

Universidade Federal de Juiz de Fora

Pós-Graduação em Química

Mestrado em Química

Patrícia Mendonça de Castro

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE ÁCIDO GRAXO TRANS
(C18:1 9t) POR ELETROFERESE CAPILAR EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS**

Juiz de Fora

2010

Patrícia Mendonça de Castro

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA DE ANÁLISE DE ÁCIDO GRAXO TRANS
(C18:1 9t) POR ELETROFERESE CAPILAR EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora

2010

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele eu não seria nada.

Ao meu saudoso pai, *Francisco*, pelo seu exemplo de luta e hombridade e por todo esforço dedicado ao longo de uma vida para que eu pudesse me tornar uma pessoa de bons princípios e aguerrida para alcançar meus objetivos de maneira íntegra. Tenho certeza que ele está imensamente orgulhoso da sua “Baixinha”.

A minha amada mãe, *Salete*, pelo apoio absoluto em todos os momentos da minha vida, por ser o meu exemplo de força, coragem e superação e por ser a melhor mãe do mundo.

Aos meus queridos irmãos, *Edson e Leandro*, por acreditarem sempre na minha capacidade.

Aos meus sobrinhos, *Laura e Henrique*, por tornarem a minha vida mais feliz e colorida.

Ao meu amor, *Marcelo*, por estar ao meu lado mesmo nos piores momentos da minha vida, pelos conselhos profissionais, por acreditar em mim e por tornar minha vida mais especial.

A minha família, que mesmo longe nunca deixou de me apoiar.

Aos meus amigos de Três Pontas pela confiança depositada em mim, pelos inesquecíveis momentos de alegria e por estarem comigo nas horas de maior dificuldade.

Ao meu orientador, *Marcone*, por todo conhecimento passado, pelas dúvidas esclarecidas, por acreditar em mim e me ajudar a seguir em frente.

Aos meus colegas de grupo, *GQAQ*, por estarem juntos comigo nessa caminhada.

Aos meus colegas dos outros laboratórios, pelo auxílio na resolução de diversos problemas. Gostaria de mencionar o nome de cada um, mas como são muitos, opto por agradecer a colaboração de TODOS!!!

Aos professores do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora.

A secretária da pós-graduação, *Simone*, pelo auxílio e boa vontade sempre.

A CAPES, CNPq, FAPEMIG e UFJF pelo apoio financeiro.

Dedico esta dissertação à memória do meu pai Francisco pelo seu exemplo de vida, dedicação e amor incondicional.

“O meu espírito rebela-se contra a estagnação. Dêem-me problemas, muito trabalho, o mais complicado criptograma ou a mais intrincada análise e eu estarei no meu meio... Detesto a rotina monótona da existência. Anseio pela exaltação mental. Foi por isso que escolhi minha profissão especial... a ciência!”

(Sir Arthur Conan Doyle by Sherlock Holmes)

RESUMO

Foi desenvolvido um método alternativo para determinação do teor de trans total expresso em ácido elaídico utilizando eletroforese capilar de zona (CZE), com detecção indireta no UV em 224 nm e tempo de análise em torno de 8 minutos. O eletrólito de corrida otimizado é composto por 15,0 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH em torno de 6,8); Brij 35 8,0 mmol L⁻¹, SDBS 4,0 mmol L⁻¹, n-octanol 1,5% v/v, acetonitrila 45% v/v e metanol 8% v/v. A separação do par crítico C18:1 9t/C18:1 9c alcançou a linha base do eletroferograma com resolução acima do mínimo desejado de 1,50. Utilizou-se espectroscopia Raman para estudo sobre a composição do tampão fosfato utilizado no eletrólito e planejamento de experimentos 3² para determinação dos níveis ótimos de Brij 35 e n-octanol. Logo, após a otimização do sistema de eletrólito, realizou-se uma curva de calibração utilizando C15:0 como padrão interno e, após a verificar que não houve falta de ajuste no modelo proposto, o fator de resposta (Rf) foi calculado e aplicado na quantificação das amostras de gordura vegetal hidrogenada, margarina, requeijão e biscoito recheado por CE. O método otimizado por CE foi comparado com a metodologia oficial por cromatografia gasosa da *American Oil Chemists' Society* (AOCS) para amostra de gordura vegetal hidrogenada. Os métodos foram comparados usando o teste *t-student* para amostras independentes com réplicas autênticas de seis e os resultados obtidos não apresentaram diferença significativa para o intervalo de confiança de 95% estimado. Os resultados alcançados foram satisfatórios, indicando que o método otimizado por eletroforese capilar pode ser usado para determinação do teor total de trans em diversas amostras alimentícias apresentando como vantagens: menor tempo de análise, ausência de passos de derivatização no preparo da amostra, uso de colunas não-específicas e baixo custo.

Palavras-chave: Eletroforese Capilar. Acido graxo trans. Acido elaídico. Requeijão. Gordura vegetal hidrogenada.

ABSTRACT

A different method for determination of total trans fatty acids expressed as elaidic acid by capillary zone electrophoresis (CZE) under indirect UV detection at 224 nm within an analysis time of 8 min was developed. The optimized running electrolyte includes 15.0 mmol L⁻¹ KH₂PO₄/Na₂HPO₄ buffer (pH □ 6,8), 4.0 mmol L⁻¹ SDBS, 8.0 mmol L⁻¹ Brij 35, 45% v/v ACN, 8% v/v methanol and 1.5% v/v n-octanol. Baseline separation of the critical pair C18:1-9t / C18-9cis with a resolution higher than 1.5 was achieved. The optimum capillary electrophoresis (CE) conditions for the background electrolyte were established with the support of Raman spectroscopy and experiments of a 3² factorial design were used to better level of Brij 35 and n-octanol determination. Following optimization electrolyte system was made calibration curve using C15:0 as the internal standard and, after certification where no lack of fit within proposed model the response factor (RF) was calculated and applied to total trans fatty acid (TTFA) analysis in a hydrogenated vegetable fat (HVF), margarine, spreadable cheese and strawberry cookies samples by CE. The CZE method was compared with the American Oil Chemists' Society (AOCS) official method by gas chromatography (GC) to hydrogenated vegetable fat samples using independent sample *t-student* test for six genuine replicates and no significant difference was found within 95% confidence interval. The results obtained were satisfactory, indicating that the optimized methodology by CE can be useful for TTFA analysis in different matrix foods presenting as advantages short analysis time, no derivatization step in sample preparation, no specific separation columns and low cost.

Keywords: Capillary Electrophoresis. Trans fatty acid. Elaidic acid. Spreadable cheese. Hydrogenated fat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 Exemplo de ácido graxo insaturado e de ácido graxo saturado	4
FIGURA 2 Modelo estrutural dos isômeros cis/trans.	5
FIGURA 3 Cadeia carbônica para exemplificar a nomenclatura do ácido graxo linoléico de acordo com a iupac e referente à nomenclatura ômega.	6
FIGURA 4 Representação de um equipamento de eletroforese capilar	14
FIGURA 5 Representação do comportamento do potencial zeta em relação à largura da dupla camada difusa e à concentração do tampão.	17
FIGURA 6 Representação da superfície interna de um capilar de sílica fundida e perfil radial do fluxo eletrosmótico se deslocando do anodo para o catodo (fluxo normal)	17
FIGURA 7 Figura esquemática do mecanismo de separação de ag de cadeia longa por eletroforese capilar de zona em modo contra-eletrosmótico.....	20
FIGURA 8 Figura para reação de hidrólise básica dos glicerídeos.....	21
FIGURA 9 Esquema para modos de espalhamento elástico (rayleigh) e inelástico (stokes e anti-stokes) presentes no efeito raman. onde ν_0 , é frequência (ou energia) da radiação excitante, ν_s é frequência da radiação espalhada e ν_v é frequência da radiação vibracional.	25
FIGURA 10 Exemplo de ácido graxo insaturado e de ácido graxo saturado.	28
FIGURA 11 Cromatograma genérico, explicitando o grau de resolução entre dois analitos de interesse.	30
FIGURA 12 Esquema para preparo de amostra para análise de ácido graxo trans por eletroforese capilar.....	36
FIGURA 13 Fotografia do equipamento utilizado para preparo de amostras analisadas por CE.....	37
FIGURA 14 Esquema para preparo de amostra de gordura vegetal hidrogenada para análise por GC.	38

FIGURA 15 Eletroferogramas de padrões 1- C18:1 9t e 2- C13:0 (padrão interno) utilizando diferentes tampões. A- NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ , B- KH ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄ , C- NH ₄ H ₂ PO ₄ / (NH ₄) ₂ HPO ₄ , D- KH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ , E- KH ₂ PO ₄ / (NH ₄) ₂ HPO ₄ , F- NaH ₂ PO ₄ / (NH ₄) ₂ HPO ₄ , G-NaH ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄ , H- NH ₄ H ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ , I- NH ₄ H ₂ PO ₄ / K ₂ HPO ₄	41
FIGURA 16 Espectros referentes à intensidade raman obtidos por cada eletrólito no estudo com raman.....	43
FIGURA 17 Eletroferograma de padrões 0,5 mmol l ⁻¹ a- C18:0, b- C18:1 9t, c- C18:1 9c, d- C16:0, e- C18:2 cc, f- C15:0, g- C13:0, eletrólito constituído por: 15,0 mmol l ⁻¹ KH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ ; , SDBS 4,0 mmol l ⁻¹ , acetonitrila 45% v/v, Brij 35 e n-octanol nas proporções indicadas para cada experimento na Tabela 3.....	47
FIGURA 18 Superfície de resposta para o planeamento fatorial 3 ²	54
FIGURA 19 curva de nível para planeamento fatorial 3 ² . a resposta é a razão entre número de pratos (N) e ruído normalizado (R).....	54
FIGURA 20 Eletroferograma de amostra de GVH diluída em eletrólito	56
FIGURA 21 Eletroferograma de amostra de GVH diluída em metanol (eletrólito crescido com 5% de metanol)	57
FIGURA 22 Eletroferograma de amostra de GVH diluída em metanol (eletrólito crescido com 8% de metanol)	58
FIGURA 23 Eletroferograma de amostra de GVH diluída em metanol (eletrólito crescido com 10% de metanol)	58
FIGURA 24 Eletroferograma de amostra de gvh diluída em metanol (eletrólito crescido com 8% de etanol)	59
FIGURA 25 Eletroferograma de padrões de ácidos graxos realizado com eletrólito otimizado	60
FIGURA 26 Curva analítica de calibração para a razão das áreas (AC18:1t/ AC15:0) versus a razão das concentrações ([C18:1t]/ [C15:0]).	62

FIGURA 27: Fotografia das amostras analisadas por eletroforese capilar. 1- Margarina de uso culinário, 2- Biscoito recheado sabor morango, 3- Gordura vegetal hidrogenada A (GVH - A), 4- Requeijão cremoso com GVH – A.64

FIGURA 28 Eletroferograma para confirmação da presença de elaídico na amostra de GVH (pico 2). Eletroferograma em preto é referente à amostra e eletroferograma em vermelho é referente à amostra dopada com padrão de C18:1 9t.65

FIGURA 29 Eletroferogramas de padrões de ácidos graxos 1- C18:0, 2- C18:1 9t, 3- C18:1 9c, 4- C16:0, 5- C15:0 (PI), todos com concentração de 0,50 mmol L⁻¹. B- Eletroferograma da amostra de GVH A. C- Eletroferograma da amostra de requeijão. D- Eletroferograma da amostra de margarina.66

FIGURA 30 E- Eletroferograma da amostra de margarina 4*- C18:2 cc (em 206 nm), F- Eletroferograma da amostra de GVH B67

FIGURA 31 Eletroferograma da amostra de biscoito recheado sabor morango 1- C18:0, 2- C18:1 9t, 3- C18:1 9c, 4- C16:0, 5- C15:0 (PI).68

FIGURA 32 Representação da medida da largura dos picos medidos a meia altura (width) em um eletroferograma genérico.....69

FIGURA 33 Cromatograma dos ésteres metílicos de ácidos graxos da gordura vegetal hidrogenada em análise por GC/FID. 1- 12:0; 2- 13:0 (padrão interno); 3- 16:0; 4- 18:0, # Região de isômeros cis/trans do 18:1; 5- 18:2 c/c. # Expansão parcial do cromatograma da região cis/trans.....71

FIGURA 34 Gráfico do teor de trans em amostras de gordura vegetal hidrogenada (GVH) comparando o método oficial por cromatografia à gás (GC) com o método implementado por eletroforese capilar (CE).....75

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras vegetais.....	3
TABELA 2 Tabela para declaração de nutrientes em rótulos alimentícios.....	10
TABELA 3 Tampões fosfato utilizados no estudo raman	33
TABELA 4 Planejamento experimental para escolha do eletrólito.....	46
TABELA 5 Coeficientes de contraste para um fatorial 3^2	49
TABELA 6 Tabela de análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados de um modelo linear nos parâmetros para o modelo	52
TABELA 7 Tabela com os valores das réplicas obtidas para a curva de calibração	63
TABELA 8 Resultados da quantificação, cálculo da resolução entre o par crítico e número de pratos teórico do ácido elaídico.....	70
TABELA 9 Resultados da comparação entre cromatografia gasosa (GC) e eletroforese capilar (CE) para amostra de gordura vegetal hidrogenada.....	72

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ζ - Potencial zeta

ACN – acetonitrila

AG – Ácidos graxos

AGT - Ácido graxo trans

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOCS - *American Oil Chemist's Society*

BRIJ 35 - *Polyoxyethylene lauryl ether*

CCE – comprimento de cadeia equivalente

CE – Eletroforese Capilar (*Capillary Electrophoresis*)

CZE – Eletroforese Capilar de Zona (*Capillary Zone Electrophoresis*)

DAD – Detector Arranjo de diodos (*diode array detection*)

FID – Detector de ionização de chama (*Flame ionization detection*)

EF - Mobilidade eletroforética (electrophoretic mobility)

EOF – Fluxo eletrosmótico (electrosmotic flow)

μ_{ap} - Mobilidade aparente

μ_{EF} - Mobilidade eletroforética

μ_{EOF} - Mobilidade do fluxo eletrosmótico

FAME – Metil éster de ácido graxo (*fatty acid methyl ester*)

FDA – *Food and Drug Administration*

FTIR – Infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transformed Infrared*)

GC – Cromatografia à gás (*Gas Chromatography*)

GLC - Cromatografia gás-líquido (*gas-liquid chromatography*)

