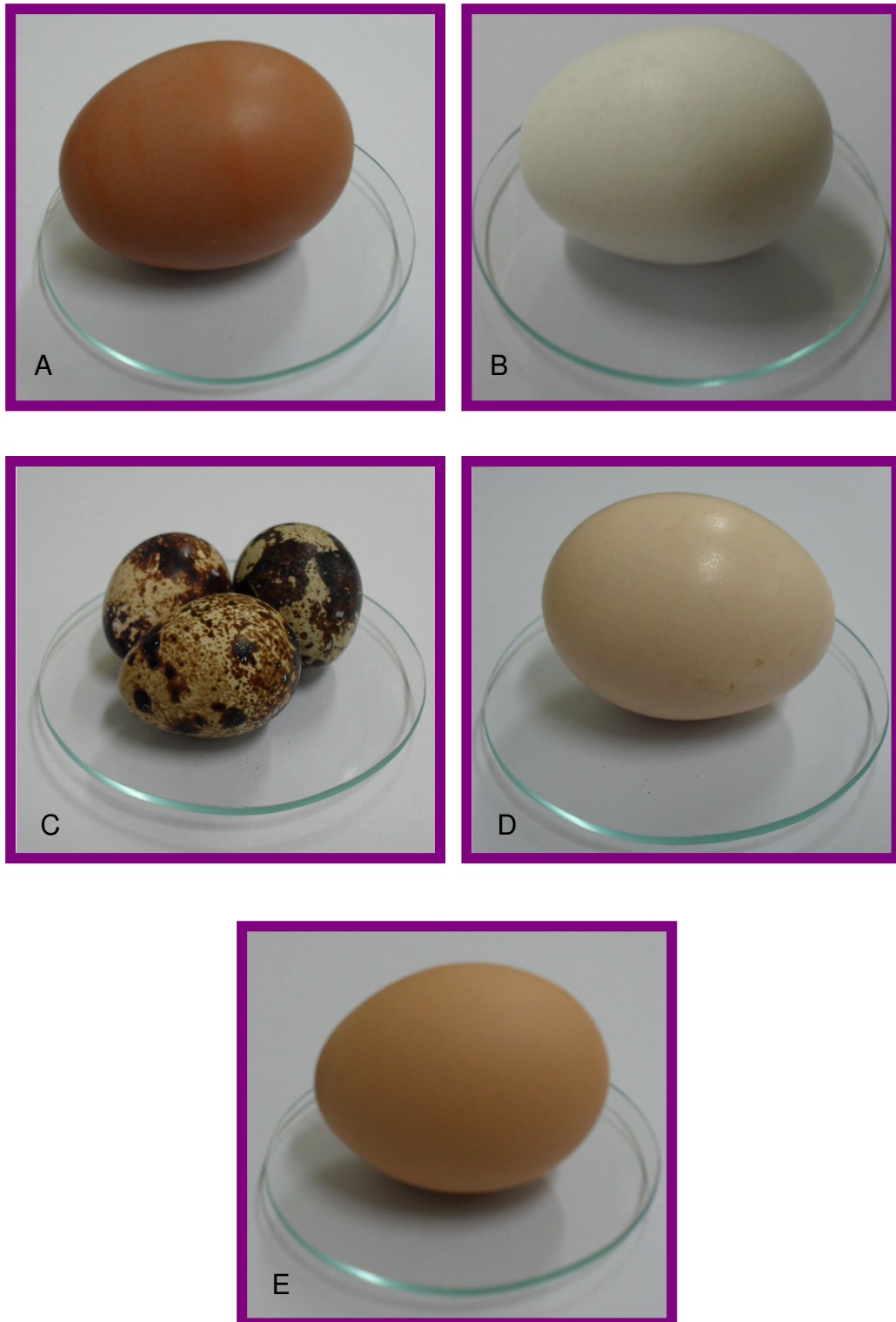


Figura 9.5 : Eletroferogramas para A) amostra de ovo enriquecido com AG  $\omega$ -3 e B) amostra de ovo vermelho natural.

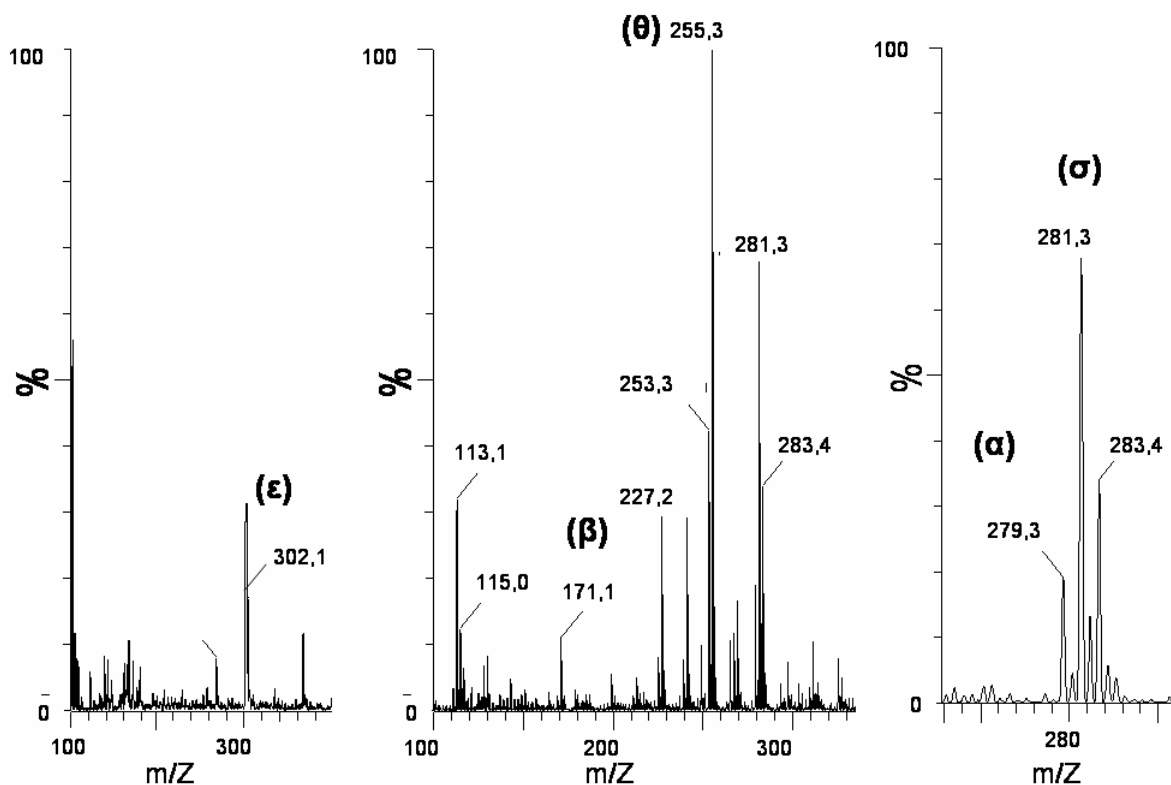


**Figura 9.6** : Eletroferogramas para A) amostra de ovo de codorna, B) amostra de ovo caipira e C) amostra de ovo branco.



**Figura 9.7** : Amostras analisadas: A) ovo vermelho, B) ovo branco, C) ovo de codorna, D) ovo caipira e E) ovo enriquecido com AG  $\omega$ -3.

Para verificar de forma inequívoca a presença dos AG  $\omega$ -3 na amostra de ovo enriquecido, e principalmente se o AEP estaria presente, decidiu-se injetar a amostra em um equipamento de espectrometria de massas. No espectro de massas obtido, figura 9.8, foram encontrados todos os AG insaturados que vinham sendo analisados por EC.



**Figura 9.8 :** Espectro de massas para a amostra de ovo enriquecido. (ε) ALN, (β) AOL, (θ) AEP, (α) ALI, (σ) ADH.

Com a ionização no modo positivo, o sinal com relação massa/carga ( $m/z$ ) em 302,2 indica a presença do ALN com um íon sódio aduto e intensidade relativa de 20%. No modo negativo da ionização, os sinais encontrados puderam comprovar a presença dos outros quatro ácidos. O sinal com relação  $m/z$  em 171,1 pode identificar o AOL após quebra na sua insaturação, sua intensidade relativa foi de 10%. O ALI foi identificado no sinal de relação  $m/z$  de 279,3 após a perda de um íon  $H^+$ , sua intensidade relativa foi de 40%. O AEP foi identificado no sinal com  $m/z$  de 255,3 e intensidade relativa de 80%, e finalmente, o ADH foi identificado no sinal com  $m/z$  de 281,3 e intensidade relativa de 75%, ambos sofreram descarboxilação seguida da perda de uma molécula de  $H_2$ .

A literatura (MAZZALI e BRAGAGNOLO, 2007) reporta valores baixos de concentração para o AEP em amostras de ovos enriquecidos, cerca de 15mg/100g de gema, logo, o que se pode concluir é que o AEP está presente na amostra, todavia em quantidades abaixo do limite de detecção da metodologia desenvolvida.

Sabendo-se que o método consegue separar o AOL, ALI, ALN e ADH presentes na amostra, partiu-se então para a etapa de quantificação dos mesmos.

Por preencher todos os pré-requisitos necessários de um padrão interno, para o caso em questão, como comportar-se de forma semelhante aos analitos e não estar presente na amostra, foram feitos testes e o ácido esteárico (AES – C18:1, 9t) pôde ser utilizado como padrão interno (PI) para a construção da curva analítica.

A equação 9.2, utilizada no cálculo da concentração do analito na amostra quando se tem o sinal do analito e do padrão interno em soluções de concentração conhecida, define a relação existente entre o padrão interno e o analito, ou seja, o fator de resposta. Mesmo que haja pequenas variações no sistema, ambas as substâncias são afetadas, e a relação mantém-se constante.

$$\frac{A_A}{[A]} = F_R \frac{A_{PI}}{[PI]} \quad (\text{Equação 9.2})$$

onde  $A_A$  é o sinal do analito,  $[A]$  a concentração do analito,  $F_R$  o fator de resposta,  $A_{PI}$  o sinal do padrão interno e  $[PI]$  a concentração do padrão interno.