GSC - Cromatografia gás-sólido (*gas-solid chromatography*)

GVH – Gordura Vegetal Hidrogenada

HPLC - Cromatografia a líquido de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

K – Coeficiente de distribuição

LOD - Limite de Detecção (*Limits of Detection*)

LOQ – Limite de quantificação (*Limits of Quantification*)

R_f – Fator de Resposta (*Response Factor*)

SDBS - Dodecilbenzenosulfonato de sódio (*Sodium Dodecylbenzenesulfonate*)

SPE – Extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*)

TLC - Cromatografia de camada delgada (*Thin Layer Chromatography*)

T_M - Tempo de retenção do composto não retido

T_R – Tempo de retenção

T_R' – Tempo de retenção ajustado

UV – Ultravioleta

W – Largura do pico na linha base

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ÓLEOS E GORDURAS	1
1.2 ÁCIDOS GRAXOS	1
1.2.1 Definição	1
1.2.2 Classificação	2
1.2.3 Nomenclatura	5
1.3 GORDURA TRANS	6
1.3.1 Métodos de análise de AGT	10
1.4 ELETROFORESE CAPILAR (CE do inglês <i>Capillary Electrophoresis</i>).....	12
1.4.1 Conceito básico	12
1.4.2 Modos de eletroforese capilar	12
1.4.2.1 Eletroforese capilar de zona (CZE do inglês <i>Capillary Zone Electrophoresis</i>)	13
1.4.3 Instrumentação para CZE	14
1.4.4 Fluxo eletrosmótico (EOF do inglês <i>electrosmotic flow</i>).....	15
1.4.5 Mobilidade eletroforética (EF do inglês <i>electrophoretic mobility</i>).....	18
1.4.6 Métodos para estimativa da eficiência de uma coluna	21
1.5 ESPECTROSCOPIA RAMAN	23
1.6 CROMATOGRAFIA À GÁS (GC do inglês <i>Gas Chromatography</i>).....	26
1.6.1 Coeficiente de distribuição (K).....	27
1.6.2 Cálculo do tempo de retenção (t_r)	28
1.6.3 Resolução	29
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	32

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES PARA CE	32
3.2 REAGENTES E SOLUÇÕES PARA GC	33
3.3 INSTRUMENTAÇÃO.....	34
3.3.1 Eletroforese capilar (CE)	34
3.3.2 Espectroscopia raman.....	34
3.3.3 Cromatografia gasosa (GC)	35
3.4 PREPARO DAS AMOSTRAS	35
3.4.1 Preparo das amostras para análise por CE.....	35
3.4.2 Preparo das amostras para análise por GC	37
3.5 PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA CE.....	39
3.6 FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS.....	39
4 RESULTADOS.....	40
4.1 ESTUDO DOS ELETRÓLITOS UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	40
4.2 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS PARA BRIJ 35 E N-OCTANOL	44
4.2.1 Cálculo dos coeficientes do modelo	49
4.2.2 Análise da variância para ajuste do modelo	52
4.3 ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA	57
4.4 CÁLCULOS DO FATOR DE RESPOSTA E VERIFICAÇÃO DA FALTA DE AJUSTE DO MODELO.....	61
4.5 COMPARAÇÃO ENTRE A METODOLOGIA OTIMIZADA POR CE E O MÉTODO OFICIAL AOCS <i>CE 1H-05</i>	70
5 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	79

APÊNDICE.....	85
----------------------	-----------

1 INTRODUÇÃO

1.1 Óleos e gorduras

Os óleos e gorduras são substâncias solúveis em solventes orgânicos (éter e clorofórmio, por exemplo), de origem animal, vegetal ou microbiana, formadas predominantemente (85-95%) pelo produto da condensação entre glicerol e ácidos graxos, chamados triacilglicerídeos. Encontram-se ainda, na composição química de óleos e gorduras, componentes minoritários, <15%, como hidrocarbonetos, ceras, esteróides e vitaminas, entre outros. A diferença entre óleos e gorduras reside exclusivamente no seu aspecto físico. As gorduras apresentam aspecto sólido (p.f. > 20 °C, com predominância de ácidos graxos saturados ligados ao glicerol), enquanto que os óleos (predominância de ácidos graxos mono e poliinsaturados ligados ao glicerol) são líquidos a temperatura ambiente (MORETTO & FETT, 1989).

1.2 Ácidos graxos

1.2.1 Definição

Os ácidos graxos (AG) são definidos de forma genérica como 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 que podem ser representados pela forma **RCOOH**. Onde, na maioria das vezes, o grupamento R é uma cadeia hidrocarbonada longa podendo ser saturada, monoinsaturada (no caso de conter uma insaturação) ou poliinsaturada (no caso de conter mais de uma insaturação). O grupo carboxila constitui a região polar e a cadeia **R**, a região apolar da molécula (CURI *et al.*, 2002).

1.2.2 Classificação

Os ácidos graxos podem ser classificados de acordo com o número de átomos de carbono presentes na molécula, sendo denominados ácidos graxos de cadeia curta aqueles cuja cadeia carboxílica possua de 2 a 4 átomos de carbono, de cadeia média aqueles com 6 a 10 átomos de carbono e de cadeia longa aqueles com mais de 12 átomos de carbono. Os ácidos graxos também podem ser classificados de acordo com a presença ou não de insaturações, sendo denominados ácidos graxos saturados aqueles que não possuem dupla ligação entre os átomos de carbono da cadeia, monoinsaturados aqueles que possuem uma única insaturação entre os carbonos e poliinsaturados aqueles que possuem duas ou mais insaturações ao longo da cadeia carboxílica. A tabela 1 mostra os principais ácidos graxos encontrados em óleos e gorduras.

Tabela 1: Principais ácidos graxos presentes em óleos e gorduras vegetais (MORETTO & FETT, 1989; GUNSTONE, 1996).

<i>Símbolo</i>	<i>Fórmula</i>	<i>Nome oficial</i>	<i>Nome usual</i>
C4:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	Butanóico	Butírico
C6:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	Hexanóico	Capróico
C8:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	Octanóico	Caprílico
C10:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	Decanóico	Cáprico
C12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Dodecanóico	Láurico
C14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Tetradecanóico	Mirístico
C16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Hexadecanóico	Palmítico
C18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Octadecanóico	Estearico
C20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Eicosanóico	Araquídico
C22:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	Docosanóico	Behênico
C24:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	Tetracosanóico	Lignocérico
C16:1 (9c)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	9c-Hexadecenóico	Palmitoleico
C18:1 (9c)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	9c-Octadecenóico	Olêico
C18:1 (11t)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	11t-Octadecenóico	Vacênico
C18:2 (9c,12c)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	9c,12c-Octadecadienóico	Linoleico
C18:1 (9t)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	9t-octadecenóico	Elaídico
C18:3 (9c,12c,15c)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	9c,12c,15-Octadecatrienóico	Linolênico

Fonte: O autor.

A cadeia hidrocarbonada de um AG saturado existe, geralmente, sob a forma estendida, uma vez que esta conformação linear e flexível é o estado de menor energia. Tal conformação linear dos AG saturados permite um melhor empacotamento dos mesmos, fazendo com que as moléculas fiquem mais próximas umas das outras e, com isso, há um aumento da 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° é produzida para cada dupla presente na conformação *cis*. Como consequência, os AG saturados possuem um ponto de fusão maior que AG insaturados, como mostra a Figura 1 (CURI *et al.*, 2002).

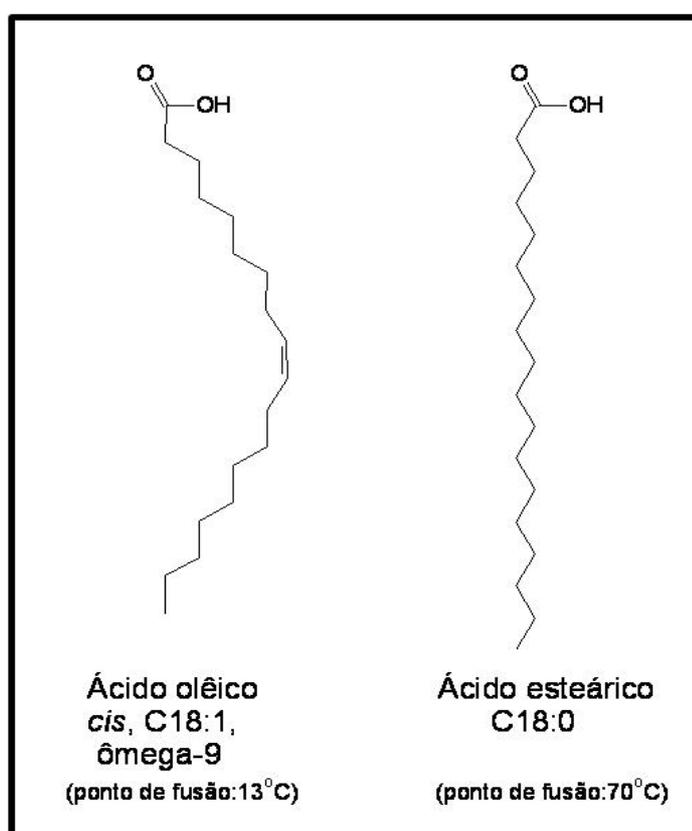


Figura 1: Exemplo de ácido graxo insaturado e de ácido graxo saturado.

Fonte: CURI *et al.*, 2002.

A presença de insaturações restringe a rotação da cadeia hidrocarbonada, fazendo com que ocorra isomeria em torno da dupla ligação, que é denominada configuração *cis*, caso os hidrogênios ligados aos átomos de carbono da dupla ligação se encontrem do mesmo lado de um plano imaginário traçado paralelamente

à insaturação, ou conformação *trans* se estes hidrogênios se encontrarem em lados opostos do plano imaginário traçado paralelamente à insaturação, como pode ser observado na Figura 2 (CURI *et al.*, 2002).

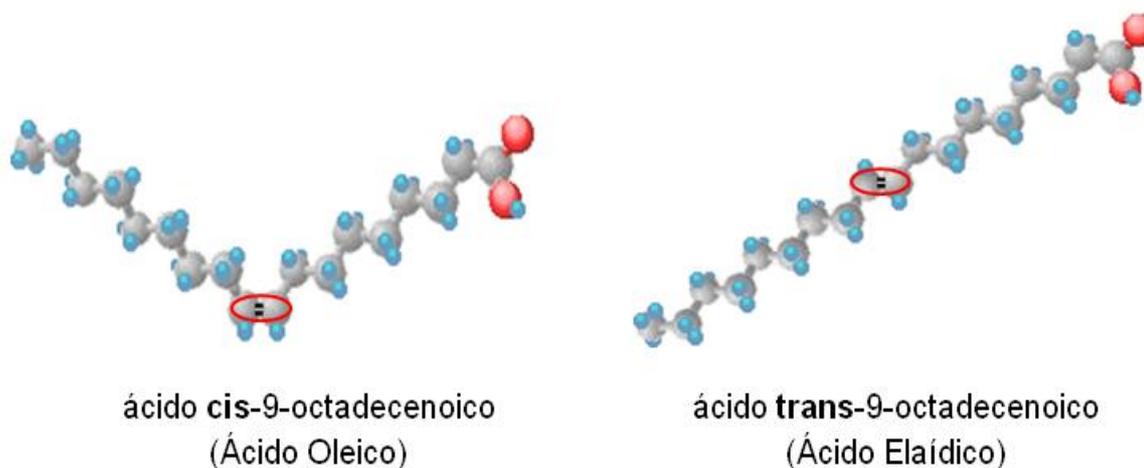


Figura 2: Modelo estrutural dos isômeros *cis/trans*.

Fonte: CURI *et al.*, 2002.

1.2.3 Nomenclatura

A notação utilizada para ácidos graxos de acordo com a padronização da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) leva em consideração o número de átomos de carbono que compõem a cadeia e a presença ou não de insaturações, bem como a localização das mesmas ao longo da cadeia (IUPAC-IUB, 1976). O símbolo *delta* é usado para identificar a posição da dupla ligação sem especificar a isomeria *cis/trans* da insaturação. Por exemplo, o ácido elaídico é composto por 18 átomos de carbono e possui uma única insaturação na conformação *trans* localizada no carbono de número 9 (numerado a partir do grupo carboxílico – **COOH**) e pode ser representado pela notação C18:1 Δ 9 sem especificar a isomeria da ligação dupla ou C18:1 9*t* quando a isomeria da insaturação for explicitada.

Os bioquímicos propuseram uma modificação do sistema de nomenclatura para os ácidos graxos, uma vez que durante o processo metabólico destes compostos no nível celular, ocorrem quebras das moléculas em unidades de carbono, iniciadas a partir do grupo carboxílico. Logo, ao enumerar os carbonos a partir do carbono mais distante do grupo carboxílico (ao contrário das regras padronizadas pela IUPAC), é possível agrupar os diferentes AG em “famílias” ou “séries” de acordo com a posição que estes apresentam a primeira dupla ligação em suas estruturas, introduzindo, portanto, a nomenclatura ômega (ω). Por exemplo, o ácido linoléico pode ser abreviado como C18:2 Δ 9,12 ou como C18:2 ω -6 especificando apenas a dupla ligação localizada no carbono de número 6 contado a partir do último carbono da cadeia, como mostra a Figura 3 (CURI *et al.*, 2002).

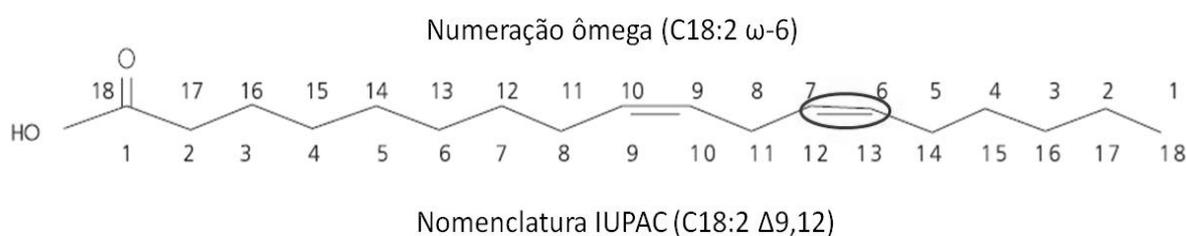


Figura 3: Nomenclatura do ácido graxo linoléico de acordo com a IUPAC e referente à nomenclatura ômega.

Fonte: CURI *et al.*, 2002.

1.3 Gorduras trans

O consumo de gorduras e seus efeitos na saúde humana têm sido alvo de intensas pesquisas na área de nutrição. Atualmente, pode-se notar um aumento considerável na ingestão de gorduras trans oriundas principalmente de processos industriais. O consumo de determinados ácidos graxos trans (AGT) tem sido associado ao desenvolvimento de doenças crônicas como *diabetes mellitus* e doenças cardiovasculares (MICHA & MOZAFFARIAN, 2009).

A reação de hidrogenação consiste na adição de átomos de hidrogênio às duplas ligações de compostos orgânicos. A aplicação desta técnica em óleos foi desenvolvida pelo químico alemão Normann em 1901, com o objetivo de converter óleo (vegetal ou de peixe) em gordura semi-sólida para ser usada como um componente “espalhável”. Neste processo, o óleo aquecido (geralmente óleo de soja) é exposto sob pressão ao hidrogênio na presença de um catalisador metálico. Essa reação, aparentemente simples, é, na realidade, bastante complexa, pois, além da redução das insaturações, ocorrem também a isomerização e a migração das duplas ligações. Tal procedimento é importante para modificar as características físicas e químicas de óleos vegetais, agregando valor financeiro e novas aplicações ao produto. O resultado da adição de hidrogênio à molécula de ácido graxo é a mudança do estado líquido para o estado semi-sólido devido ao aumento do número de ácidos graxos saturados e uma maior estabilidade oxidativa (LI *et al.*, 2009). Durante este processo, o ácido linoléico C18:2 9c,12c (52,5% no óleo de soja) apresenta como principais subprodutos o ácido oléico C18:1 9c , o ácido esteárico C18:0 e seu isômero geométrico conhecido como ácido elaídico C18:1 9t (KUMMEROW, 2009). Outra característica da gordura obtida por meio de hidrogenação catalítica industrial é o aumento da estabilidade oxidativa devido à diminuição das insaturações, porém, ocorre também a diminuição do valor nutricional do óleo devido a conversão de ácidos graxos essenciais em compostos saturados e insaturados na conformação *trans* (GUNSTONE *et al.*, 2004).

A partir da década de 30, o processo de hidrogenação de óleos vegetais tornou-se mais popular devido ao aparecimento das margarinas, uma vez que estes produtos ganharam notoriedade como substituintes mais saudáveis e mais duráveis que a manteiga. Entretanto, com o progresso das pesquisas relacionadas à composição da margarina e da manteiga e com o avanço de estudos clínicos envolvendo ácidos graxos *trans*, os conceitos relacionados aos benefícios da margarina foram modificados. Alimentos industrializados formulados a partir de gorduras vegetais hidrogenadas (GVH) apresentam ácidos graxos *trans* em sua composição. A modificação nas propriedades físico-químicas dos óleos permite que sejam utilizados como matéria-prima para a elaboração de gordura para frituras, margarina, “shortenings”, requeijão, biscoitos e outros alimentos que utilizam GVH

para melhorar a consistência, textura e diminuir os custos de produção (GUNSTONE, 2004).

Em um estudo multicêntrico realizado na Europa (“TRANSFAIR Study”), envolvendo 14 países no período de 1995 a 1996, foram coletadas e analisadas 100 amostras de alimentos consumidos pela população, o que representaria 95% do total de gordura ingerida de cada país (VAN POPPEL *et al.*, 1998). A proporção de AG trans em margarinas cremosas variou de 0,1 a 17% do total de ácidos graxos e em margarinas duras e “shortenings” observou-se alta proporção, acima de 50%. Óleos vegetais apresentaram um baixo teor, sendo menor que 1%. O isômero trans do C18:1, apresentou altos teores (acima de 94%); foi identificado em óleos vegetais endurecidos, e em manteigas entre 52% a 68% (ARO *et al.*, 1998), sendo o principal isômero da dieta caracterizado no estudo.

Estudos evidenciam que ácidos graxos trans oriundos da hidrogenação industrial de óleos vegetais (majoritariamente ácido elaídico) inibem a ação de enzimas dessaturases como, por exemplo, ciclooxigenase (COX-2), prejudicando a conversão do ácido linoléico em ácido araquidônico (C20:4 *cis5, cis8, cis11, cis14*). O ácido araquidônico é convertido em prostaglandina, sendo a prostaciclina (PGI₂) a fração majoritária que apresenta um importante papel nas atividades antiinflamatórias do organismo, além de atuar na prevenção de coágulos nas artérias e veias. Um coágulo em uma artéria do coração pode causar a morte imediata de uma pessoa (KUMMEROW *et al.*, 2007; KUMMEROW, 2009). O processo inflamatório de artérias é apontado como um fator de risco para doenças do coração, e estudos mostram que gordura trans oriunda de gordura vegetal hidrogenada aumenta este processo inflamatório, afetando negativamente o funcionamento do endotélio (SUN & CAMPOS, 2008; ERKKILÄ *et al.*, 2008).

Os isômeros dos ácidos graxos são formados por diversos processos, seja industrial ou biológico. No processo de hidrogenação industrial do óleo de soja, o elevado teor de ácido linoléico (52,5%) contribui com a formação de grande quantidade de uma mistura de ácido oléico C18:1 9c e do seu isômero geométrico conhecido como ácido elaídico C18:1 9t (KUMMEROW, 2009). O ácido elaídico é o ácido graxo trans mais comum relatado em tabelas nutricionais, sendo responsável

por 80 - 100% do total de AGT contidos em alimentos industrializados (TAVELLA *et al.*, 2000; SILVA & FERRAZ, 2006).

Os ácidos graxos *trans* de origem natural, ou seja, aqueles formados a partir do processo de biohidrogenação por bactérias da flora do sistema digestivo de ruminantes são encontrados, principalmente, na carne e no leite. O primeiro passo deste processo é a hidrogenação e isomerização bacteriana do ácido linoléico formando ácido vacênico (C18:1 11t) como componente de maior proporção (JAKOBSEN *et al.*, 2008). É apresentado na literatura que o ácido vacênico metabolizado no rúmen de vacas e búfalas origina como produto final alguns ácidos linoléicos conjugados (CLA) tais como: C18:2 9c,11t e C18:2 10t,12c (DESTAILLATS *et al.*, 2007), os quais são de suma importância para saúde humana, principalmente no combate e prevenção de alguns tipos de câncer (GATTÁS & BRUMANO, 2005).

A partir de 2003, a *Food and Drug Administration* (FDA) sancionou que a quantidade de gordura *trans* presente em alimentos fosse tabelada até 1º de janeiro de 2006, estabelecendo que alimentos cujo teor de *trans* fosse menor que 0,5g/porção seriam “livres de *trans*” (FDA, 2003). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou a Resolução - RDC 360 de 23 de dezembro de 2003 onde decretou que a partir de 1º de agosto de 2006, todos os rótulos de alimentos industrializados devem informar a quantidade de gordura *trans* contida no alimento, sendo esta informação podendo ser expressa como “zero” ou “0” ou “não contém” quando o alimento contiver quantidades menores ou iguais às estabelecidas como “não significativas” de acordo com a Tabela 2. O valor das porções para cada tipo de alimento também foi definido pela ANVISA e pode ser encontrado na RDC 359/03. Até o fim de 2006, as empresas que não cumprissem com as especificações da Agência foram simplesmente notificadas. Mas a partir de janeiro de 2007 os produtos irregulares foram apreendidos e os responsáveis receberam multa, com valor mínimo de R\$ 2 mil, podendo chegar a R\$ 1,5 milhão.

Tabela 2: Tabela para declaração de nutrientes em rótulos alimentícios.

Nutriente	Quantidades não significativas por porção (expressa em g ou ml)
Carboidratos	Menor ou igual a 0,5 g
Proteínas	Menor ou igual a 0,5 g
Gorduras totais (*)	Menor ou igual a 0,5 g
Gorduras saturadas	Menor ou igual a 0,2 g
Gorduras trans	Menor ou igual a 0,2 g
Fibra alimentar	Menor ou igual a 0,5 g
Sódio	Menor ou igual a 5 mg

Fonte: ANVISA, RDC 359/03

1.3.1 Métodos de análise de AGT

O teor de ácido graxo trans é monitorado, principalmente, por técnicas que normalmente necessitam de processos de extração da fração lipídica e/ou metilação do AG. Íons prata são utilizados em diversas técnicas para quantificação de AGT como por exemplo: cromatografia de camada delgada (Ag^+ -TLC) (RATNAYAKE, 2004), cromatografia líquida de alta eficiência (Ag^+ -HPLC) (BRONDZ, 2002, JUANÉDA *et al.*, 2002), extração em fase sólida (Ag^+ -SPE) (KRAMER *et al.*, 2008). Todas as técnicas citadas anteriormente baseiam-se no princípio de formação de um complexo através da transferência de carga entre o orbital *d* da prata e os elétrons π das duplas ligações dos ácidos graxos. A separação dos ácidos *cis/trans* ocorre baseada no número de duplas ligações, sendo que a retenção do ácido graxo à fase estacionária diminui com o aumento do tamanho da cadeia, isômeros *cis* são retidos mais fortemente que os seus isômeros *trans* e a força de retenção aumenta com o aumento do número de insaturações (DELMONTE & RADER, 2007).

A técnica de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) também é amplamente empregada para análise de ácido graxo trans, cuja medida é realizada em uma banda de absorbância máxima em 966 cm^{-1} de maneira não-destrutiva da matriz, referente à deformação da ligação C-H adjacente à dupla ligação trans.

Entretanto, não é possível a quantificação em matrizes cujo teor de trans seja menor que 5% do total da fração lipídica, além de não fornecer quaisquer detalhes sobre a natureza dos isômeros, tais como o comprimento da cadeia, ou o número de insaturações (KIM *et al.*, 2007; DELMONTE & RADER, 2007; JUANÉDA *et al.*, 2007). Técnicas de infravermelho envolvendo o cálculo da segunda derivada têm sido desenvolvidas onde a resolução do espectro de absorbância é melhorada, tornando possível a detecção de interferentes e quantificação de menores percentuais de trans em diversas matrizes (MOSSOBA *et al.*, 2007; BANSAL *et al.*, 2009).

Contudo, a principal técnica utilizada para determinação do perfil de ácidos graxos em lipídeos é a cromatografia gasosa (GC) (BRONDZ, 2002; GOLAY, 2009). Normalmente a metodologia inclui uma etapa de preparação da amostra, onde os ácidos graxos são extraídos da fração lipídica para a posterior análise (FOLCH *et al.*, 1957; BLIGH & DAYER, 1959). A técnica de GC permite a separação dos ácidos graxos de cadeia curta sem a necessidade de passos de derivatização, uma vez que estes ácidos apresentam alta volatilidade. Entretanto, os ácidos de cadeia longa apresentam baixa volatilidade, de modo que a derivatização dos grupos carboxílicos em grupos mais voláteis como trimetilsilil-ésteres ou metil-ésteres torna-se necessária (HARTMAN & LAGO, 1973; ISO Method 5509, 2004; DESTAILLATS *et al.*, 2007). A agência internacional *American Oil Chemist's Society* (AOCS) aprovou o método oficial *Ce 1h-05* para determinação de ácidos graxos saturados e insaturados (*cis/trans*) em óleos vegetais, óleos de animais não ruminantes e em gorduras por cromatografia gás/líquido (GLC), utilizando coluna capilar de sílica de 100 metros e temperatura constante a 180°C (AOCS Official Method *Ce 1h-05*). No entanto, para uma separação mais efetiva de pelo menos 14 ácidos graxos isômeros em amostras de gordura vegetal parcialmente hidrogenada, faz-se necessário um equipamento de cromatografia gasosa (GC) com uma coluna de 200 metros, o que torna a análise excessivamente longa (245 minutos) e, conseqüentemente, dispendiosa, limitando o seu uso em trabalhos de rotina (GOLAY *et al.*, 2009).

A partir da última década a eletroforese capilar (CE) tem se firmado alternativamente como técnica de separação que opera em meio líquido para análise de ácidos graxos 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, BANNORE *et al.*, 2008, OTIENO & MWONGELA, 2008). Os sistemas de eletrólitos mais comuns são compostos por tampões, cromóforos como p-anisato (ROLDAN-ASSAD & GAREIL, 1995) ou dodecilbenzenosulfonato de sódio (SDBS) (OLIVEIRA *et al.*, 2001, SUROWIEC *et al.*, 2004, LIU *et al.*, 2005), além de outros aditivos como metanol (ROLDAN-ASSAD & 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).

1.4 Eletroforese Capilar (CE do inglês *capillary electrophoresis*)

1.4.1 Conceito básico

A eletroforese é definida como uma técnica de separação que opera em meio líquido, baseada na migração diferenciada de compostos, neutros, iônicos ou ionizáveis, mediante a aplicação de um campo elétrico da ordem de kVolts/m tangenciando uma coluna capilar (sílica fundida, teflon ou pirex), a qual contém em seu interior uma solução de eletrólito conveniente, normalmente tamponada, atuando como canal de migração (BAKER, 1995, TAVARES, 1996).

1.4.2 Modos de eletroforese capilar

Existem diversos modos de eletroforese capilar para diferentes aplicações ao longo de matrizes distintas. Podemos destacar: eletroforese de afinidade (CAE, “capillary affinity electrophoresis”), eletroforese capilar em gel (CGE, “capillary gel electrophoresis”), eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE, “non-aqueous

capillary electrophoresis”) eletrocromatografia capilar (CEC, “capillary electrochromatography”), isotacoforese capilar (CITP, “capillary electrophoresis”) e eletroforese capilar de zona (CZE, capillary zone electrophoresis”) (TAVARES *et al.*, 1997).

Como apenas a eletroforese capilar de zona (CZE) será utilizada neste trabalho, os seus fundamentos e aplicações serão descritos em maiores detalhes, sendo os outros tipos de eletroforese apenas citados, visando unicamente à apresentação de um quadro sobre as diferentes possibilidades e mecanismos de separação.

1.4.2.1 Eletroforese Capilar de zona (CZE do inglês *Capillary Zone Electrophoresis*)

A eletroforese capilar de zona é o modo mais utilizado devido à grande aplicabilidade e facilidade na otimização das condições experimentais. A técnica utiliza um tubo capilar e os eletrodos são imersos em reservatórios contendo uma solução de eletrólito carreador, a qual conduz a corrente elétrica. A Figura 4 apresenta um esquema do equipamento de eletroforese capilar, composto de reservatórios para o tampão e amostra, sistema de alta tensão, detector e processador.