Quando se constrói uma curva analítica utilizando o padrão interno em concentração constante, e se esta curva estiver bem ajustada, ou seja, o ajuste linear não apresentar evidências de falta de ajuste, o coeficiente angular pode ser usado como fator de resposta (BALESTEROS *et al*, 2007; CASTRO *et al*, 2010).

Sendo assim, foram construídas curvas analíticas para os ácidos AOL, ALI, ALN, e ADH. As curvas de calibração foram preparados em cinco níveis de concentração e em triplicatas autênticas, tabela 9.3. A concentração do AES foi mantida constante em 0,057mg/g em todos os pontos das quatro curvas analíticas obtidas.

**Tabela 9.3** – Níveis de concentração dos AG nas curvas de calibração.

Níveis de concentração (mg/g)	C18:1	C18:2	C18:3	C22:6
1	0,65	0,38	0,30	0,07
2	0,91	0,64	0,49	0,21
3	1,30	0,88	0,70	0,39
4	1,49	1,31	0,85	0,51
5	1,90	1,60	1,07	0,65

A tabela 9.4 apresenta os valores usados para se obter os modelos de regressão para os AG. Os valores dos sinais mostrados na tabela são os sinais corrigidos, ou seja, o sinal da amostra dividido pelo sinal do padrão.

**Tabela 9.4** – Valores usados na implementação do modelo de previsão.

Ácido graxo	[A]/[PI]	Sinal 1ª réplica	Sinal 2ª réplica	Sinal 3ª réplica
C18:1	0,65	0,54	0,53	0,59
	0,91	0,69	0,75	0,80
	1,30	1,03	0,92	0,93
	1,49	1,04	1,13	1,12
	1,90	1,34	1,44	1,30
C18:2	0,38	1,33	0,82	0,92
	0,64	1,45	1,77	1,90
	0,88	2,39	1,94	2,08
	1,31	3,39	3,54	3,13
	1,60	3,45	3,78	3,45
C18:3	0,30	1,00	1,23	1,28
	0,49	1,93	1,67	1,91
	0,70	2,85	2,95	2,67
	0,85	4,17	3,20	2,53
	1,07	3,68	3,99	4,17
C22:6	0,54	0,44	0,43	0,54
	1,43	1,21	1,36	1,43
	2,52	2,50	2,39	2,52
	4,41	3,44	2,95	4,41
	3,71	4,60	4,52	3,71

Utilizando o método dos mínimos quadrados pôde-se obter a regressão da curva analítica e conseqüentemente a equação da reta bem como o coeficiente de correlação ( $r$ ) para cada um dos AG analisados neste trabalho.

**Tabela 9.5** – Resultados estatísticos para os modelos de previsão.

Curva	Coeficiente angular	Coeficiente linear	R	$F_{sig}$	$F_{falta\ de\ ajuste}$	$F_R$
C18:1	0,64 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,986	459,59	0,23	0,64
C18:2	2,06 ± 0,13	0,31 ± 0,13	0,979	254,52	0,42	2,06
C18:3	3,69 ± 0,35	0,10 ± 0,26	0,946	111,29	0,25	3,69
C22:6	6,76 ± 0,47	-0,04 ± 0,19	0,970	209,35	0,38	6,76

$F_{crítico_{sig}} 0,05, 1, 13 = 4,67$

$F_{crítico_{falta\ de\ ajuste}} 0,05, 3; 10 = 3,71$

Tendo obtido os modelos de previsão, estes só podem ser utilizados corretamente se sua linearidade for verificada e ainda, se não apresentarem evidências de falta de ajuste, equação 6.1. Na verificação da falta de ajuste, se o valor de  $F_{falta\ de\ ajuste}$  for menor que o valor de  $F_{crítico_{sig}}$ , dentro do intervalo estimado, não haverá evidências de falta de ajuste do modelo. Já na verificação da significância da regressão, o valor de  $F_{sig}$  deve ser pelo menos cinco vezes maior que o valor de  $F_{crítico_{sig}}$ . Se o resultado para ambos os testes obedecerem às regras estatísticas, o coeficiente angular da equação obtida pode ser usado como  $F_R$  para a quantificação do respectivo AG nas amostras.

Como o valor de  $F_{falta\ de\ ajuste}$  foi menor que o valor de  $F_{crítico_{sig}}$  para todas as curvas de calibração obtidas e também o valor de  $F_{sig}$  foi pelo menos vinte vezes maior que o  $F_{crítico_{sig}}$ , pode-se afirmar com 95% de confiança que para o intervalo estimado, não há evidência de falta de ajuste nos modelos implementados, bem como, suas regressões são significativas, portanto, os  $F_R$  encontrados podem ser utilizados para quantificar os AG da série dos  $\omega$  em amostras de ovos de acordo com a equação 9.3, que é um rearranjo da equação 9.2.

$$[A] = \frac{A_A [PI]}{F_R A_{PI}} \quad (\text{Equação 9.3})$$

Antes de quantificar a amostra pensou-se em avaliar se a forma que a extração vinha sendo feita estava correta e se a adição de solução salina faria ou não diferença no resultado final. Para isso foi realizado um planejamento fatorial misto.



Os fatores avaliados foram quantidade de solvente, nos níveis 3,0; 5,0 e 7,0 mL. A quantidade de solvente é importante de se avaliar, pois pouco solvente pode ser insuficiente para a extração total da fase lipídica, e quantidades maiores pode acabar gerando desperdício. Também foi avaliado o tempo que a amostra ficava no banho ultrassônico nos níveis 3,0; 5,0 e 7,0 minutos, se o tempo é curto, pode não ser suficiente para promover a interação da amostra com o solvente, tendo como consequência uma extração parcial da gordura presente na amostra. Todavia, tempos longos não são desejáveis se este tipo de procedimento for utilizado em análise de rotina, além disso, também pode proporcionar a degradação dos analitos. O último fator analisado foi a adição ou não de solução salina aquosa de KCl, nos níveis “+” e “-”, ou seja, presente e ausente. Com a adição da solução salina, o tempo do preparo da amostra aumenta consideravelmente, logo, se a não adição levasse a resultados similares aos de quando a solução é adicionada, o primeiro resultado seria o preferido.

Para realizar este experimento foram utilizadas quatro gemas de ovos enriquecidos, elas foram separadas das claras e passaram por uma peneira que além de homogeneizá-las, também ajudou a separar a membrana que envolve as gemas.

Para avaliar os resultados do planejamento misto, tabela 9.6, escolheu-se como resposta a soma das massas dos AG da família dos  $\omega$ -3 monitorados pela metodologia desenvolvida (ALN e ADH). Esta soma ( $M$ ) foi encontrada através da equação 9.4:

$$M = \frac{([ALN] + [ADH]) \times \bar{m}}{100} \quad (\text{Equação 9.4})$$

onde  $[ALN]$  é a concentração de ácido linolênico encontrada em 100g de gema,  $[ADH]$  é concentração de ácido docosahexaenóico encontrada em 100g de gema e  $\bar{m}$  é a massa média de gema em 100g de ovo líquido (clara + gema).

Tabela 9.6 – Estudo sobre a extração da fase lipídica da amostra.

Ensaio	Massa de amostra <sup>a</sup>	Fatores				Concentração <sup>d</sup>						M <sup>e</sup>
		Solvente <sup>b</sup>	Tempo no ultrassom <sup>c</sup>	KCl <sub>(aq)</sub> <sup>b</sup>	C18:1	C18:2	C18:3	C22:6				
1	0,2304	-1	-1	-1	4419	2305	401	198	160			
2	0,2113	0	-1	-1	8559	3218	759	370	301			
3	0,2247	1	-1	-1	7554	2866	686	324	270			
4	0,2414	-1	0	-1	5909	2202	517	227	199			
5	0,2273	0	0	-1	7863	2999	720	319	277			
6	0,2346	1	0	-1	6624	2638	577	300	234			
7	0,2293	-1	1	-1	5955	2080	514	219	196			
8	0,2129	0	1	-1	11129	3964	998	401	373			
9	0,2367	1	1	1	7410	3046	731	327	283			
10	0,208	-1	-1	1	6409	2491	612	257	232			
11	0,2098	0	-1	1	8284	3153	746	334	288			
12	0,2392	1	-1	1	9365	3651	801	374	314			
13	0,2182	-1	0	1	8561	3288	791	349	304			
14	0,2157	0	0	1	8653	3297	785	342	301			
15	0,2204	1	0	1	12316	4660	1087	466	415			
16	0,2581	-1	1	1	7840	2933	741	305	279			
17	0,211	0	1	1	8104	3024	701	332	276			
18	0,2078	1	1	1	10335	3723	833	419	334			

<sup>a</sup> – g, <sup>b</sup> – mL, <sup>c</sup> – minutos, <sup>d</sup> – mg/100g de gema, <sup>e</sup> – mg/100g de ovo líquido (clara + gema)

A massa média de gema em 100g de ovo líquido foi obtida pesando-se seis ovos enriquecidos (clara e gema) e posteriormente as gemas apenas. Em seguida foi feito um cálculo simples de proporção que gerou como resultado a massa de 26,7g de gema em 100g de ovo líquido.

Segundo a figura 9.9, estão presentes o total de 393mg de AG  $\omega$ -3 em 100 g de ovo enriquecido líquido da marca analisada. Contudo, a metodologia desenvolvida no presente trabalho avalia apenas a presença dos AG  $\omega$ -3 ALN e ADH, logo, a existência de outros AG também da série dos  $\omega$ -3 não foi incluída na última coluna da tabela 9.6.

COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DO OVO ( P/100g, sem casca )				
	CONVENCIONAL	INGESTÃO DIÁRIA RECOMENDADA (I.D.R.)		MANTIQUEIRA ÔMEGA 3 + VITAMINAS 😊😊😊
		Homem	Mulher	
MANTIQUEIRA ÔMEGA 3	70	600~1500	600~1000	393
		Crianças	Adultos	
VITAMINA E (mg)	1,10	10	10	7,0
Lipídios totais (g)	10,02			9,0
Ácidos Graxos				
Saturados (%)	31,73			27,91
Monoinsaturados (%)	49,68			46,46
Poli-insaturados (%)	18,59			25,63
Proteínas (g)	12,49			12,54
Carboidratos (g)	1,22			1,26
Calorias (Kcal)	149			138
Sais Minerais (g)	0,94			0,96

Fontes: Informações sobre nutrição humana USDA 1989, NCR 1974, INT'LLIFE SC. INST. 1995; Poultry Science 1979 UNICAMP Aug 1997, ITAL Sept 1997, Nihon Shokuhin Lab, JAPÃO Sept 1997

**Figura 9.9** : Composição nutricional dos ovos analisados, declarada pelo produtor no rótulo da embalagem.

Quando o valor é comparado com os resultados apresentados na última coluna da tabela 9.6, verifica-se que valores abaixo de 300mg/100g podem ser descartados pois o ALN e o ADH são os majoritários para AG  $\omega$ -3 na composição dos ovos enriquecidos. Restam então os experimentos 2, 8, 12, 13, 14, 15 e 18.

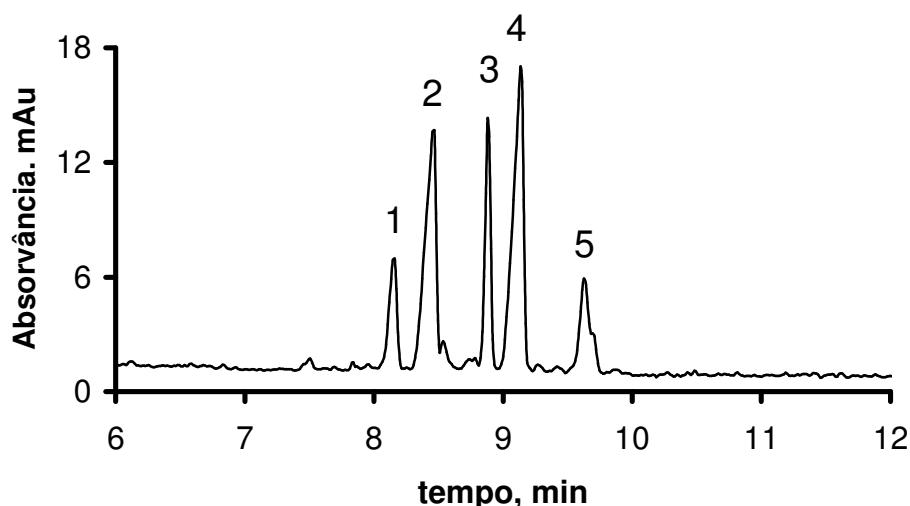
O experimento 15 ultrapassou o valor de referência e o 8 chegou próximo à ele, como se sabe, o ALN e o ADH não são os únicos  $\omega$ -3 presentes na amostra, logo, a soma da massa destes ácidos não deveria se aproximar tanto do valor de

referência. Além disso, a concentração do AOL para os experimentos 8 e 15, bem como para o 18 estão muito altas, discrepantes em relação aos outros experimentos, por isso os três foram descartados.

Os experimentos 2, 12, 13 e 14 concordam entre si quanto aos resultados para os AG  $\omega$ -3, como também para os outros ácido. Dentre estes experimentos descartou-se o que gastava mais solvente, experimento 12. E dentre os que restaram, escolheu-se o que apresentou menor tempo de extração, ou seja, aquele onde não foi necessária a adição de solução salina, experimento 2.

Após a implementação das curvas de calibração com padrões, obtenção dos fatores de resposta e verificação da linearidade do método proposto, além do estudo a respeito do procedimento de extração, amostras de ovos enriquecidos foram analisadas.

Duas gemas de ovos enriquecidos foram pesadas e misturadas e as amostras preparadas em três réplicas autênticas, ou seja, foram feitas três extrações da mesma amostra seguindo o procedimento de extração do ensaio 2 do planejamento fatorial misto, já descrito. Foram feitas as diluições necessárias e o extrato foi dopado com 0,057mg/g de padrão interno, mesma concentração utilizada na construção da curva da calibração.



**Figura 9.10 :** Eletroferograma da amostra de ovo enriquecido, 1 – PI, 2 – AOL, 3 – ADH, 4 – ALI e 5 – LNA. Condições da análise: capilar de 75 $\mu$ m de diâmetro interno, 360 $\mu$ m de diâmetro externo, 48,5cm de comprimento total e 40,0cm de comprimento efetivo, injeção 5,0s a 12,5mbar, detecção direta em 200nm, voltagem 27KV, temperatura 27°C, 12,0mmol/L de Brij, 12,0mmol/L de TBS, 33% de MeOH e 17% de ACN.

Como a amostra foi dopada com PI foram observados cinco picos e por adição de padrão pode-se comprovar que os picos eram relativos ao AEL (PI), AOL, ALI, ALN e ADH respectivamente.

Para os quatro AG que foram detectados na amostra foi possível calcular o limite de detecção, o limite de quantificação e a precisão (SKOOG, 2006; ANVISA, 2003):

**Tabela 9.7** – Resultados da quantificação dos AG na amostra de ovo enriquecido.

Analito	Concentração na amostra (n=3)	LD <sup>a</sup>	LQ <sup>a</sup>	CV% <sup>b</sup>
C18:1	8912,83 ± 38,18	2,05	6,83	0,11
C18:2	3235,33 ± 40,92	0,58	1,93	0,31
C18:3	597,13 ± 9,70	0,35	1,16	0,67
C22:6	426,28 ± 7,35	0,11	0,38	0,35

<sup>a</sup> – mg/100g; <sup>b</sup> – CV values of migration times for sample (n = 10).

## 10 – CONCLUSÕES

Foi proposta deste trabalho a otimização de metodologia alternativa por ECZ capaz de diferenciar ovos comuns de ovos enriquecidos sob detecção direta por UV-Vis. Estudos da composição do eletrólito foram realizados com o intuito de se alcançar a separação do par crítico ALN:AEP. No sentido de auxiliar e orientar a execução dos experimentos, ferramentas da Quimiometria foram utilizadas.

Após ter sido obtida a separação do par crítico, modelos de previsão foram implementados e testados estatisticamente, para só então ser utilizado na quantificação dos analitos nas amostras.

O presente trabalho comprova o potencial da ECZ para a análise de ácidos graxos insaturados por detecção direta no UV-Vis.

A metodologia otimizada apresenta baixo custo e curto tempo de análise se comparada com a técnica oficial, apresenta também boa frequência analítica, cerca de cinco injeções por hora, além disso, não necessita de passos de derivatização no preparo da amostra e a análise de seus resultados são de fácil interpretação.

O método pode ser utilizado como ferramenta auxiliar, atuando como técnica *screening*, ajudando desta forma às agências governamentais de monitoramento e identificação de fraude (Ministério da Agricultura, por exemplo), ou ainda, no controle de qualidade da produção, pois diferencia de forma clara ovos enriquecidos de ovos naturais.

Os resultados obtidos nesta dissertação resultou em publicação de um artigo na revista *Analytical Sciences* (Anexo) em maio deste ano e possui grande potencial para aplicação em outras amostras.

## **11 – PERSPECTIVAS**

A comparação da metodologia desenvolvida no presente trabalho com a técnica oficial de análise de AG, a CG, será ainda realizada. Por problemas devidos à importação de componentes do equipamento de EC, que ficou sem funcionamento por seis meses ao longo do desenvolvimento deste trabalho, é que esta etapa do trabalho não pode ser concluída a tempo.

Além da comparação da metodologia otimizada com a CG, pretende-se também aplicar o método à amostras alimentícias como margarinas, óleos vegetais e peixe enlatado, além de utilizá-la na determinação de trans total também em amostras alimentícias.

## 12 – REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução RE n.899, de 29 de maio de 2003. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm) Acesso em 23 de março de 2011.

ALTRIA, K. D. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. *Journal of Chromatography A*, (1999), 856, 443-463.

ALTRIA, K. D., ELDER, D. Overview of the status and applications of capillary electrophoresis to the analysis of small molecules. *Journal of Chromatography A*, (2004), 1023, 1-14.

BAKER, D. R. *Capillary Electrophoresis*. Ed. Interscience, 1995.

BALESTEROS, M. R., TAVARES, M. F. M., RIBEIRO, S. J. L., POLACHINI, F. C., MESSADDEC, Y., OLIVEIRA, M. A. L. Determination of olive oil acidity by CE. *Electrophoresis*, (2007), 28, 3731-3736.

BANNORE, Y. C., CHENAULT, K. D., MELOUK, H. A. Capillary electrophoresis of some free fatty acids using partially aqueous electrolyte systems and indirect UV detection. Application to the analysis of oleic and linoleic acids in peanut breeding lines. *Journal of Separation Science*, (2008), 31, 2667- 2676.

BENATTI, A., PELUSO, G., NICOLAI, R., CAVANI, M. Polyunsaturated fatty acids: biochemical, nutritional and epigenetic properties. *Journal of the American College of Nutrition*, (2004), 28, 281-302.

BIER, M. *Electrophoresis: Theory, methods and applications.*, Ed. New York: Academic Press Inc, 1959.



BOHLIN, M. E., ÖHMAN, M., HAMBERG, M., BLOMBERG, L. G. Separation of conjugated trienoic fatty acid isomers by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, (2003), 985, 471-478.

BRONDZ, I., Development of fatty acids analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, (2002), 465, 1-37.

BROWNE, R. W., ARMSTRONG, D. HPLC Analysis of Lipid-derived Polyunsaturated Fatty Acid Peroxidation Products in Oxidatively Modified Human Plasma. *Clinical Chemistry*, (2000), 46, 829–836

CARDOZO, K. H. M., OLIVEIRA, M. A. L., TAVARES, M. F. M., COLEPICOLO, P., PINTO, E. Daily oscillation of fatty acids and malondialdehyde in the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*. *Aquatic Insects*, (2002), 33, 371-382.