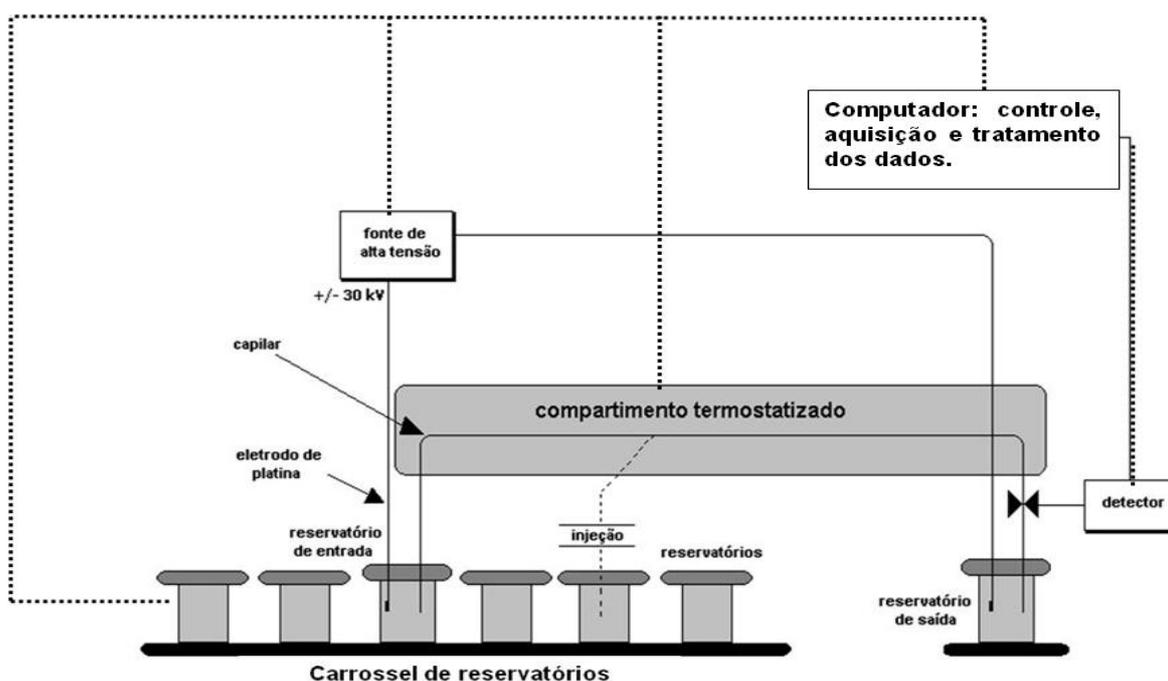


Figura 4: Representação de um equipamento de eletroforese capilar.

Fonte: OLIVEIRA, 2003.

1.4.3 Instrumentação para CZE

O sistema consiste de uma fonte de alta tensão, capilares (sílica fundida é o material mais comumente empregado), eletrodos (geralmente de platina), termostato e um detector apropriado. Uma fonte regulada, de alta tensão, é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar. Tais fontes podem ser operadas, em geral, com tensão constante e/ou corrente constante, com valores típicos de voltagem no intervalo de 0-50 kV e corrente de 0-200 μ A. A fonte de alta tensão é conectada, através de eletrodos de platina, a dois reservatórios da solução de eletrólito para completar o circuito elétrico.

Em CE o uso de capilares com diâmetros internos pequenos (na faixa de 15-100 μ m) permite uma melhor dissipação do calor gerado pela passagem da corrente elétrica conhecido como efeito Joule e, assim, é possível obter uma alta eficiência de separação com tempo reduzido de análise. (TAVARES *et al.*, 1997, KANNAMKUMARATH *et al.*, 2002). São utilizados tubos capilares com dimensões

de 15 a 100 μm de diâmetro interno e de 50 a 100 cm de comprimento, preenchidos com uma solução de eletrólito e submetidos à ação de um campo elétrico. Para minimizar tais efeitos térmicos, o capilar deve ser mantido à temperatura constante, havendo várias possibilidades para termostatização do sistema, o que inclui circulação de um líquido refrigerante ou através da passagem forçada de ar no cartucho contendo o capilar, além do uso de fornos. Os comandos para controle do equipamento e aquisição de dados são feitos mediante interface com computador (LANDERS, 1993).

A injeção em CZE utiliza volumes reduzidos, na ordem de 1 a 10 nL. A maneira pela qual a amostra é introduzida no capilar tem implicação direta na análise quantitativa. As amostras podem ser introduzidas mediante gradiente de pressão (pressurização ou vácuo em um dos reservatórios), chamado de **injeção hidrodinâmica** ou mediante aplicação de determinado valor de potencial ao longo do capilar por um determinado período de tempo chamado de **injeção eletrocínética**.

A injeção hidrodinâmica introduz no capilar uma alíquota representativa da composição do soluto na amostra. O volume de injeção (nL) depende do tempo de injeção, dimensões do capilar, viscosidade da solução do eletrólito e da diferença de pressão estabelecida. A injeção hidrodinâmica é usualmente mais precisa que a eletrocínética, porque é baseada estritamente na transferência de volume (a reprodutibilidade de área é de aproximadamente 1 %, desvio padrão relativo) (TAVARES, 1996).

1.4.4 Fluxo eletrosmótico (EOF do inglês *electrosmotic flow*)

Capilares de sílica fundida são ionizados após a passagem de uma solução com pH acima de 3 gerando grupos silanóis negativamente carregados (Si-O^-). Estas cargas negativas atraem as cargas positivas do tampão formando uma camada firme chamada de *camada fixa*. Os cátions não são suficientemente densos para neutralizar todas as cargas negativas da parede capilar, então uma nova camada de cargas positivas é formada sendo chamada de *camada móvel*. Estas

duas camadas formam a *dupla camada difusa* de cátions que são separadas por um plano imaginário chamado *plano de cisalhamento*. Os cátions na camada móvel são atraídos para o catodo (negativo) e como estão solvatados, eles arrastam o solvente como um todo gerando o *fluxo eletrosmótico* ou *fluxo normal* (BAKER, 1995).

Dentro do tubo capilar, o fluxo eletrosmótico é caracterizado por um perfil radial constante da velocidade, não contribuindo, portanto, para o alargamento das bandas como ocorre em técnicas cromatográficas, por exemplo. Esta peculiaridade distingue eletroforese capilar dos métodos cromatográficos em fase líquida, que apresenta uma variação parabólica para o perfil radial da velocidade dentro da coluna, característico do fluxo induzido por pressão. Além disso, a velocidade do fluxo eletrosmótico (v_{EOF}) como mostra a equação 1, em geral de grande magnitude, é responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, na direção do detector, permitindo assim a análise simultânea de amostras contendo solutos catiônicos, aniônicos, neutros e ionizáveis. A mobilidade do fluxo eletrosmótico (μ_{EOF}) é mostrada na equação 2.

$$v_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta E}{4\pi\eta} \quad (1)$$

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon \zeta}{4\pi\eta} \quad (2)$$

Onde ϵ é a constante dielétrica, ζ é o potencial zeta, E é a voltagem aplicada e η é a viscosidade da solução de eletrólito utilizada.

O potencial zeta (ζ) é a medida do potencial elétrico entre a dupla camada difusa quando partículas carregadas são submetidas a um campo elétrico (figura 5), sendo, portanto, dependente da força iônica do tampão e da largura da dupla camada difusa (δ) conforme a expressão $\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\epsilon}$, sabendo que e é a carga por unidade de superfície de área do capilar.

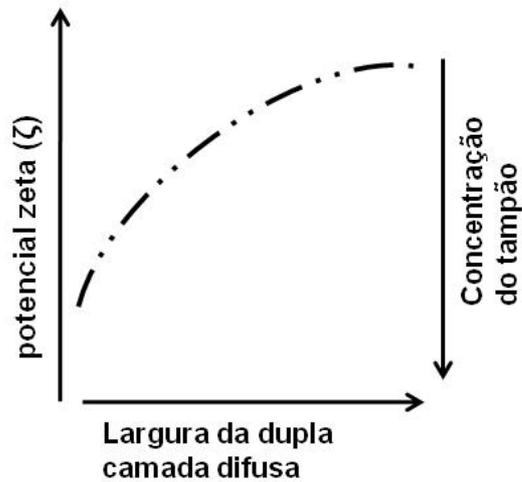


Figura 5: Representação do comportamento do potencial zeta em relação à largura da dupla camada difusa e à concentração do tampão.

Fonte: O autor.

A Figura 6 mostra a superfície interna de um capilar, mostrando a dupla camada formada, o plano imaginário que divide essas camadas (plano de cisalhamento) e o perfil do fluxo eletrosmótico.

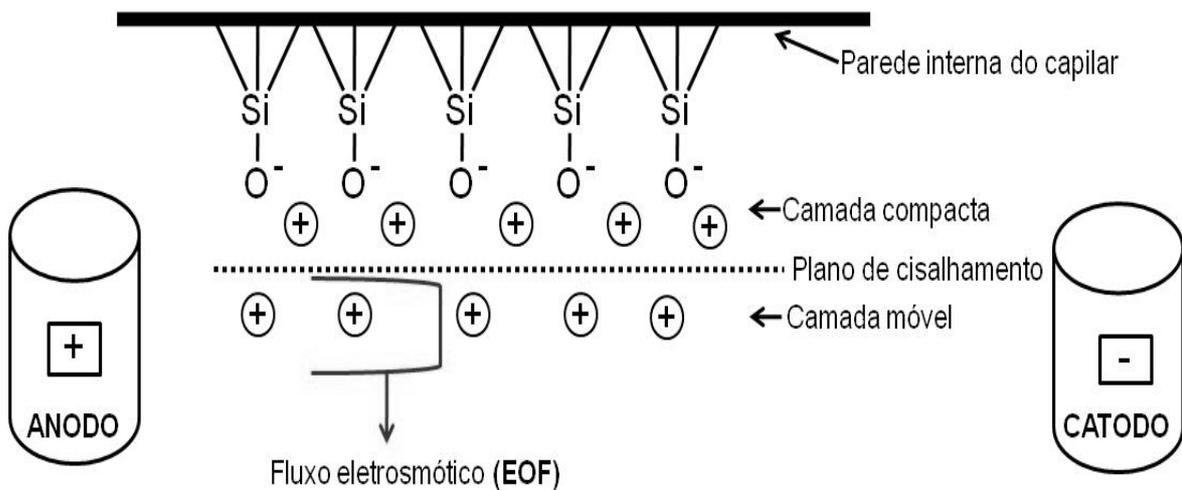


Figura 6: Representação da superfície interna de um capilar de sílica fundida e perfil radial do fluxo eletrosmótico se deslocando do ânodo para o cátodo (fluxo normal).

Fonte: BAKER, 1995.

1.4.5. Mobilidade eletroforética (EF do inglês *electrophoretic mobility*)

A separação das espécies é possível graças à diferença nas mobilidades iônicas dos analitos, que estão relacionadas com suas densidades de carga, isto é, com a razão *carga/raio*. Desta forma, formam-se zonas de amostras distintas de acordo com a mobilidade. A equação 3 mostra a velocidade eletroforética de uma espécie e sua relação com a mobilidade eletroforética como pode ser observado pela equação 4. Logo, espécies pequenas e altamente carregadas possuem alta mobilidade eletroforética. O tempo necessário para um composto percorrer o capilar até o ponto de detecção é chamado de tempo de migração (SILVA *et al.*, 2007).

$$v_{ef} = \mu_{ef} E \quad (3)$$

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

A mobilidade eletroforética é análoga à mobilidade eletrosmótica e possuem as mesmas unidades ($\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}$).

Para analisar ácidos graxos de cadeia longa por CE é necessário saber algumas características básicas destes analitos, tais como: baixa absorvância no ultra-violeta (ácidos graxos saturados); pKa semelhante ao de ácidos fracos e em torno de 5, insolúveis em água, além do fato de alguns ácidos graxos apresentarem mesmo comprimento de cadeia equivalente (CCE= n° átomos de carbono – $2 \cdot n^\circ$ de duplas ligações). A análise para estes constituintes é realizada principalmente, sob fluxo normal (fluxo eletrosmótico indo do anodo para catodo) em modo contra-eletrosmótico (mobilidades eletrosmótica e eletroforética na mesma direção, porém em sentidos contrários) mediante o uso de tampões alcalinos que mantenham o pH do eletrólito acima do pka das espécies para garantir que todas elas estarão na forma de ânions, onde os ácidos graxos com cadeias maiores eluem primeiro, sob detecção indireta por UV.

A ordem de eluição dos ácidos graxos é de acordo com a relação carga da espécie/tamanho. Sabendo que todos os ácidos analisados neste trabalho são monocarboxílicos e como apresentam apenas uma carga negativa oriunda do grupo $R-COO^-$, a mobilidade eletroforética será caracterizada apenas pelos diferentes tamanhos dos ácidos graxos, uma vez que a carga para todos eles será a mesma.

A mobilidade resultante entre analito e fluxo eletrosmótico é chamada de *mobilidade observada ou aparente* (μ_{ap} ou μ_{obs}), obtida pela soma vetorial (equação 5) entre mobilidade eletroforética e mobilidade eletrosmótica, ou seja, para análise de espécies negativamente carregadas que migram em direção ao anodo enquanto o fluxo eletrosmótico vai em direção ao catodo, as μ_{ef} e μ_{EOF} estão em sentidos contrários e, portanto, o vetor resultante (μ_{ap}) é a diferença entre eles resultando na migração no mesmo sentido do vetor maior valor (μ_{ef} ou μ_{EOF}).

$$\vec{\mu}_{ap} = \vec{\mu}_{ef} + \vec{\mu}_{eof} \quad (5)$$

Os ácidos graxos de cadeia mais longa resistem menos ao fluxo eletrosmótico que os ácidos de cadeia mais curta, logo, ácidos de cadeia hidrocarbonada maior são “arrastados” mais facilmente pelo fluxo eletrosmótico, passando pelo detector mais rapidamente, como é ilustrado pela Figura 7.

entanto, os ácidos graxos são analisados por CE na sua forma livre, ou seja, sem estarem ligados ao glicerol e carregados negativamente. Para que isso ocorra é necessário que ocorra hidrólise dos glicerídeos (amostras de óleo e/ou gordura) para a formação de sais de ácidos graxos. Tal reação, como exemplifica a Figura 8, consiste em uma hidrólise alcalina (saponificação), onde há adição aos glicerídeos 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 & BOYD, 1981).