CARPENTER, D. M., NGEH-NGWAINBI, J., LEE, S. Lipid Analysis. *Methods of analysis for nutritional labeling*, AOAC International, 1993.

CASTRO, P. M., BARRA, M. M., RIBEIRO, M. C. C., PIMENTEL, S. A.; SILVA, S. A., OLIVEIRA, M. A. L. Total trans fatty acid analysis in spreadable cheese by capillary zone electrophoresis. *Journal. Agricultural Food Chemistry*, (2010), 58,1403-1409.

CHERIAN, G., LI, S. X., SIM, S. J. Dietary  $\alpha$ -Linolenic Acid and Laying Hen Strain: Fatty Acids of Liver, Adipose Tissue, White Meat, Dark Meat, and Egg Yolk. *Journal Agricultural Food Chemistry*, (1995), 43, 2553-2559.

COLLINS, V. P., CANTOR, A. H., PESCATORE, A. J., STRAW, M. L., FORD, M. J. Pearl Millet in Layer Diets Enhances Egg Yolk n-3 Fatty Acids. *Poultry Science*, (1997), 76, 326-330.

CROTTI, A. E. M., VESSECCHI, R., LOPES, J. L. C., LOPESET, N. P., Electrospray ionization mass spectrometry: Chemical processes involved in the ion formation from low molecular weight organic compounds. *Quimica Nova*, (2006), 29, 287-292.

CURI, R., MIYASAKA, C. K., PROCÓPIO, J. Entendendo a Gordura: Os ácidos graxos. Ed. Manole, 2002.

DANZER, K., CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998). Pure and Applied Chemistry, (1998), 70, 993-1014.

DELMONTE, P., RADER, J. I. Evaluation of gas chromatographic methods for the determination of trans fat acids. Analytical and Bioanalytical Chemistry, (2007), 389, 77-85.

DRANGE, E., LUNDANES, E. Determination of long-chained fatty acids using non aqueous capillary electrophoresis and indirect UV detection. Journal of Chromatographic, (1997), 771, 301-309.

ERIM, F. B., XU, X., KRAAK, J. C. Application of micellar electrokinetic chromatography and indirect UV detection for the analysis of fatty acids. Journal of Chromatography A, (1995), 694, 471-479.

FARIA A. F., de SOUZA, M. V.N., OLIVEIRA, M. A. L. Validation of Capillary Zone Electrophoresis Method for the Determination of Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin and Ofloxacin in Pharmaceutical Formulations. Journal of the Brazilian Chemical Society, (2008), 19, 389-396.

FOLCH, J., LESS, M., STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. Journal of Biological Chemistry (1957), 226, 497-509.

GOLAY P. A., GIUFFRIDA F., DIONISI F., DESTAILLATS F. Streamlined Methods for the Resolution and Quantification of Fatty Acids Including Trans Fatty Acid Isomers in Food Products by Gas Chromatography. Journal of AOAC International, (2009), 92, 1301-1309.

GONZÁLES, M. I. Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. *Interciencia* (2002), 27, 128-36.

GREEN, P., YAVIN, E. Elongation, desaturation, and esterification of essential fatty acids by fetal rat brain in vivo. *Journal of Lipid Research*,(1993), 34, 2099-2107.

GUASSI, S. A. D., SALGADO, J. M., LANNA, D. P. D. Perfil Lipídico de Ovos Desidratados com Ênfase no seu Teor de Gorduras Trans. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, (2008), 28, 247-250.

GUNSTONE, F. D. *The chemistry of oils and fats: sources, composition, properties and uses*. Ed. Boca Raton, 2004.

GUTNIKOV, G. Fatty acid profiles of lipid samples. *Journal of Chromatography B*, (1995), 671, 71-89

HARMAN, N. L., LEEDS, A. R., GRIFFIN, B. A. Increased dietary cholesterol does not increase plasma low density lipoprotein when accompanied by an energy-restricted diet and weight loss. *European Journal of Nutrition*, (2008), 47, 287–293.

HIRAYAMA, K. B., SPERIDIÃO, P. G. L., FAGUNDES-NETO, U. Ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa. *The Electronic Journal of Pediatric Gastroenterology, Nutrition and Liver Diseases*, (2006), 10 (3), 1–10.

HUANG, Z. B., LEIBOVITZ, H., LEE, C M., MILLAR, R. Effect of dietary fish oil on omega-3 fatty acid levels in chicken eggs and thigh flesh. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1990), 38 (3), 743-747.

HU, F. B., STAMPFER, M. J., ERIC B. RIMM, MANSON, J. E., ASCHERIO, A., COLDITZ, G. A., ROSNER, B, A., SPIEGELMAN, D., SPEIZER, F. E., SACKS, F. M., HENNEKENS, C. H., . WILLETT, W. C. *Journal American Medical Association*, (1999), 281, 1387-1394.

IUPAC-IUB. Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Nomenclature of Lipids. Recommendations 1976. World Wide Web version, prepared by G.P. Disponível: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid/>. Acesso em: 09 de janeiro de 2011.

IVERSON, S. J., LANG, S. L. C., COOPER, M. H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, (2001), 36, 1283-1287.

KRIS-ETHERTON, P. M., HARRIS, W. S., APPEL, L. J. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Journal of the American Heart Association*, (2002), 106, 2747-2757.

KUS, M. M. M., AUED-PIMENTEL, S., MANCINI-FILHO, J. Comparação de métodos analíticos para determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, (2009), 68, 12-20.

LIU, X., CAO, Y., CHEN, Y. Separation of conjugated linoleic acid isomers by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, (1995), 1095, 197-200.

MAJUMDER, K., WU, J. Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Simulated in Vitro Gastrointestinal Digestion of Cooked Eggs. *Journal Agricultural Food Chemistry*, (2009), 57, 471–477.

MAZALLI, M. R., BRAGAGNOLO, N. Validation of Two Methods for Fatty Acids Analysis in Eggs. *Lipids*, (2007), 42, 483-490.

MCNAMARA, D. J. The Impact of Egg Limitations on Coronary Heart Disease Risk: Do the Numbers Add Up? *Journal of the American College of Nutrition*, (2000), 19, 540S–548S.

MILINSK, M. C., MURAKAMI, A. E., GOMES, S.T.M., MATSUSHIDTA, M., SOUZA, N.E. Fatty acid profile of egg yolk lipids from hens fed diets rich in n-3 fatty acids. *Food Chemistry*, (2003), 83, 287-292.

MORAES, M. C. B., DO LAGO, C. L., Electrospray ionization mass spectrometry applied to study inorganic and organo-metallic species. *Química Nova*, (2003), 26, 556-563.

MORETTO, E., FETT, R. Óleos e Gorduras Vegetais: processamento e análises. Ed. UFSC, 1989.

MORRISON, R., BOYD, R. Química orgânica. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1981.

NAGLI, M., SMIDOVICNIK, A. Use of capillary gas chromatography for determining the hydrogenation level of edible oils. *Journal of Chromatographic A*, (1997), 767, 335-339.

NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS. R. E. Como fazer experimentos. Ed. Unicamp, 2007.

OLIVEIRA, M. A. L., MICKE, G. A., BRUNS, R., TAVARES, M.F.M. Factorial design of electrolyte systems for the separation of fatty acids by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatographic*, (2001), 924, 533-539.

(a) OLIVEIRA , M. A. L., SILVA, J. A. F., LAGO, C. L., TAVARES, M. F. M. Análise de ácidos graxos por eletroforese capilar utilizando detecção condutométrica sem contato. *Química Nova*, (2003), 26, 821-824.

(a) OLIVEIRA, M. A. L., SOLIS, V. S., GIOELLI, L. A., POLAKIEWICZ, B., TAVARES, M. F. M. Method development for the analysis of trans-fatty acids in hydrogenated oils by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, (2003), 24, 1641-1647.

OTIENO, A. C., MWONGEL, S. M. Capillary electrophoresis-based methods for the determination of lipids – A review. *Analytica Chimica Acta*, (2008), 624 (2), 163-174.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, São Paulo, (2004), 27, 771-780.

ROLDAN-ASSAD, R., GAREIL, P. Capillary zone electrophoretic determination of C2-C18 linear saturated free fatty acids with indirect absorbance detection. *Journal of Chromatography A*, (1995), 708, 339-350.

SAMMAN, S., KUNG, F. P., CARTER, L. M., FOSTER, M. J., AHMAD, Z. I., PHUYAL, J. L., PETOCZ, P. Fatty acid composition of certified organic, conventional and omega-3 eggs. *Food Chemistry*, (2009), 116, 911–914.

SHIMIZU, Y., ARAI, K., ISE, S., SHIMASAKI, H. Dietary fish oil for hens affects the fatty acid composition of egg yolk phospholipids and gives a valuable food with an ideal balance of n-6 and n-3 essential fatty acids for human nutrition. *Journal Oil Society*, (2001), 50 (10), 797-803.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S.R. *Fundamentos de Química Analítica*. Ed. CENGAGE, 2006.

SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B. *Química Orgânica*, v.2. Ed. LTC, 2006.

SOUZA, J. G., COSTA, F. G. P., QUEIROGA, R. C. R. E., SILVA, J. H. V., SCHULER, A. R. P., GOULART, C. C. Fatty Acid Profile of Eggs of Semi-Heavy Layers Fed Feeds containing Linseed Oil. *Brazilian Journal of Poultry Science*, (2008), 10, 37 – 44.

SUROWIEC, I., KAML, I., KENNDLER, E. Analysis of drying oils used as binding media for objects of art by capillary electrophoresis with indirect UV and conductivity detection. *Journal of Chromatography A*, (2004), 1024, 245-254.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. *Química Nova*, (1996), 19,173-181.

TAVARES, M. F. M., OLIVEIRA, M. A. L., JAGER, A. V., MORAES, E. P., FONSECA, F. N., TONIN, F. G., MICKE, G. A., SANTOS, M. R., KAMPEN, M. H. V., FUGIYA, N. M. Applications of capillary electrophoresis to the analysis of compounds of clinical, forensic, cosmetological, environmental, nutritional and pharmaceutical importance. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, (2003), 4, 281-290.

TESEDO, J.; BARRADO, E.; SANZ, M. A.; TESEDO, A.; ROSA, F., Fatty Acid Profiles of Processed Chicken Egg Yolks. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, (2006), 54, 6255-6260.

U.S. Patent, No. US005897890, 04/27/1999.

VALENZUELA, A. B., NIETO M. S. Acido docosahexaenoico (DHA) en el desarrollo fetal y en la nutrición materno-infantil. *Revista Médica de Chile* (2001), 129 (10), 1203-11.

VALENZUELA, A. B., NIETO S.K. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importância em el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Revista Chilena de Pediatría*, (2003), 74, 149-157.

VEUTHEY, J. L., Capillary electrophoresis in pharmaceutical and biomedical analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2005), 381, 93-95.

VIEIRA, K. M., Aplicação dos Processos Oxidativos, Redutivos e (Foto)Eletroquímicos na Degradação de Fármacos em Meio Aquoso. Tese de doutorado, Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

ZEMDEGS, J. C. S., PIMENTEL, G. D., PRIEL, M. R., Ácidos graxos ômega 3 e tratamento da esquizofrenia. *Revista de Psiquiatria Clínica*, (2010), 37 (5), 223-227.

# APÊNDICE – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ANALYTICAL SCIENCES

ANALYTICAL SCIENCES MAY 2011, VOL. 27  
2011 © The Japan Society for Analytical Chemistry

541

## Analysis of Omega 3 Fatty Acid in Natural and Enriched Chicken Eggs by Capillary Zone Electrophoresis

Brenda Lee Simas PORTO,\* Marcus Vinicius Nora de SOUZA,\*\* and  
Marcos Augusto Leal de OLIVEIRA\*†

\*Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora,  
Cidade Universitária CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brazil

\*\*Instituto de Tecnologia em Fármacos-Far Manguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, CEP 21041-250,  
Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Qualitative differentiation between natural and enriched chicken eggs through omega ( $\omega$ ) 3 fatty acid profiles by capillary zone electrophoresis (CZE) under direct UV detection at 200 nm is proposed. The electrolyte background consisted of 12.0 mmol L<sup>-1</sup> tetraborate buffer (pH 9.2) mixed with 12.0 mmol L<sup>-1</sup> Brij 35, 17% acetonitrile (ACN) and 33% methanol (MeOH). Omega 3 fatty acid profile in chicken egg samples were analyzed by CZE system and confirmed by single-quadrupole mass spectrometry with an electrospray ionization probe set to negative ionization mode after sample preparation by the Folch method. The results showed that  $\omega$  fatty acid profiles analyzed by the CZE approach can be used to chemical markers to monitor fraud, presenting simplicity, short analysis time (10 min) and low cost as advantages.

(Received April 17, 2010; Accepted March 3, 2011; Published May 10, 2011)

### Introduction

Eggs are considered essential for a balanced diet due to their high protein composition associated with a wide variety of essential amino acids, fatty acids, vitamins and minerals. Thus, eggs ingestion should be encouraged since it can help control body weight, maintaining muscle strength and reduce loss of muscle mass, improve vision and brain function and support a healthy.<sup>1-5</sup>

Omega 3 fatty acid (Fig. 1) eating has several health benefits by helping to reduce triglyceride and total cholesterol blood levels. It is also used as an allergy mediator in inflammatory processes; it decreases blood pressure, reduces platelet aggregation and increases blood flow. Furthermore, the acids are essential to the human body, because we do not produce them naturally.<sup>1-5</sup> In the search for a healthier diet, modified eggs have to be produced by the addition of polyunsaturated fatty acids from the omega 3 families and vitamin E by changing the hens' diet. In order to produce omega 3 eggs, the chickens need to receive a different diet. A ton of feed must contain 560 kg of corn, 277 kg of soybean bran, 53.0 kg of meat bran, 83.0 kg of limestone, 3.00 kg of sodium chloride, 20.0 kg of linseed oil and 4.00 kg of vitamin supplement.<sup>6,7</sup>

In general, analyses of fatty acids in enriched chicken egg samples are performed by gas chromatography (GC). However, more volatile methyl or trimethylsilyl ester derivatives are commonly required, especially for the longer chain fatty acids solutes, although specifically designed columns that tolerate high temperatures are also available and can be used for the

analysis of fatty acid in a flame ionization detector. GC is highly efficient, but analysis time is about 40 min becoming longer in analyses of a large amount of sample.<sup>8-11</sup> Thus, the use of a complementary analytical technique able to perform screening of a large amount of sample in a rapid and cheap way can be useful.

In recent years, capillary electrophoresis (CE) has been strongly considered for the analysis of fatty acids in food, presenting short analysis time, absence of derivatization step in

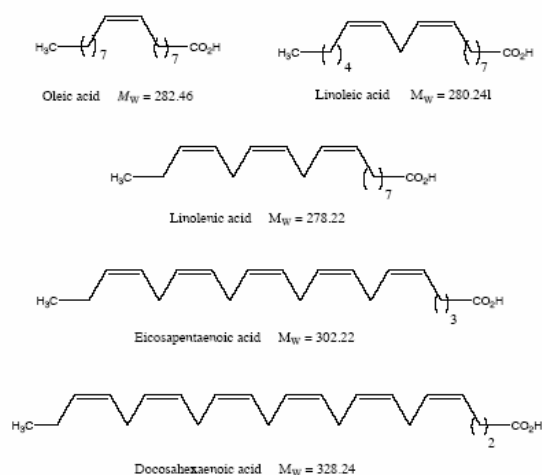


Fig. 1 Omega fatty acids chemical structures.

† To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: marcone.oliveira@ufjf.edu.br



sample preparation and simplicity as advantages.<sup>12</sup> Traditionally, fatty acids are a group of compounds containing a saturated or unsaturated hydrocarbon chain, consisting of more than 10 carbons and a carboxylic group. In general, these species present  $pK_a$  about 4.5, low solubility in water and low UV absorbance. The fatty acid analysis by capillary electrophoresis takes into account the following: the use of higher concentrations of organic solvents such as acetonitrile and methanol in order to avoid micelle formation among fatty acids; pH buffer above 7.0 to promote dissociation of the carboxylic group and thereby to promote analysis in the anionic form; the use of a chromophore agent in the electrolyte system or a chromophore buffer to promote UV indirect detection; and the use of an additive to help in the separation among geometric isomers such as *cis* or *cis-trans* pairs by using cyclodextrins or non ionic surfactants. However, mono or poly-unsaturated fatty acids (*cis* or *trans* ones) present acceptable sensitivity at 200 nm for direct UV detection. Due to the importance of these fatty acids in human diet and the possibility of economic fraud, this work has as the main objective to apply CE as an auxiliary analytical tool able to distinguish between enriched and natural eggs using the  $\omega$  fatty acid profile as a chemical marker.<sup>13-23</sup> Such fraud can be serious, since no visual difference is found between enriched and natural chicken eggs and, according to a price survey in the local market, a dozen enriched eggs can cost up to 2.0 times the price paid for a dozen natural eggs.

## Experimental

### Chemicals and solutions

All reagents used were of analytical grade. Water was purified by a deionization (Milli-Q system: Millipore, Bedford, MA). Methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), chloroform, sodium tetraborate ( $Na_2B_4O_7$ ) and sodium hydroxide (NaOH) were purchased from Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Polyoxyethylene 23 lauryl ether (Brij 35<sup>®</sup>) was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Standard oleic (C18:1c), linoleic (C18:2cc), linolenic (C18:3ccc) and eicosapentaenoic (C20:5ccccc) acids were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Individual 20.0 mmol L<sup>-1</sup> fatty acid stock solutions were prepared by dissolving appropriate amounts of the selected standards in methanol: such solutions were stored in a freezer until analysis. A mixture of all standards was prepared at 0.3, 0.1, 0.1, 0.05 and 0.05 mmol L<sup>-1</sup> for oleic (C18:1c), linolenic (C18:2cc), linolenic (C18:3ccc), eicosapentaenoic (C20:5ccccc) and docosahexaenoic (C22:6cccccc) acids, respectively, by appropriate dilution in MeOH.

The optimized working electrolyte solution was prepared by appropriate dilution of stock solutions and incorporation of solvents. The background electrolyte consisted of 12.0 mmol L<sup>-1</sup> tetraborate (TBS) buffer (pH 9.2) containing 12.0 mmol L<sup>-1</sup> Brij 35, 17% ACN and 33% MeOH.

### Sample preparation

Natural and omega-3-enriched chicken eggs were purchased from the local market. Approximately 1.00 g of yolk of each sample was weighed separately and lipid extraction was done according to a procedure well established in the literature.<sup>24</sup> The sample residues were saponified separately with 2.5 mL of a methanolic NaOH solution (0.5 mol L<sup>-1</sup>) at 75–80°C for 20 min in an aqueous heating bath in order to make hydrolysis for analysis of the fatty acids released from glycerol. After that, the material resultants from saponification were diluted in methanol in a volumetric flask of 10.00 mL. Finally, 25.0  $\mu$ L of

Table 1 Fractional factorial matrix  $2^{5-1}$  with encoded variables

Experiment	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub> (12345)
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1

1. TBS (mmol/L): (-1) 8.0; (+1) 12.0.
2. Brij (mmol/L): (-1) 8.0; (+) 12.0.
3. Positive voltage (kV): (-1) 23.0; (+) 27.0.
4. Temperature (°C): (-1) 23.0; (+) 27.0.
5. MeOH/ACN (%): (-1) 23.0/27.0; (+) 27.0/23.0.

each sample was diluted in a volumetric flask of 1.00 mL before injection into the CE equipment. The procedures were performed in genuine triplicate.