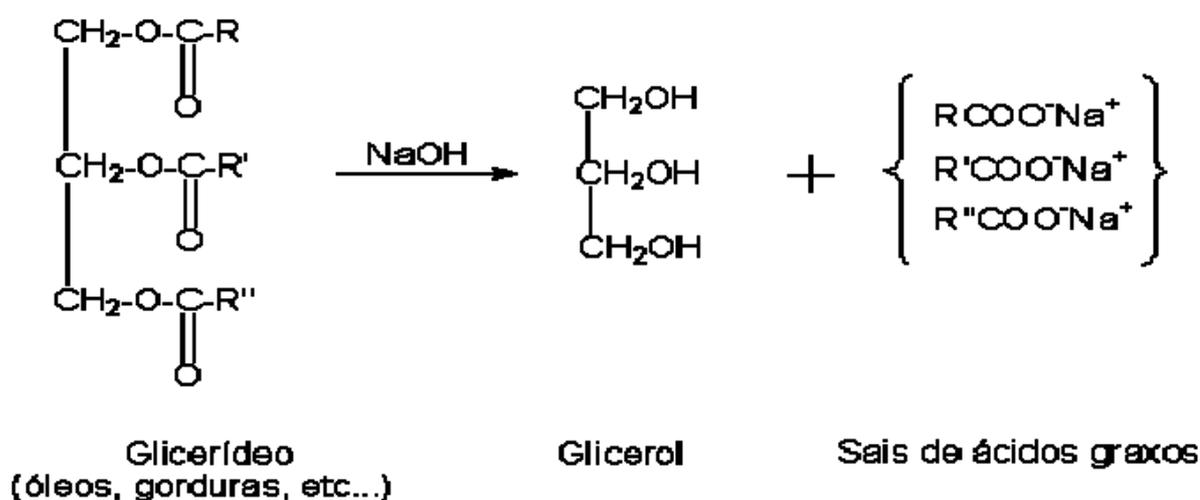


Figura 8: Figura para reação de hidrólise básica dos glicerídeos.

Fonte: MORRISON & BOYD, 1981.

1.4.6 Métodos para a estimativa da eficiência de uma coluna

Um prato teórico pode ser considerado uma etapa de equilíbrio no processo de distribuição de um componente dado entre as duas fases (móvel e estacionária), de forma análoga ao prato teórico de uma coluna de destilação. Quanto maior o número de pratos, mais etapas de equilíbrio existiriam e, dessa forma, melhor seria a separação entre compostos no processo cromatográfico. Entretanto, diferentemente da cromatografia, a não existência de fase estacionária em eletroforese capilar de zona diminui o efeito de alargamento causado pelos percursos múltiplos que uma

molécula pode encontrar através de uma fase estacionária (A) e pela transferência de massa entre as fases estacionária e móvel (C_e e C_m) como mostra a equação de *Van Deemter* (6), possibilitando à eletroforese capilar obter picos com alta definição e separações eficientes. Outro motivo da alta eficiência de separação por eletroforese capilar é que a aplicação de voltagem ao sistema, e não de pressão, evita variações na velocidade (u) ao longo da parede do capilar. Desta forma, o fluxo eletrosmótico é gerado uniformemente ao longo de todo o capilar e migra de forma segmentada, diminuindo o alargamento dos picos.

$$H = A + \frac{B}{u} + (C_e + C_m)u \quad (6)$$

A resolução da coluna capilar depende como em outras técnicas cromatográficas, do número de pratos (N), da altura do prato (H), do tempo de retenção do analito e pode ser calculada pelo rearranjo da expressão 7, fornecendo a expressão 8.

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (7)$$

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2 \quad (8)$$

Onde t_r é o tempo de retenção, W_b é a largura do pico na base, L é o comprimento da coluna e σ^2 é a variância de um pico (formato gaussiano atribuído para o pico). Sabe-se que quanto maior o número de pratos melhor será a separação dos analitos.

1.5 Espectroscopia Raman

O espalhamento de luz acontece quando fótons se chocam com moléculas de uma amostra. Um fóton que atinge uma molécula pode ser "espalhado", isto é, ter sua direção modificada, como uma bola de sinuca. Se a molécula, no choque, se comporta como uma esfera rígida, sem movimentos internos, o fóton espalhado conserva praticamente toda a energia inicial que tinha antes do choque, chamado de "espalhamento elástico" e é o mais comum quando fótons incidem sobre moléculas. No entanto, a molécula não é uma esfera rígida, logo, após o choque o fóton excita a molécula, cedendo a ela parte de sua energia inicial, fazendo com que a energia do fóton, depois do espalhamento seja menor que a inicial, pois parte dessa energia foi usada para vibrar a molécula, chamado de "espalhamento inelástico",

Espectroscopia Raman é uma técnica que utiliza como característica principal a propriedade da matéria de espalhar a luz inelasticamente. Neste processo, fótons incidentes sofrem espalhamento por moléculas e trocam com as mesmas uma determinada quantidade de energia vibracional.

Quando essa luz espalhada tem a mesma frequência da luz que é incidida, tem-se o fenômeno de espalhamento Rayleigh, análogo a colisões elásticas entre moléculas e fótons. Uma quantidade ainda menor de luz (em torno de 1 fóton em 10^7) é espalhada com frequência diferente da luz que entrou, como forma de colisões inelásticas entre moléculas e fótons, sendo chamado de espalhamento Raman, em homenagem aos físicos indianos Chandrasekhara Venkata Raman e K. S. Krishnan em 1928, tendo recebido o Prêmio Nobel de Física em 1932 por este feito. O espalhamento Raman é interessante porque as variações na energia dos fótons que saem correspondem às variações nos níveis de energia quantizada das moléculas na amostra (equação 9).

$$\Delta E(\text{fóton}) = \Delta E(\text{níveis de energia}) \quad (9)$$

Classicamente quando uma radiação monocromática incide em uma determinada amostra ocorre a interação do campo eletromagnético com a nuvem eletrônica molecular. O campo elétrico oscilante polariza um momento de dipolo (P), que pode ser decomposto em componentes que oscilam com a mesma frequência do campo elétrico alternante. O vetor momento de dipolo induzido passa a ter uma relação proporcional com o vetor campo elétrico e pode ser representado em primeira ordem (GARDINER, 1989).

$$\vec{P} = \alpha \vec{E} \quad (10)$$

Sendo α a polarizabilidade da molécula, P o momento dipolo e E o campo elétrico.

O momento de dipolo induzido (\vec{P}) está relacionado diretamente com a radiação eletromagnética, mostrando o quanto uma molécula consegue modificar a sua nuvem eletrônica na presença de um campo elétrico (polarizabilidade da molécula). Os estados inicial, final de energia e um conjunto de estados virtuais não possuem um valor limite de energia, fato que dificulta o cálculo da intensidade, uma vez que seria necessário considerar infinitos estados virtuais para a polarizabilidade eletrônica.

Na espectroscopia Raman a fonte utilizada é monocromática, normalmente um laser de alta potência, no qual a sua radiação incide diretamente na amostra para que se consiga perturbar os elétrons da molécula. Durante a irradiação, o espectro da radiação espalhada é medido em certo ângulo utilizando um refratômetro apropriado.

A radiação emitida é de três tipos: espalhamento *Stokes*, espalhamento *anti-Stokes* e espalhamento *Rayleigh*, como mostra a Figura 9.

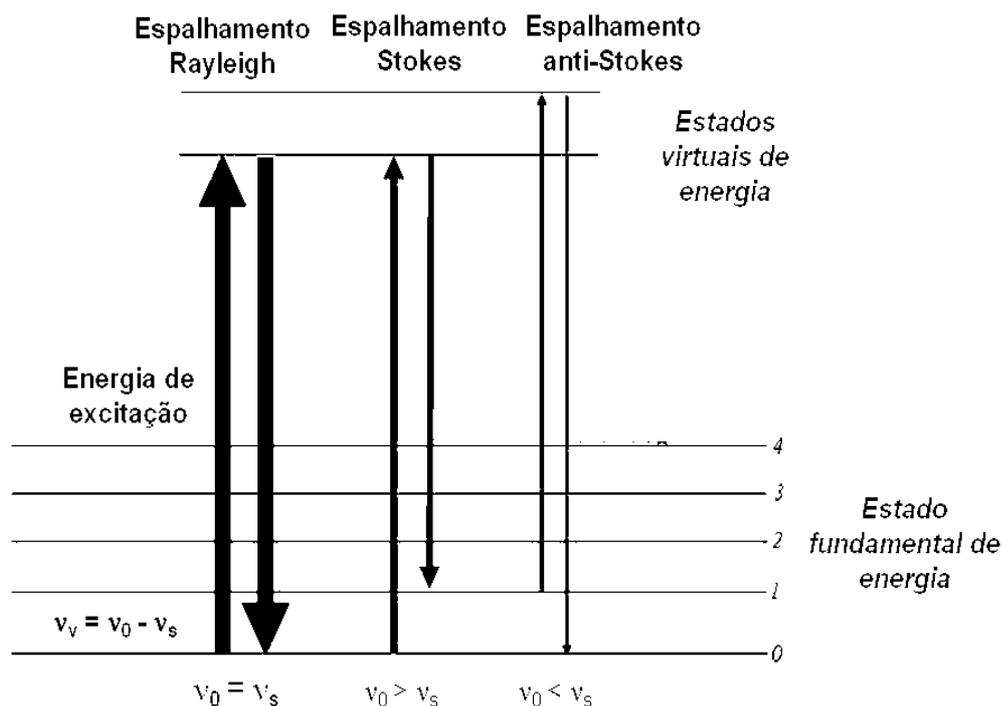


Figura 9: Esquema para modos de espalhamento elástico (Rayleigh) e inelástico (Stokes e anti-Stokes) presentes no efeito Raman. Onde ν_0 , é frequência (ou energia) da radiação excitante, ν_s é frequência da radiação espalhada e ν_v é frequência da radiação vibracional.

Fonte: GARDINER, 1989.

No espalhamento Rayleigh o fóton com energia $h\nu_0$ colide com a molécula no estado fundamental, passando-a para um novo estado denominado virtual (ou intermediário), voltando posteriormente para o mesmo nível de energia inicial, sem nenhuma modificação de valores na sua frequência espalhada. No espalhamento Raman Stokes a molécula no estado de menor energia sofre a colisão do fóton com energia $h\nu_0$ alcançando o estado virtual. Em seguida a molécula decai para um estado excitado, de energia $(h\nu_0 - e_v)$, portanto o fóton passa a apresentar uma energia menor do que a incidente. Já no espalhamento Raman anti-Stokes a interação do fóton com a matéria acontece em um estado já excitado e após esta interação ocorre a transição do sistema para o estado virtual, resultando em seguida o seu decaimento para o estado fundamental. Neste efeito ocorre um acréscimo de energia para o fóton espalhado na ordem de $(h\nu_0 + e_v)$. O que deve ficar bem enfatizado é que o estado virtual recebe este nome justamente pelo fato do mesmo

não pertencer a nenhum dos estados estacionários da molécula, sendo considerado como um novo sistema formado pela contribuição proveniente da nuvem eletrônica da molécula estudada e a radiação eletromagnética incidente.

Em resumo, podemos dizer que no efeito Raman ocorre o envolvimento dos estados inicial, final e um conjunto de estados virtuais nos quais as suas energias não possuem um valor limite dificultando o cálculo da intensidade, uma vez que seria necessário considerar infinitos estados virtuais para a polarizabilidade eletrônica. Com o intuito de contornar este fato em 1934, G. Placzek publicou sua obra fundamental sobre a teoria do efeito Raman, baseada no desenvolvimento da teoria da polarizabilidade (PLACZEK, 1934). Em seu trabalho, que ficou conhecido como aproximação de Placzek ou ainda como teoria da polarizabilidade do efeito Raman, o autor considera apenas a polarizabilidade do estado fundamental. Nesta aproximação são impostas algumas condições como a energia do fóton de excitação deve ser muito menor que a energia correspondente à transição eletrônica mais baixa da molécula. Para satisfazer esta imposição utilizam-se lasers de excitação distantes da região do visível, mais comumente lasers de alta potência com radiação no infravermelho. Quando estas condições são satisfeitas o fenômeno de espalhamento passa a receber o nome de efeito Raman normal ou ainda efeito Raman ordinário. A espectroscopia Raman apresenta uma série de vantagens que a torna bastante atrativa perante as outras técnicas espectroscópicas. Por exemplo, análise é realizada de forma não destrutível da amostra o que garante a preservação da matriz avaliada (SALA, 2008).

1.6 Cromatografia à Gás (GC do inglês *Gas Chromatography*)

A cromatografia gasosa é uma técnica de separação baseada na distribuição dos componentes de uma mistura entre um fluido gasoso inerte (fase móvel) e um adsorvente (fase estacionária). Na cromatografia por adsorção as separações ocorrem através de interações eletrostáticas e forças de Van Der Waals entre a fase estacionária sólida e os componentes da mistura volatilizados na fase móvel gasosa, chamado de cromatografia *gás-sólido* (*Gas-Solid Chromatography*). A natureza da fase estacionária sólida pode ser diversa, nomeadamente sílica gel, alumina ou

celulose. A cromatografia gasosa de partição, também conhecida como cromatografia *gás-líquido* (*Gas-Liquid Chromatography*), é baseada nas diferenças de solubilidade dos componentes da fase estacionária líquida adsorvida em um suporte sólido inerte e dos componentes de interesse volatilizados na fase móvel gasosa (MILLER & McNAIR, 2009).

Em 1906, Mikhail Tswett's descreveu as primeiras separações cromatográficas. Entretanto, somente em 1952, Martin e James desenvolveram a técnica de cromatografia gás-líquido, fato que lhes rendeu um Prêmio Nobel de Química no mesmo ano, usando como fase móvel o gás nitrogênio e como fase estacionária o ácido esteárico suportado em *celite* na separação dos ácidos etanóico, propanóico e butanóico. Desde então, a cromatografia gasosa foi se desenvolvendo e mudou o cenário de química analítica em diversas áreas de pesquisa. As colunas capilares foram introduzidas em meados de 1958 por Golay como uma alternativa mais eficiente que as colunas empacotadas utilizadas até então. E com o crescente desenvolvimento da técnica, novas colunas mais robustas e mais resistentes à altas temperaturas foram introduzidas, seja de sílica pura ou com fase estacionária ligada à parede interna do capilar (BRAITHWAITE & SMITH, 1999).

1.6.1 Coeficiente de Distribuição (K)

A eficiência da separação que pode ser conseguida numa coluna cromatográfica depende das velocidades com a quais as diversas espécies atravessam a coluna (em outras palavras, a velocidade com que cada espécie é eluída). Essas velocidades são determinadas pelas magnitudes das constantes de equilíbrio das reações que regem as distribuições das diversas espécies entre a fase móvel e a fase estacionária. Frequentemente, o tipo de equilíbrio envolvido em cromatografia pode ser descrito por equações simples, descrevendo o fenômeno de transferência de um soluto entre a fase móvel e a fase estacionária (BRAITHWAITE & SMITH, 1999).

A constante de equilíbrio K para essa reação é chamada de coeficiente de distribuição ou coeficiente de partição, e pode ser definido como:

$$K = \frac{C_{f,e}}{C_{f,m}} \quad (11)$$

Onde $C_{f,e}$ e $C_{f,m}$ representam as concentrações molares de um composto nas fase estacionária e móvel, respectivamente.

1.6.2 Cálculo do tempo de Retenção (t_R)

O tempo de retenção é o tempo gasto por um componente desde a sua injeção na coluna até a sua detecção na saída do sistema. O tempo de retenção engloba todo o tempo que um componente fica no sistema cromatográfico, seja diluído na fase móvel, seja retido na fase estacionária. Na cromatografia gasosa, esse tempo também pode ser determinado por alguma perturbação de pressão no sistema no momento da injeção, que aparece no cromatograma como uma perturbação na linha de base, de forma similar ao pico indicado na figura 10. Para a determinação dos tempos de retenção ajustados (t_R') é necessário conhecer o tempo que uma molécula da fase móvel que não interage com a fase estacionária leva para alcançar o detector (t_M), uma vez que a correção é feita simplesmente descontando o seu valor do valor do tempo de retenção.

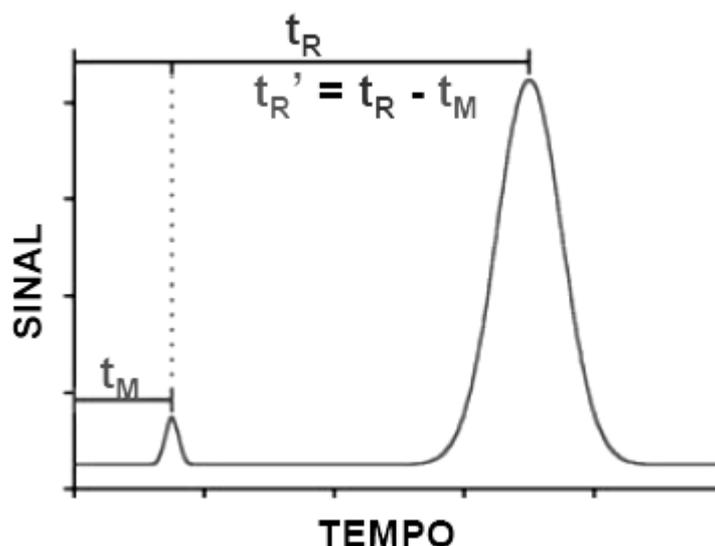


Figura 10: Representação de cromatograma genérico mostrando tempo de retenção de uma analito.

Onde t_R = Tempo de Retenção (tempo decorrido entre a injeção e o ápice do pico cromatográfico), t_M = Tempo de Retenção do Composto Não-Retido (tempo mínimo para um composto que não interaja com a fase estacionária atravessar a coluna) e t_R' = Tempo de retenção ajustado (tempo médio que as moléculas do analito passam sorvidas na fase estacionária).

A separação dos analitos por GC é dada de acordo com o tempo de retenção de cada componente da mistura, ou seja, a amostra é volatilizada (sem decomposição) e injetada juntamente com o gás de arraste inerte (fase móvel) percorrendo a coluna. Os analitos que possuem uma menor afinidade pela fase estacionária, seja ela sólida ou líquida suportada, eluem mais rapidamente da coluna enquanto aqueles com uma afinidade maior eluem depois. A interação do analito com a fase estacionária e o tempo de eluição de cada composto podem ser racionalizados de acordo com a *Lei de Raoult* e com a relação entre pressão de

vapor e entalpia de vaporização $\ln(p^0) = -\frac{\Delta H_v}{RT} + C$, sendo p^0 a pressão de vapor, ΔH_v entalpia de vaporização, R constante dos gases e T temperatura da coluna e C é constante. A regra geral é que os tempos de retenção se correlacionam com pontos de ebulição dos compostos de interesse e com a interação do analito com a fase estacionária (KOLB & ETTRE, 2006).

1.6.3 Resolução

Para determinar a resolução entre dois picos adjacentes (admitindo que são gaussianos), consideram-se as larguras dos picos W_i na linha de base, bem como os respectivos tempos de retenção tr_i . A equação 12 mostra a fórmula para cálculo da resolução entre dois picos adjacentes.

$$R_{S_{A/B}} = \frac{2(tr_B - tr_A)}{(W_A + W_B)} \quad (12)$$

O valor deste parâmetro reflete o grau de perfeição com que dois picos são separados, tendo em conta a contribuição da eficiência e da seletividade. O efeito da resolução no grau de separação dos picos está ilustrado na figura 11.

Para que a separação seja considerada completa e a quantificação dos analitos não seja *sub* ou *superestimada*, a resolução entre os picos deve ser no mínimo 1,50 (MILLER & McNAIR, 2009).

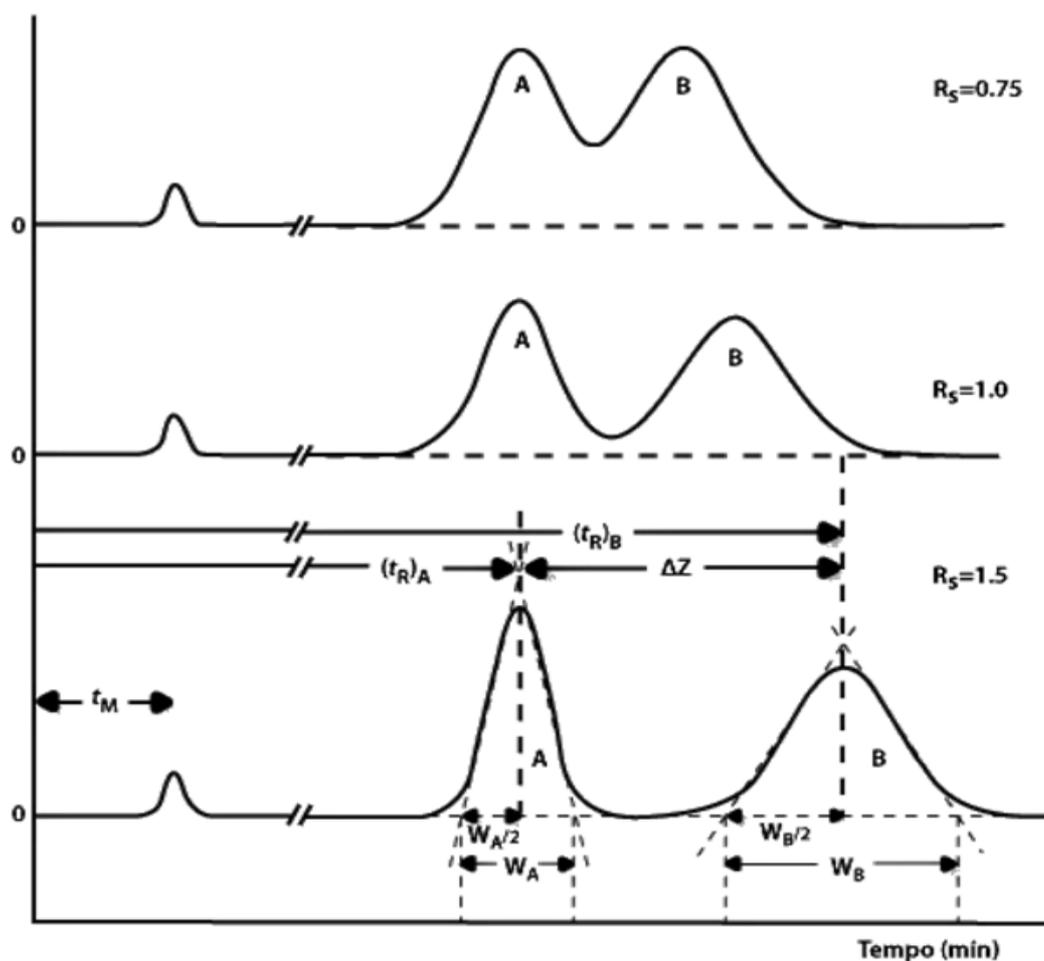


Figura 11: Cromatograma genérico, explicitando o grau de resolução entre dois analitos de interesse.

Fonte: MILLER & McNAIR, 2009

2 OBJETIVOS

Considerando o significativo aumento do consumo de produtos industrializados que utilizam em sua formulação GVH e a necessidade de monitorar a qualidade dos alimentos, ainda há um grande espaço na comunidade científica para o desenvolvimento de metodologias alternativas de separação capazes de quantificar gordura trans em matrizes alimentícias. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e otimização de metodologia alternativa para a determinação de ácido graxo trans, C18:1 9t (ácido elaídico) em amostras alimentícias por eletroforese capilar, a qual oferece como vantagens: curto tempo de análise, simples preparo de amostra e ausência de colunas específicas.

2.1. Objetivos específicos

Seguem abaixo os objetivos estabelecidos no projeto de mestrado:

1. Otimizar metodologia proposta no presente trabalho, além de sua aplicação para análise em amostras, tais como gordura vegetal hidrogenada, manteiga, margarina e requeijão.
2. Utilizar planejamento de experimentos como ferramenta auxiliar na otimização do método de forma multivariada e sistemática.
3. Empregar metodologia oficial AOCS *Ce 1h-05* para determinação do trans total em amostra de gordura vegetal hidrogenada e comparar os resultados com a metodologia otimizada por eletroforese capilar.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções para CE

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água foi purificada por deionização (Sistema Milli-Q, Millipores, Bedford, MA, USA). Solventes, etanol, metanol e ACN foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil), 1-octanol da Fluka (Germany) e Brij 35 e SDBS foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os padrões de ácido pentadecanóico (C15:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1 cis-9), e ácido elaídico (C18:1 trans-9) foram obtidos da Sigma-Aldrich.

Soluções estoques dos componentes do eletrólito foram preparadas com concentração de 100,0 mmol L⁻¹, exceto o Brij 35, que a solução estoque foi preparada com concentração de 50,0 mmol L⁻¹.

Todos os tampões utilizados, listados na Tabela 3, foram preparados com quantidades equimolares dos sais (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) correspondentes de fosfato (em balão volumétrico de 250,0 mL e completado o volume com água deionizada e com valor de pH em torno de 6,8.

Tanto as soluções dos tampões fosfato quanto a solução de Brij 35 foram mantidas sob refrigeração (5°C) para evitar a formação de mofo. Soluções estoques individuais dos ácidos graxos foram preparadas em metanol na concentração de 20,0 mmol L⁻¹ e estocadas em congelador até o momento das análises. Mistura de padrões na concentração de 0,5 mmol L⁻¹ foi preparada no dia da injeção a partir da diluição adequada dos estoques em metanol.

Tabela 3: Tampões fosfato utilizados no estudo RAMAN

<i>Tampões fosfato</i>
$\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 / (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
$\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$
$\text{KH}_2\text{PO}_4 / (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 / (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$

Fonte: O autor

3.2 Reagentes e soluções para GC

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água foi purificada por deionização (Sistema Milli-Q, Millipores, Bedford, MA, USA). Reagentes com grau analítico: cloreto de amônia, metanol, ácido sulfúrico e éter de petróleo.

Gás de arraste hidrogênio ultra puro (99,999%) para coluna capilar e gases auxiliares para o DIC: nitrogênio, hidrogênio (pureza 99,999 %) e ar super seco (livre de hidrocarbonetos).

Padrões de referência: mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos ou padrões individuais com os seguintes **ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME)** 13:0, FAME 14:0, FAME 16:0, FAME 18:0, FAME 18:1 cis-6, FAME 18:1 cis-7, FAME 18:1 cis-8, FAME 18:1 cis-9, FAME 18:1 cis-11, FAME 18:1 cis-12, FAME 18:1 cis-13, FAME 18:1 trans-6, FAME 18:1 trans-7, FAME 18:1 trans-8, FAME 18:1 trans-9, FAME 18:1 trans-10, FAME 18:1 trans-11,

FAME 18:1 trans-12, FAME 18:1 trans-13, FAME 18:1 trans-14, FAME 18:2 cis-9, cis-12 foram obtidos da Sigma-Aldrich.

3.3 Instrumentação

3.3.1 Eletroforese Capilar

Os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar (Agilent Technologies, modelo HP3D CE; Palo Alto, CA, USA) disponível na Universidade Federal de Juiz de Fora, equipado com DAD (*diode array detection*), comprimento de onda em 224nm, temperatura controlada no interior do cartucho em 25°C e aquisição e tratamento dos dados em software (ChemStation Version A.06.01). Capilar de sílica fundida com revestimento externo de polimida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA), com comprimento total de 48,5 cm e comprimento efetivo de 40,0 cm, 75µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. Foram retirados 2,0 cm do revestimento das pontas do capilar para evitar problemas de adsorção. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente a 12,5 mbar durante 5 segundos. O sistema eletroforético foi operado em polaridade normal e voltagem constante de +28 kV.

3.3.2 Espectroscopia Raman

Os testes espectroscópicos com os eletrólitos foram realizados em um equipamento Raman com transformada de Fourier Bruker RFS 100 disponível na Universidade Federal de Juiz de Fora, equipado com laser de Nd³⁺ /YAG operando em 1064 nm e detector CCD resfriado com nitrogênio líquido. Boa razão sinal/ruído foi obtida utilizando 1000 scans acumulados por um período de aproximadamente 30 minutos e 100 mW de potência de laser, usando 4 cm⁻¹ como resolução espectral.

3.3.3 Cromatografia Gasosa (GC)

O equipamento utilizado para análise de gordura vegetal hidrogenada foi um cromatógrafo à gás Shimadzu (modelo GC 17A), com detector de ionização de chama (FID - *Flame Ionization Detector*) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária composta por cyanopropylpolysiloxano (CP-7420™, 100 m x 0,25 mm id, 0,25 µm espessura do filme – Varian,USA), disponível no INSTITUTO ADOLFO LUTZ em São Paulo. As condições de análise foram: temperatura da coluna mantida isotermicamente a 180°C, temperatura do injetor e detector mantida a 250°C; gás de arraste hidrogênio ultra puro e pressão de 170 kPa exercida na coluna (AOCS Ce1h-05, 2005).