### Instrumentation

CZE optimization experiments were conducted in a CE system (HP3d CE, Agilent Technologies, Palo Alto, USA) equipped with a DAD set at 200 nm, a temperature control device maintained at 27°C, and data acquisition and treatment software (HP ChemStation, rev A.06.01). Samples were hydrodynamically injected (25 mbar 7.5 s) and the electrophoretic system was operated under normal polarity and constant voltage conditions of +27 kV. In the experiments were performed using a fused-silica capillary (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) 48.5 cm (40 cm effective length)  $\times$  50 or 75  $\mu$ m i.d.  $\times$  375  $\mu$ m o.d. was used.

Samples were analyzed using a Micromass (Manchester, UK) ZQ 2000 single-quadrupole mass spectrometer with an electrospray ionization probe set to negative ionization mode. The capillary voltage was set to 2.5 kV, and the sample cone voltage was -30 V. The desolvation temperature was set at 150°C. The desolvation gas (nitrogen) was set to 160 l/h, the nebulizer gas (nitrogen) at 80 psi. and the cone gas (nitrogen) at 50 l/h.

### Analytical procedures

When a new capillary was used, it was conditioned by a pressure flush of 1.00 mol L<sup>-1</sup> NaOH solution (30 min), deionized water (15 min) and electrolyte solution (15 min). In between runs, the capillary was replenished with 0.20 mol L<sup>-1</sup> NaOH solutions (2 min), deionized water (2 min) and fresh electrolyte solution (3 min, pressure flush).

## Results and Discussion

Oliveira *et al.*<sup>12</sup> developed a methodology using a tetraborate buffer pH 9.2 combined with methanol (25% v/v), acetonitrile (25% v/v) and Brij 35 as electrolyte system. This and achieved

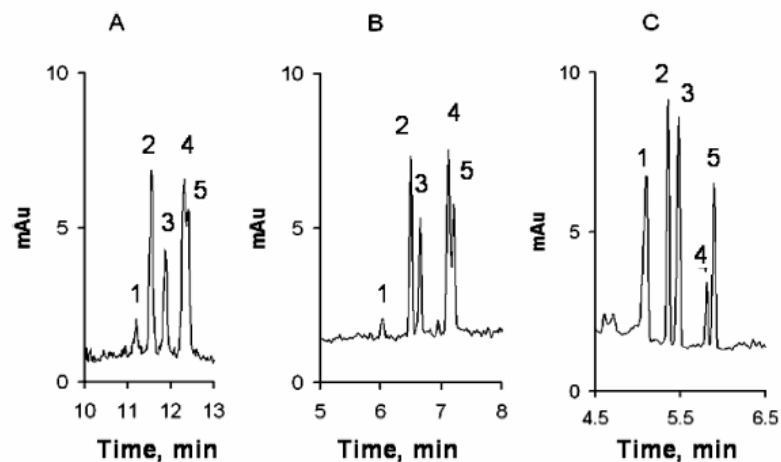


Fig. 2 Electropherograms showing BGE optimization for standard mixture: (A) electropherogram obtained using preview methodology, (B) electropherogram obtained for the best result found in fractional factorial design  $2^{5-1}$ , (C) electropherogram showing the optima optimized conditions. 1, C18:1c; 2, C18:2cc; 3, C22:6cccccc; 4, C18:3ccc; 5, C20:5cccc. (A) 10 mmol L<sup>-1</sup> of tetraborate buffer pH 9.2 mixed with 10.0 mmol L<sup>-1</sup> of Brij 35, 25% ACN and 25% MeOH. Operational conditions: injection, 25 mBar, 7.5 s; voltage, +25 kV; temperature, 25°C;  $\lambda = 200$  nm. Capillary dimensions: 48.5 cm total (40 cm effective length)  $\times$  50  $\mu$ m i.d.  $\times$  375  $\mu$ m o.d. (B) 12 mmol L<sup>-1</sup> of tetraborate buffer pH 9.2 mixed with 12.0 mmol L<sup>-1</sup> of Brij 35, 27% ACN and 27% MeOH. Operational conditions: injection, 25 mBar, 7.5 s; voltage, +27 kV; temperature, 27°C;  $\lambda = 200$  nm. Capillary dimensions: 48.5 cm total (40 cm effective length)  $\times$  50  $\mu$ m i.d.  $\times$  375  $\mu$ m o.d. (C) 12 mmol L<sup>-1</sup> of tetraborate buffer pH 9.2 combined with 12.0 mmol L<sup>-1</sup> of Brij 35, 17% ACN and 33% MeOH. Operational conditions: injection, 25 mBar, 7.5 s; voltage, +27 kV; temperature, 27°C;  $\lambda = 200$  nm. Capillary dimensions: 48.5 cm total (40 cm effective length)  $\times$  50  $\mu$ m i.d.  $\times$  375  $\mu$ m o.d.

Table 2 Experimental trial for organic solvent proportion optimization

Experiment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
% MeOH	33	31	29	27	25	23	21	19	17
% ACN	17	19	21	23	25	27	29	31	33

partial separation of C18:2cc ( $\omega_6$ ), C18:3ccc ( $\omega_3$ ), C20:5cccc ( $\omega_3$ ) and C22:6cccccc ( $\omega_3$ ) in fish oil and algae samples after a simple saponification procedure using 0.5 mol L<sup>-1</sup> of NaOH dissolved in methanol.<sup>12,19,20</sup> However, when the method was used for fatty acid standard separation, the co-migration between C18:3ccc ( $\omega_3$ ) and C20:5cccc ( $\omega_3$ ) was observed, according to Fig. 2A. In order to improve the separation between critical pair C18:3ccc ( $\omega_3$ )/C20:5cccc ( $\omega_3$ ), a fractional factorial design  $2^{5-1}$  (Table 1) having as factors sodium tetraborate (buffer), Brij 35 (non-ionic surfactant used for *cis* homologues separation), voltage, temperature and methanol and acetonitrile proportion (helps fatty acids solubilization inside back ground electrolyte (BGE)) was performed. The generating relation  $I = 12345$  was proposed because the main effects were confused with fourth order interactions (low significance), and there is no confusion between the second order interactions. Other experimental conditions such as capillary dimensions (48.5 cm total (40 cm effective length)  $\times$  50  $\mu$ m i.d.  $\times$  375  $\mu$ m o.d.), injection (25 mBar, 7.5 s), and wavelength ( $\lambda = 200$  nm) were maintained fixed.

In the present case, the response evaluated for the experimental set was the critical pair separation C18:3ccc ( $\omega_3$ )/C20:5cccc

( $\omega_3$ ). The experiment 16 (Fig. 2B) was considered the better result inside the experimental set performed, in spite of not achieving the full critical pair separation. However, the results obtained from the experimental set was possible to realize that variation into solvent proportion (MeOH and ACN) should be investigated. Therefore, a new experimental set was performed as described in Table 2, maintaining constant other variables such as TBS, Brij 35, voltage and temperature according to the values fitted in experiment 16.

Among the nine experiments carried out, the experiment 1 presented the best results (Fig. 2C). In order to verify the separation repeatability, we prepared the BGE in five genuine replicate and the standard was injected three times in each BGE. We verified that the baseline separation was achieved, but the migration time presented variations (not shown). Thus, in order to significantly reduce the injection-related imprecision<sup>25,26</sup> and to ensure better reproducibility and greater control over the sample amount injected, one should prefer the use of an internal standard in the quantitative analysis. In this case, elaidic acid C18:1t was chosen as an internal standard because is not present in the sample and will migrate well separated from the other fatty acids of interest.

#### Response factor ( $R_F$ ) calculation and omega fatty acid determination

The proposal of omega fatty acid quantification in the enriched eggs was based on a statistical study including the response factor ( $R_F$ ) calculation by using C18:1t as the internal standard (IS).<sup>13,15</sup> In order to calculate  $R_F$ , we obtained four analytical curves taking into account a random experiment in genuine triplicate using an C18:1c ( $\omega_9$ ), C18:2cc ( $\omega_6$ ), C18:3ccc ( $\omega_3$ )

and C22:6cccccc ( $\omega$ 3) standard solution with varying concentrations and fixed elaidic acid (IS) concentration at 0.057 mg g<sup>-1</sup>, by means of the least-squares method (LSM) through a priori test hypothesis (Eq. (1)). Table 3 shows the values used in the regression model.

The regression model diagnosis<sup>13,15,27,28</sup> was satisfactory with no lack of fit ( $F_{\text{lack of fit}}$ ) because the values of  $F_{0.05,3,10}$  and  $F_{0.05,3,8}$  calculated were lower than  $F_{0.05,3,10}$  critical (3.71) for C18:1c, C18:3ccc and C22:6cccccc and  $F_{0.05,3,8}$  critical (4.07) for C18:2cc according to the data in Table 4. Besides, the regression significance values ( $F_{\text{significance}}$ ,  $F_{\text{sig}}$ ) were acceptable, because all  $F_{\text{sig}}$  calculated values are at least five times higher than  $F_{0.05,1,13}$  critical and  $F_{0.05,1,11}$  critical equal to 4.67 and 4.84, respectively.

$$F_{\text{calc}} = \frac{s_{\text{yxa}}^2}{s_{\text{y}}^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p-2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^{m_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / (m-p)} \quad (1)$$

The quantification procedure involved the calculation of  $R_F$ , as described by the following mathematical expression:

$$\frac{A_x}{[X_{\text{IOFA}}]} = R_F \frac{A_{\text{IS}}}{[\text{IS}]} \quad (2)$$

Here  $A_x$  is the individual omega fatty acid area,  $[X_{\text{IOFA}}]$  the individual omega fatty acid concentration,  $R_F$  the response

factor,  $A_{\text{IS}}$  the elaidic acid peak area and  $[\text{IS}]$  the elaidic acid concentration at 0.057 mg g<sup>-1</sup>.

Since the regression model diagnosis was satisfactory, the slope can be used as a response factor in Eq. (2), and as long as the internal standard C18:1t at 0.057 mg g<sup>-1</sup> is used, the concentration (mg g<sup>-1</sup>) of individual omega fatty acids remains hidden. Individual omega fatty acid in the sample was carried out through Eq. (3), obtained after rearranging Eq. (2):

$$[X_{\text{IOFA}}] = \frac{A_x [\text{C18:1t}] d 100}{A_{\text{IS}} R_F} \quad (3)$$

where  $A_x$  is the area of individual omega fatty acids in the sample,  $d$  the dilution factor,  $A_{\text{IS}}$  the elaidic acid area,  $R_F$  the response factor (fitted model slope) and  $[\text{C18:1t}]$  IS concentration at 0.057 mg g<sup>-1</sup>.

Sample analysis

In order to apply the developed methodology to analyze real sample, we tested the direct fatty acid saponification in yolk eggs, but it did not achieve good results due to the large protein amount present. Therefore, a study involving sample preparation was necessary. After careful literature review and some preliminary trials (not shown), we could conclude that the Folch's method used for lipid extraction was the most suitable one for fatty acid analysis in eggs.<sup>6,10,11,21,24</sup> By looking at the electropherograms obtained from egg sample analysis, we established that the majority of the fatty acids found for chicken natural eggs were C18:1c ( $\omega$ 9) and C18:2cc ( $\omega$ 6), while for enriched chicken eggs they were C18:1c ( $\omega$ 9), C18:2cc ( $\omega$ 6), C18:3ccc ( $\omega$ 3) and C22:6cccccc ( $\omega$ 3) (Fig. 4). Since the electrophoretic run was performed under normal polarity and counter electrosmotic mode, the analytes were present in the anionic form (all fatty acids containing one negative charge at pH -9.2). Fatty acid migration time in the samples was confirmed by spiking with standard samples (not shown). A complementary study by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was performed in order to detect the unequivocal presence of  $\omega$  fatty acids in samples through the mass/charge ( $m/z$ ) attribution (Fig. 3). LC-MS/MS obtained from enriched chicken eggs showed the signals of oleic, linoleic, linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids. In the positive ion mode there is a signal intensity with  $m/z$  at 302.2 that indicates sodium adduct ion of linolenic acid (C18:3ccc  $\omega$ 3) and relative intensity of 20%. In the negative ion mode, the peaks of the other four acids can be identified: oleic (C18:1c  $\omega$ 9)  $m/z$  at 171.1 (after double bond breaking) relative intensity 10%; linoleic (C18:2cc  $\omega$ 6)  $m/z$  at 279.3 (after loss of H<sup>+</sup>) relative intensity 40%; docosahexaenoic acid (C22:6cccccc  $\omega$ 3)  $m/z$  at 281.4 relative intensity 75% (after decarboxylation and loss of H<sub>2</sub>); and eicosapentaenoic acid (C20:5cccccc  $\omega$ 3)  $m/z$  at 255.3 relative intensity 80% (after decarboxylation and loss of H<sub>2</sub>).

Table 3 Values used for regression model implementation

Fatty acid	$[X_{\text{IOFA}}]/[\text{IS}]$	Signal 1st replicate	Signal 2nd replicate	Signal 3rd replicate
C18:1	0.65	0.54	0.53	0.59
	0.91	0.69	0.75	0.80
	1.30	1.03	0.92	0.93
	1.49	1.04	1.13	1.12
	1.90	1.34	1.44	1.30
C18:2	0.38	1.33	0.82	0.92
	0.64	1.45	1.77	1.90
	0.88	2.39	1.94	2.08
	1.31	—	—	3.13
	1.60	3.45	3.78	3.45
C18:3	0.30	1.00	1.23	1.28
	0.49	1.93	1.67	1.91
	0.70	2.85	2.95	2.67
	0.85	4.17	3.20	2.53
	1.07	3.68	3.99	4.17
C22:6	0.07	0.54	0.44	0.43
	0.21	1.43	1.21	1.36
	0.39	2.52	2.50	2.39
	0.51	4.41	3.44	2.95
	0.65	3.71	4.60	4.52

Table 4 Statistical results for enriched egg samples quantification

Curve	Slope	Intercept	$r$	$F_{\text{sig}}$	$F_{\text{lack of fit}}$	$R_F$	Amount found <sup>a</sup> ( $n = 3$ )	LOD <sup>a</sup>	LOQ <sup>a</sup>	CV <sub>mt</sub> , % <sup>b</sup>
C18:1	0.15 ± 0.04	0.64 ± 0.03	0.986	459.59	0.68	0.64	8912.83 ± 38.18	2.05	6.83	0.11
C18:2	0.31 ± 0.13	2.06 ± 0.13	0.979	254.52	1.01	2.06	3235.33 ± 40.92	0.58	1.93	0.31
C18:3	0.10 ± 0.26	3.69 ± 0.35	0.946	111.29	0.76	3.69	597.13 ± 9.70	0.35	1.16	0.67
C22:6	-0.04 ± 0.19	6.76 ± 0.47	0.970	209.35	1.15	6.76	426.28 ± 7.35	0.11	0.38	0.35

Fcritical<sub>sig</sub> 0.05,1,13 = 4.67 (C18:1, C18:3 and C22:6), Fcritical<sub>sig</sub> 0.05,1,11 = 4.84 (C18:2). Fcritical<sub>lack of fit</sub> 0.05,3,10 = 3.71 (C18:1, C18:3 and C22:6), Fcritical<sub>lack of fit</sub> 0.05,3,8 = 4.07 (C18:2). a. mg 100 g<sup>-1</sup>. b. CV values of migration times for sample ( $n = 10$ ). Operational condition as in Fig. 4.

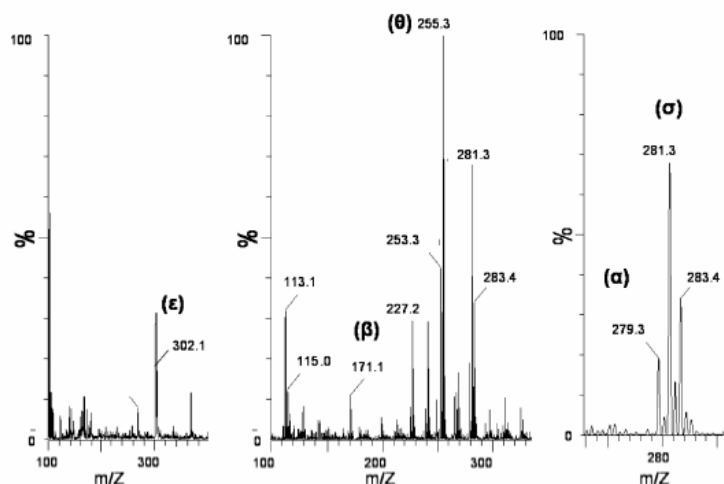


Fig. 3 Enriched egg samples mass spectra. (ε) C18:3ecc, (β) C18:1c, (θ) C20:5ccccc, (α) C18:2cc, (σ) C22:6ccccc.

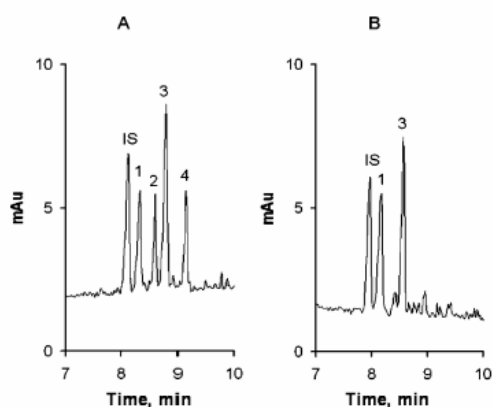


Fig. 4 Electropherograms obtained for (A) enriched and (B) natural egg samples. IS, C18:1t; 1, C18:1c; 2, C18:2cc; 3, C22:6ccccc; 4, C18:3ecc. BGE: 12 mmol L<sup>-1</sup> of tetraborate buffer pH 9.2 combined with 12.0 mmol L<sup>-1</sup> of Brij 35, 17% ACN and 33% MeOH. Operational conditions: injection, 25 mBar, 5.0 s; voltage, +27 kV; temperature, 27°C;  $\lambda = 200$  nm. Capillary dimensions: 48.5 cm total (40 cm effective length)  $\times$  75  $\mu$ m i.d.  $\times$  375  $\mu$ m o.d.

However, according to a literature report,<sup>10</sup> the majorities are the first four, *i.e.*, even when the five are present in the sample, the latter was not detected with the proposed method. Table 4 shows the statistical results obtained for omega fatty acids quantification in enriched eggs samples, taking into account the use of an internal standard in the quantitative analysis and Fig. 4 electropherogram for visual differentiation between enriched and natural eggs.

## Conclusions

The present work showed the potential of CZE for analysis in chicken eggs under direct UV detection. The optimized CZE methodology presents low cost, short analysis time, no

derivatization steps for sample preparation and simple data interpretation as advantages. Therefore, the methodology applied was demonstrated to be suitable as an alternative analytical technique of rapid primary exploratory analysis able to identify differences between enriched and natural chicken eggs with high rate of analysis by hour which can be useful for government (Ministry of Agriculture) or supervisory agencies to monitor fraud.

## Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-476386/2007-1 and 300593/2008-2), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais of Brazil (FAPEMIG-CEX-APQ 1906-502/07, CEX APQ 01837/08, CEX-PPM 00326/09) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for fellowships and financial support.

## References

1. N. L. Harman, A. R. Leeds, and B. A. Griffin, *Eur. J. Nutr.*, **2008**, *47*, 287.
2. K. Majumder and J. Wu, *J. Agric. Food Chem.*, **2009**, *57*, 471.
3. C. A. Martin, V. V. de Almeida, M. R. Ruiz, J. E. L. Visentainer, M. Matsushita, N. E. de Souza, and J. V. Visentainer, *Rev. Nutr.*, **2006**, *19*, 761.
4. D. J. McNamara, *J. Am. Coll. Nutr.*, **2000**, *19*, 540S.
5. Y. Shimizu, K. Arai, S. Ise, and H. Shimazaki, *J. Oleo Sci.*, **2001**, *50*, 797.
6. J. Tesedo, E. Barrado, M. A. Sanz, A. Tesedo, and F. Rosa, *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, *54*, 6255.
7. S. E. Scheideler, U. S. Patent, **1999**, 5897890.
8. R. Curi, C. Pompeia, C. K. Miyasaka, and J. Procópio, "Entendendo a Gordura—Os Ácidos Graxos", **2002**, Manole, São Paulo.
9. V. P. Collins, A. H. Cantor, A. J. Pescatore, M. L. Straw, and M. J. Ford, *Poultry Sci.*, **1997**, *76*, 326.