3.4 Preparo das amostras

3.4.1 Preparo das amostras para análise em CE

As amostras de gordura vegetal hidrogenada foram obtidas através das indústrias fabricantes do produto e as amostras de requeijão, margarina e biscoito recheado foram obtidas no mercado local. Foram pesadas alíquotas de 200 mg para GVH, 500 mg para requeijão e margarina e 300 mg para biscoito recheado (somente recheio).

Foram adicionados 2,0 mL de solução de NaOH/MeOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) para realização do procedimento de saponificação, onde as amostras permaneceram em banho de aquecimento, sob refluxo, a 75-80°C por 25 minutos para que os ácidos graxos ligados ao glicerol pudessem estar na forma livre. Após o término da saponificação o conteúdo dos balões foi transferido para um balão volumétrico de 10,0mL e o volume completado com metanol. As diluições em metanol foram as seguintes: 1/25 para GVH, 1/5 para requeijão, 1/15 para margarina e 1/6 para biscoito recheado. Segue abaixo o esquema de preparo da amostra, conforme descrito.

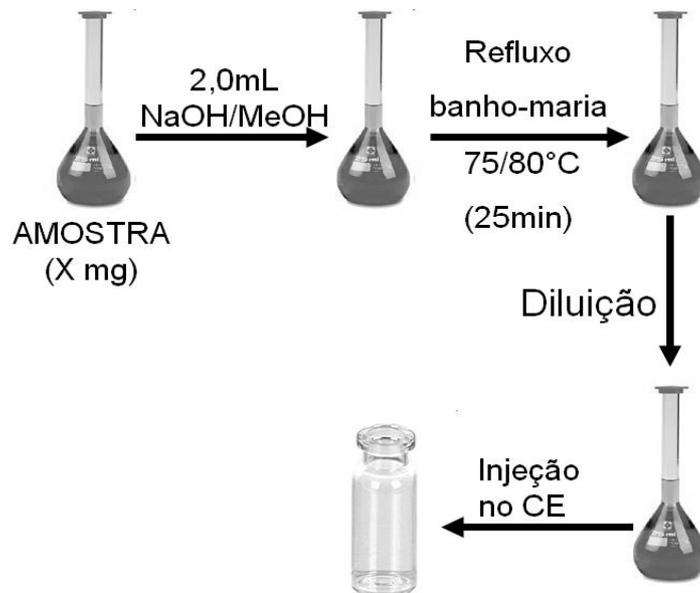


Figura 12: Esquema para preparo de amostra para análise de ácido graxo trans por eletroforese capilar.

Fonte: O autor.

Abaixo está a foto do banho térmico utilizado para saponificação das amostras, disponível nas dependências do laboratório de química analítica da UFJF.

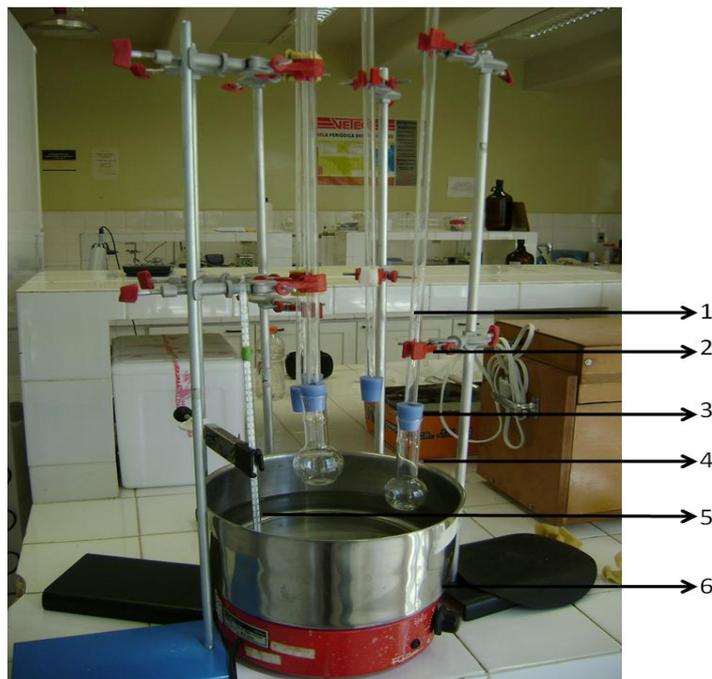


Figura 13: Fotografia do equipamento utilizado para preparo de amostras analisadas por CE. **1-** tubo de vidro; **2 -** garra; **3 -** septo de silicone; **4-** balão de fundo redondo de 25 mL; **5 -** termômetro; **6 -** banho de aquecimento.

Fonte: O autor.

3.4.2 Preparo das amostras para análise por GC

O preparo da amostra e análise cromatográfica foram realizados no INSTITUTO ADOLFO LUTZ em São Paulo, pelo analista técnico responsável, não sendo possível acompanhar as análises pessoalmente. Cabe ressaltar que o instituto em questão é uma referência na área de análise de alimentos, sendo laboratório credenciado da ANVISA. Todos os reagentes utilizados no processo de metilação, bem como o gás utilizado na análise foram gentilmente cedidos pelo próprio instituto.

O procedimento de preparo da amostra de gordura vegetal hidrogenada foi realizado de acordo com HARTMAN & LAGO, onde 1,0 mL de NaOH/MeOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) foi adicionado a uma massa de aproximadamente 50,0 mg de gordura vegetal hidrogenada e a mistura foi mantida em aquecimento sob refluxo por 5 minutos. Logo depois, uma alíquota de 3,0 mL do **Reagente de Esterificação[#]** foi

adicionada; a mistura foi aquecida por mais 3 minutos e transferida para um funil de separação com 5,0 mL de éter de petróleo e 10,0 mL de água deionizada. Após agitação e separação de fases, a fase aquosa foi descartada e foram adicionados mais 5 mL de água deionizada. A mistura foi agitada novamente e, após a separação das fases, a alíquota da fase orgânica foi coletada e o solvente foi evaporado em um rotavapor e os resíduos removidos sob fluxo de nitrogênio. Os metil ésteres foram solubilizados em n-heptano e injetados no cromatógrafo à gás sob as condições descritas no item 3.3.3.

#Reagente de esterificação: mistura de 2,0g de cloreto de amônia, 60,0 mL de metanol e 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado.



Figura 14: Esquema para preparo de amostra de gordura vegetal hidrogenada para análise por GC. Realizado pelo Instituto Adolfo Lutz – São Paulo.

Fonte: O autor.

Os compostos foram identificados por meio de comparação dos valores do tempo de retenção dos analitos com os dos padrões levando em consideração o padrão interno FAME 13:0. O fator de resposta adequado foi obtido por meio da

conversão da área de cada FAME em função do percentual massa. A resposta correta para cada FAME foi calculada teoricamente, expressa em termos da resposta do metil palmitato (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

3.5 Procedimento Analítico para CE

Quando o capilar novo foi utilizado, este foi condicionado por flush de pressão com solução aquosa de NaOH 1,0 mol L⁻¹ (30 min), água deionizada (10 min) e solução de eletrólito (15 min). Entre as corridas, o capilar foi condicionado com solução aquosa de NaOH 0,20 mol L⁻¹ (2 min), água deionizada (2 min) e solução de eletrólito (3 min).

3.6 Ferramentas estatísticas

As tabelas utilizadas para avaliação estatística podem ser encontradas em qualquer livro de estatística, contudo, no presente trabalho, os valores tabelados para o teste *t-student* e teste F de Hartley foram retirados do livro *Como fazer experimentos* de NETO *et al.* (2007). Os softwares Microsoft Excel 2009 e SPSS Statistics 8.0 foram utilizados para elaboração dos cálculos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo dos eletrólitos utilizando espectroscopia Raman

Realizou-se estudo preliminar com diferentes sistemas de eletrólito constituído pelas seguintes combinações de sal e ácido para os tampões: $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 / (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 / (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ e $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$, todos com pH em torno de 6,80.

Todos os tampões citados acima estavam na concentração de $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e aditivados com $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS, $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ Brij 35, 2,0% n-octanol e 45,0% de acetonitrila (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

A investigação consistiu na avaliação alternativa do contra íon para o fosfato da mistura tampão com o intuito de estudar o comportamento dos diferentes cátions no eletrólito. Primeiro, realizaram-se análises de mistura de padrões de ácidos graxos por CE com os nove tampões, onde o perfil qualitativo apresentado pelos eletroferogramas A, B e D foram os mais satisfatórios (Figura 15), levando-se em consideração o perfil dos picos do C18:1 9t e C13:0.

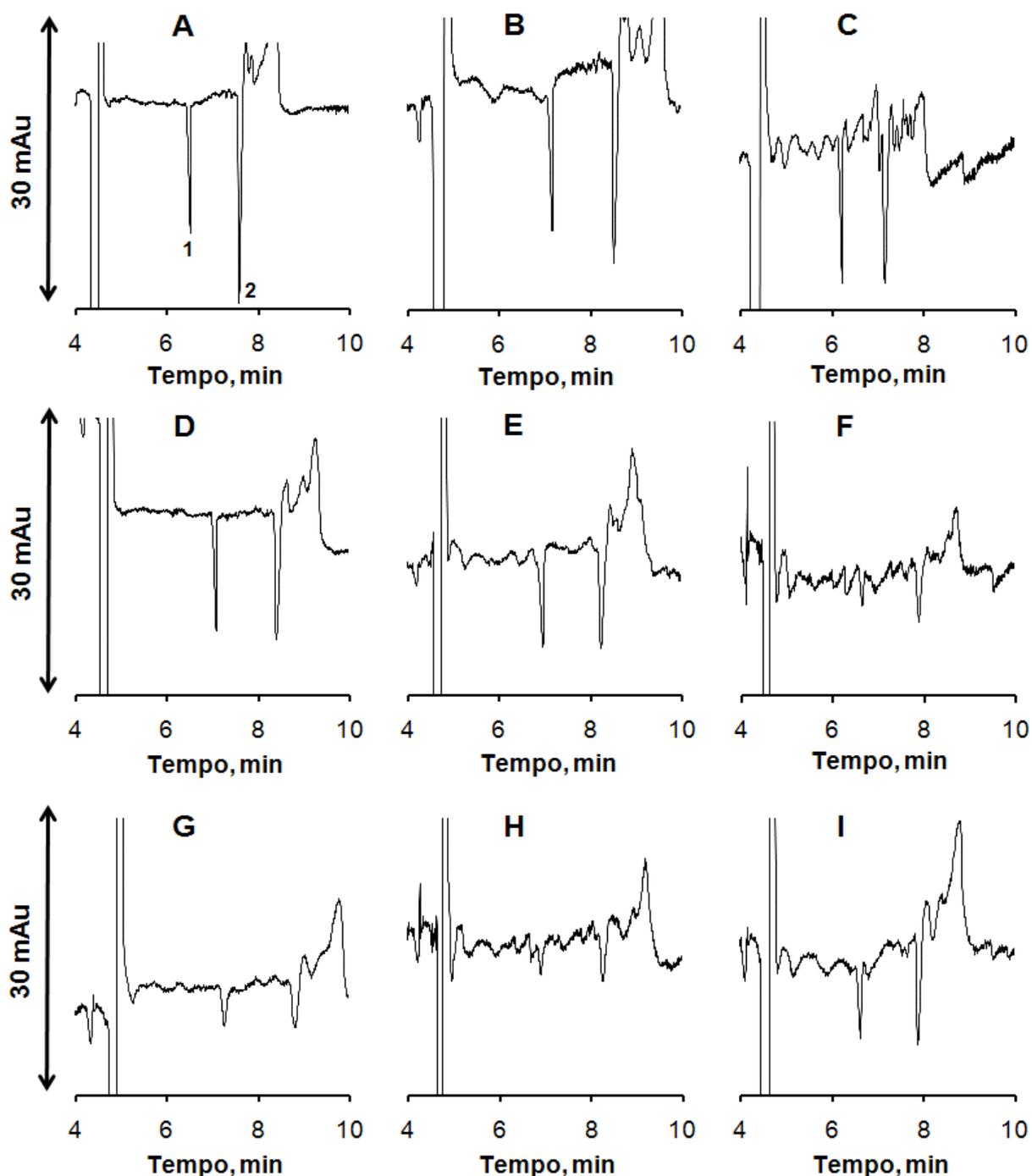


Figura 15: Eletroferogramas de padrões 1- C18:1 9t e 2- C13:0 (padrão interno) utilizando diferentes tampões. A- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$, B- $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$, C- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 / (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, D- $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$, E- $\text{KH}_2\text{PO}_4 / (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, F- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / (\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, G- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$, H- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$, I- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$. Todos os eletrólitos foram aditivados com $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS, $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ Brij 35, 2,0% n-octanol e 45,0% de acetonitrila. **Condições de análise:** injeção 5s a 12,5 mbar, +28 kV de voltagem, detecção indireta a 224 nm e 25°C temperatura no interior do cartucho.

Fonte: O autor.

Para um melhor entendimento do comportamento diferenciado de cada cátion do tampão e como isso poderia alterar o perfil de separação dos ácidos graxos de interesse, realizou-se um estudo envolvendo espectroscopia Raman onde houve o monitoramento da intensidade do sinal correspondente à banda da água com os eletrólitos utilizados nos experimentos A, B e D da figura 15, uma vez que estes eletroferogramas escolhidos apresentaram um melhor aspecto eletroforético relacionado à estabilidade da linha base e perfil dos picos.

A mistura de acetonitrila e água (ACN-H₂O) exibe propriedades termodinâmicas anômalas e peculiares a esse sistema, conduzindo ao chamado de “Postulado de Micro Heterogeneidade”, que estabelece que a formação de micro regiões de moléculas de ACN e micro regiões de moléculas de água, que são separadas por um microfilme (REIMERS, 1999). Tomando como base o comportamento intrínseco desse sistema e sabendo que o eletrólito utilizado para as análises é composto basicamente por acetonitrila e água, utilizou-se espectroscopia Raman para auxiliar no entendimento da interação ACN- H₂O na presença de diferentes sistemas de tampão, como mostra a Figura 16, com ênfase na região de 2252 a 2260 cm⁻¹.