10. M. R. Mazzalli and N. Bragagnolo, *Lipids*, **2007**, *42*, 483.
11. S. Samman, F. P. Kung, L. M. Carter, M. J. Foster, Z. I. Ahmad, J. L. Phuyal, and P. Petocz, *Food Chem.*, **2009**, *116*, 911.
12. M. A. L. Oliveira, A. V. Jager, E. P. Moraes, F. N. Fonseca, F. G. Tonin, G. A. Micke, M. F. M. Tavares, M. R. Santos, M. H. V. Kampen, and N. M. Fujiya, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2003**, *14*, 281.
13. M. R. Balestros, M. F. M. Tavares, S. J. L. Ribeiro, F. C. Polachini, Y. Messaddec, and M. A. L. Oliveira, *Electrophoresis*, **2007**, *28*, 3731.
14. Y. C. Bannore, K. D. Chenault, and H. A. Melouk, *J. Sep. Sci.*, **2008**, *31*, 14, 2667.
15. P. M. Castro, M. M. Barra, M. C. C. Ribeiro, S. A. Pimentel, S. A. Silva, and M. A. L. Oliveira, *J. Agric. Food Chem.*, **2010**, *58*, 1403.
16. E. Drange and E. Lundanes, *J. Chromatogr. A*, **1997**, *771*, 301.
17. M. A. L. Oliveira, G. A. Micke, R. Bruns, and M. F. M. Tavares, *J. Chromatogr. A*, **2001**, *924*, 533.
18. M. A. L. Oliveira, V. S. Solis, L. A. Gioelli, B. Polakiewicz, and M. F. M. Tavares, *Electrophoresis*, **2003**, *24*, 1641.
19. K. H. M. Cardozo, M. A. L. Oliveira, M. F. M. Tavares, P. Colepicolo, and E. Pinto, *Aquat. Insect.*, **2002**, *33*, 371.
20. J. Collet and P. Gareil, *J. Chromatogr. A*, **1997**, *792*, 165.
21. G. Cherian, S. X. Li, and S. J. Sim, *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, *43*, 10, 2553.
22. M. A. L. Oliveira, J. A. F. Silva, C. L. Lago, and M. F. M. Tavares, *Quím. Nova*, **2003**, *26*, 6, 821.
23. A. C. Otieno and S. M. Mwangi, *Anal. Chim. Acta*, **2008**, *624*, 2, 163.
24. J. Folch, M. Less, and G. H. S. Stanley, *J. Biol. Chem.*, **1957**, *226*, 497.
25. K. D. Altria and H. Fabre, *Chromatographia*, **1995**, *40*, 313.
26. E. V. Dose and G. A. Guiochon, *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 1154.
27. A. F. Faria, M. V. de Souza, and M. A. L. Oliveira, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2008**, *19*, 389.
28. K. Danzer and L. A. Currie, *Pure Appl. Chem.*, **1998**, *70*, 993.

## ANEXO – TABELA F

**TABELA F : VALORES CRÍTICOS PARA UM TESTE UNILATERAL ( $\alpha = 0.05$ )**

$v_1 \backslash v_2$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40	60	120	$\infty$
1	161,4	199,5	215,7	224,6	230,2	234,0	236,8	238,9	240,5	241,9	243,9	245,9	248,0	249,1	250,1	251,1	252,2	253,3	254,3
2	18,51	19,00	19,16	19,25	19,30	19,33	19,35	19,37	19,38	19,40	19,41	19,43	19,45	19,45	19,46	19,47	19,48	19,49	19,50
3	10,13	9,55	9,28	9,12	9,01	8,94	8,89	8,85	8,81	8,79	8,74	8,70	8,66	8,64	8,62	8,59	8,57	8,55	8,53
4	7,71	6,94	6,59	6,39	6,26	6,16	6,09	6,04	6,00	5,96	5,91	5,86	5,80	5,77	5,75	5,72	5,69	5,66	5,63
5	6,61	5,79	5,41	5,19	5,05	4,96	4,88	4,82	4,77	4,74	4,68	4,62	4,56	4,53	4,50	4,46	4,43	4,40	4,36
6	5,99	5,14	4,76	4,53	4,39	4,28	4,21	4,15	4,10	4,06	4,00	3,94	3,87	3,84	3,81	3,77	3,74	3,70	3,67
7	5,59	4,74	4,35	4,12	3,97	3,87	3,79	3,73	3,68	3,64	3,57	3,51	3,44	3,41	3,38	3,34	3,30	3,27	3,23
8	5,32	4,46	4,07	3,84	3,69	3,58	3,50	3,44	3,39	3,35	3,28	3,22	3,15	3,12	3,08	3,04	3,01	2,97	2,93
9	5,12	4,26	3,86	3,63	3,48	3,37	3,29	3,23	3,18	3,14	3,07	3,01	2,94	2,90	2,86	2,83	2,79	2,75	2,71
10	4,96	4,10	3,71	3,48	3,33	3,22	3,14	3,07	3,02	2,98	2,91	2,85	2,77	2,74	2,70	2,66	2,62	2,58	2,54
11	4,84	3,98	3,59	3,36	3,20	3,09	3,01	2,95	2,90	2,85	2,79	2,72	2,65	2,61	2,57	2,53	2,49	2,45	2,40
12	4,75	3,89	3,49	3,26	3,11	3,00	2,91	2,85	2,80	2,75	2,69	2,62	2,54	2,51	2,47	2,43	2,38	2,34	2,30
13	4,67	3,81	3,41	3,18	3,03	2,92	2,83	2,77	2,71	2,67	2,60	2,53	2,46	2,42	2,38	2,34	2,30	2,25	2,21
14	4,60	3,74	3,34	3,11	2,96	2,85	2,76	2,70	2,65	2,60	2,53	2,46	2,39	2,35	2,31	2,27	2,22	2,18	2,13
15	4,54	3,68	3,29	3,06	2,90	2,79	2,71	2,64	2,59	2,54	2,48	2,40	2,33	2,29	2,25	2,20	2,16	2,11	2,07
16	4,49	3,63	3,24	3,01	2,85	2,74	2,66	2,59	2,54	2,49	2,42	2,35	2,28	2,24	2,19	2,15	2,11	2,06	2,01
17	4,45	3,59	3,20	2,96	2,81	2,70	2,61	2,55	2,49	2,45	2,38	2,31	2,23	2,19	2,15	2,10	2,06	2,01	1,96
18	4,41	3,55	3,16	2,93	2,77	2,66	2,58	2,51	2,46	2,41	2,34	2,27	2,19	2,15	2,11	2,06	2,02	1,97	1,92
19	4,38	3,52	3,13	2,90	2,74	2,63	2,54	2,48	2,42	2,38	2,31	2,23	2,16	2,11	2,07	2,03	1,98	1,93	1,88
20	4,35	3,49	3,10	2,87	2,71	2,60	2,51	2,45	2,39	2,35	2,28	2,20	2,12	2,08	2,04	1,99	1,95	1,90	1,84
21	4,32	3,47	3,07	2,84	2,68	2,57	2,49	2,42	2,37	2,32	2,25	2,18	2,10	2,06	2,01	1,96	1,92	1,87	1,81
22	4,30	3,44	3,05	2,82	2,66	2,55	2,46	2,40	2,34	2,30	2,23	2,15	2,07	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,78
23	4,28	3,42	3,03	2,80	2,64	2,53	2,44	2,37	2,32	2,27	2,20	2,13	2,05	2,01	1,96	1,91	1,86	1,81	1,76
24	4,26	3,40	3,01	2,78	2,62	2,51	2,42	2,36	2,30	2,25	2,18	2,11	2,03	1,98	1,94	1,89	1,84	1,79	1,73
25	4,24	3,39	2,99	2,76	2,60	2,49	2,40	2,34	2,28	2,24	2,16	2,09	2,01	1,96	1,92	1,87	1,82	1,77	1,71
26	4,23	3,37	2,98	2,74	2,59	2,47	2,39	2,32	2,27	2,22	2,15	2,07	1,99	1,95	1,90	1,85	1,80	1,75	1,69
27	4,21	3,35	2,96	2,73	2,57	2,46	2,37	2,31	2,25	2,20	2,13	2,06	1,97	1,93	1,88	1,84	1,79	1,73	1,67
28	4,20	3,34	2,95	2,71	2,56	2,45	2,36	2,29	2,24	2,19	2,12	2,04	1,96	1,91	1,87	1,82	1,77	1,71	1,65
29	4,18	3,33	2,93	2,70	2,55	2,43	2,35	2,28	2,22	2,18	2,10	2,03	1,94	1,90	1,85	1,81	1,75	1,70	1,64
30	4,17	3,32	2,92	2,69	2,53	2,42	2,33	2,27	2,21	2,16	2,09	2,01	1,93	1,89	1,84	1,79	1,74	1,68	1,62
40	4,08	3,23	2,84	2,61	2,45	2,34	2,25	2,18	2,12	2,08	2,00	1,92	1,84	1,79	1,74	1,69	1,64	1,58	1,51
60	4,00	3,15	2,76	2,53	2,37	2,25	2,17	2,10	2,04	1,99	1,92	1,84	1,75	1,70	1,65	1,60	1,53	1,47	1,39
120	3,92	3,07	2,68	2,45	2,29	2,17	2,09	2,02	1,96	1,91	1,83	1,75	1,66	1,61	1,55	1,50	1,43	1,35	1,25
$\infty$	3,84	3,00	2,60	2,37	2,21	2,10	2,01	1,94	1,88	1,83	1,75	1,67	1,57	1,52	1,46	1,39	1,32	1,22	1,00