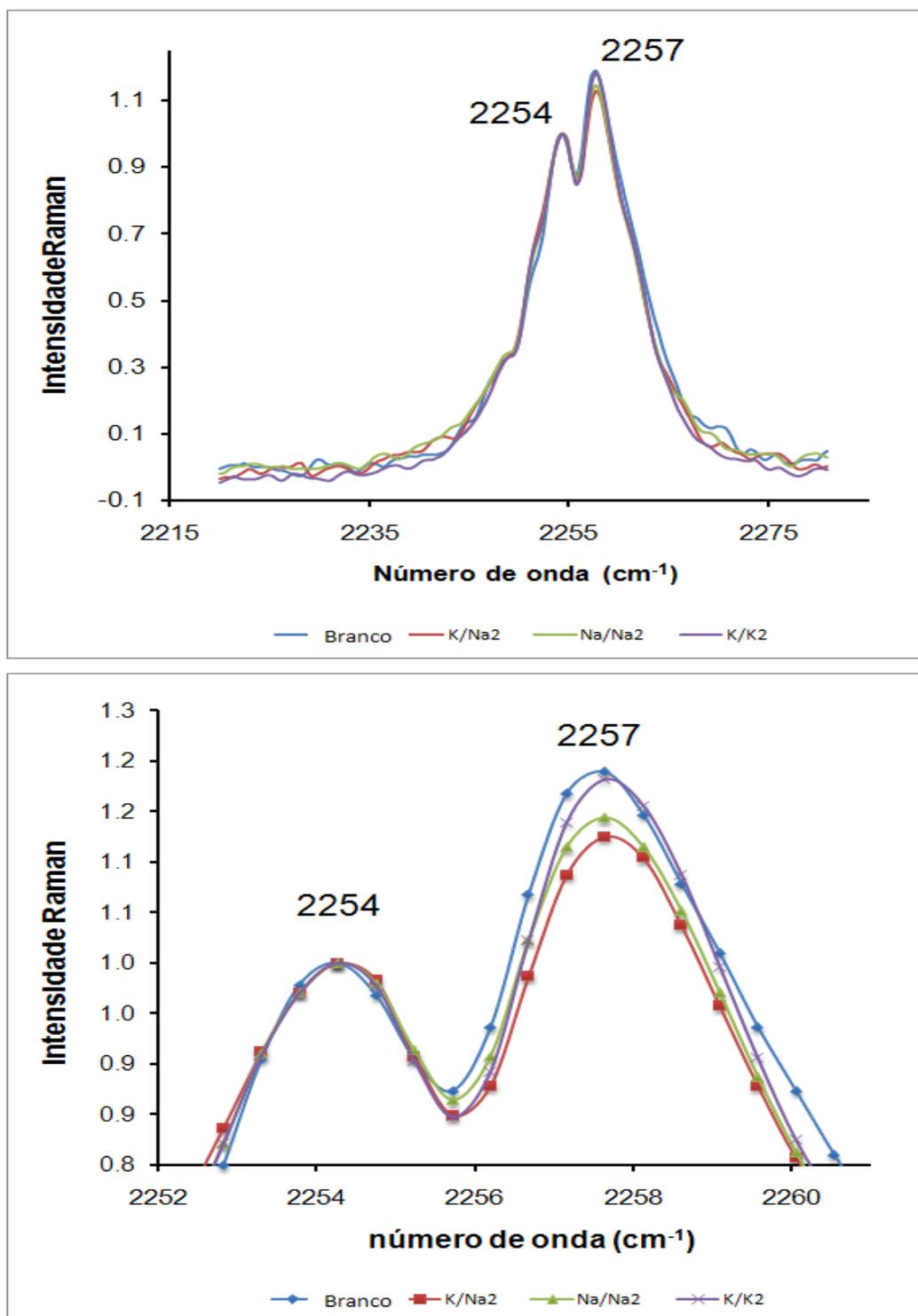


Figura 16: Espectros referentes à intensidade Raman obtidos por cada eletrólito no estudo com Raman. **Na legenda:** branco refere-se ao eletrólito formado por $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS; $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ Brij 35; 2,0% n-octanol; 45,0% de acetonitrila e volume final completado com água deionizada para 10,0 mL. Os demais espectros são referentes aos eletrólitos compostos pelos aditivos citados anteriormente para cada tampão correspondente.

Fonte: O autor.

Os resultados evidenciaram que pode ocorrer formação de micro-ambientes no meio sendo que na presença do tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ houve uma banda do estiramento CN na vizinhança de moléculas de água de menor intensidade, ou seja, a diminuição da intensidade do modo vibracional CN da acetonitrila na vizinhança de moléculas de água (2257 cm^{-1}) é favorável à incorporação de maior fração de solvente orgânico ao eletrólito, o que se acredita poder acarretar em ganho na resolução do par crítico C18:1 9t / C18:1 9c, uma vez que estes ácidos graxos de cadeia longa são solúveis em solvente orgânico.

Vale ressaltar que os sinais de intensidade da banda correspondente ao modo de estiramento CN da acetonitrila (2254 cm^{-1}) foram normalizados de modo que o aumento do modo vibracional da ACN na vizinhança de moléculas de água pudesse ser comparado entre cada eletrólito. Logo, pôde-se concluir que o tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ foi o mais indicado para o sistema em questão, uma vez que o mesmo apresenta menor banda de estiramento CN da ACN na vizinhança de moléculas de água. o que sugere uma maior incorporação de solvente orgânico no meio, fato que corrobora para a melhoria da separação analítica dos ácidos em questão.

4.2 Planejamento de experimentos para Brij 35 e n-octanol

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).

Após o estudo realizado por espectroscopia Raman, o passo seguinte foi verificar o comportamento do tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ na presença de Brij 35 e n-octanol, uma vez que estes componentes já apresentavam alta significância no sistema estudado anteriormente por Oliveira *et al.* (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Então, decidiu-se realizar um planejamento fatorial para aperfeiçoar os níveis adequados dos fatores citados acima. Demais variáveis como: voltagem, temperatura no interior do cartucho, dimensões do capilar, comprimento de onda, bem como a composição dos outros constituintes do eletrólito permaneceram inalterados.

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. Um planejamento fatorial 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 $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$. A representação (-) correspondeu aos valores do nível inferior, a representação (+) correspondeu aos valores do nível superior e o (0) aos valores do ponto central.

Tomando como base características já conhecidas do sistema em questão e utilizando como fundamento o estudo realizado por Oliveira *et al.* onde as proporções utilizadas de Brij 35 e n-octanol eram, respectivamente, $10,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e 2% v/v (OLIVEIRA *et al.*, 2003), foi possível estabelecer faixas de concentrações favoráveis a otimização. Por exemplo, a adição de n-octanol acima de 2,5% v/v não era favorável, uma vez que proporcionava formação de microbolhas, ocasionando ruído intenso, queda de corrente e, conseqüentemente, impossibilitando a análise. Logo, optou-se por trabalhar em níveis próximos ao estabelecido anteriormente por Oliveira *et al.* tanto para Brij 35 quanto para o n-octanol.

Para estudar o efeito de qualquer fator sobre a resposta é preciso fazê-lo variar e observar o resultado dessa variação. O parâmetro analisado para o

eletroferograma de cada ensaio foi a razão entre número de pratos do ácido graxo C18:0 pelo ruído normalizado (razão entre desvio padrão do sinal e a média do sinal). Sendo o número de pratos calculados a partir da equação 8 citada anteriormente e mostrada abaixo.

$$N=16\left(\frac{t_r}{W_b}\right)^2 \quad (8)$$

Foram utilizados ácido tridecanóico (C13:0) e ácido pentadecanóico (C15:0) como opções de padrão interno, uma vez que ácidos graxos ímpares não são encontrados normalmente nas amostras, mas apresentam características semelhantes ao ácidos graxos analisados.

A tabela 4 mostra a matriz de planejamento 3^2 (3 níveis e 2 fatores) com triplicata autêntica no ponto central e a resposta para razão entre número de pratos (**N**) e ruído normalizado (**R**).

Tabela 4: Planejamento experimental para escolha do eletrólito.

Experimentos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
BRIJ 35 (mM)	-1	-1	-1	0	0	0	1	1	1	0	0
n-octanol (%)	-1	0	1	-1	0	1	-1	0	1	0	0
N/R (10^4)	101,5	69,8	67,8	29,3	32,3	54,8	20,8	32,2	0*	27,1	28,6

Brij 35: (-1) 8,0 mmol L⁻¹, (0) 10,0 mmol L⁻¹, (1) 12,0 mmol L⁻¹

n-octanol: (-1) 1,5%, (0) 2,0%, (1) 2,5%.

*Não foi possível calcular a razão **N/R**, uma vez que houve formação de microbolhas ocasionando uma queda brusca na corrente e impossibilitando a corrida.

Fonte: O autor.

A Figura 17 mostra os eletroferogramas obtidos com o planejamento fatorial 3^2 utilizado.

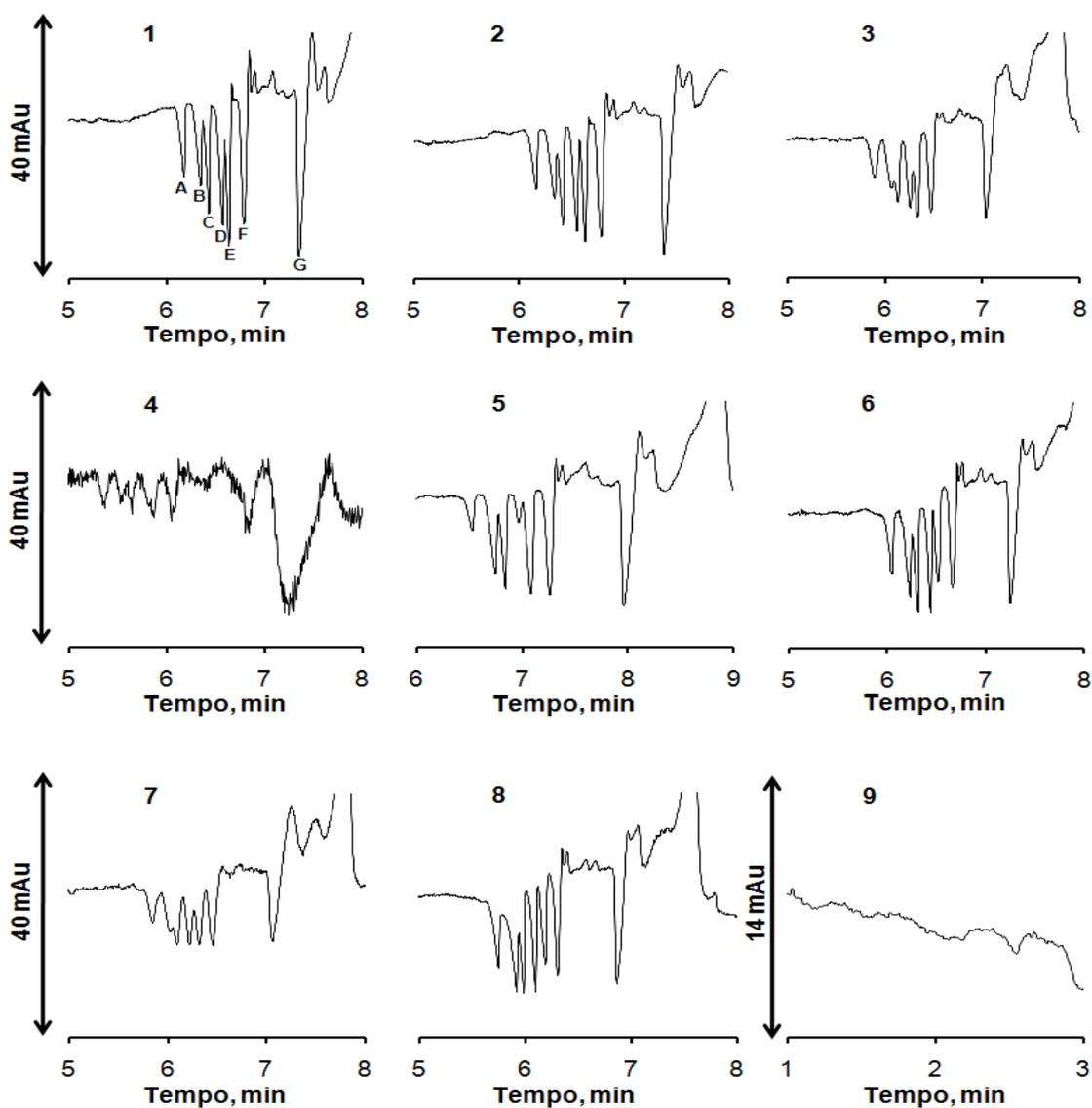


Figura 17: Eletroferograma de padrões $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ A- C18:0, B- C18:1 9t, C- C18:1 9c, D- C16:0, E- C18:2 cc, F- C15:0, G- C13:0, Eletrólito constituído por: $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$; , SDBS $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$, acetonitrila 45% v/v, Brij e n-octanol nas proporções indicadas para cada experimento na Tabela 3. **Condições de análise:** injeção 5 segundos a 12,5 mbar, voltagem de +28Kv , temperatura do cartucho de 25°C e detecção indireta em 224 nm.

Fonte: O autor.

A análise dos resultados apresentados na Tabela 4 e mediante observação dos eletroferogramas mostrados na Figura 17, pode-se notar que variações no nível

de Brij 35 (experimentos 1 e 7) em nível constante de n-octanol ocasiona uma diferença significativa na resposta, fato que não ocorre para inverso (experimentos 2 e 3, por exemplo), evidenciando uma possível significância do Brij 35 frente ao n-octanol na composição do eletrólito.

Pelos resultados obtidos no planejamento experimental, verifica-se que a variação dos níveis de n-octanol (-1, 0, +1) para valores fixos de **Brij 35** no nível baixo (-1, -1,-1) ou **alto (+1, +1, +1)** evidencia um aumento de ruído e um decréscimo do número de prato quando Brij 35 passa do nível baixo (experimentos 1, 2 e 3) para o nível alto (experimentos 7, 8 e 9), resultado que não favorece a análise. Para variações no nível de n-octanol (-1, 0, +1) no nível intermediário de **Brij 35 (0, 0, 0)** os resultados obtidos não apresentaram variações muito significativas e pouco representativas frente às outras variações. Observa-se ainda que a interação entre Brij 35 e n-octanol é negativa quando estes se encontram em níveis contrários, ou seja, maior alargamento do pico de C18:0 e menor separação do par cis/trans (análise visual) quando os fatores se encontram alternadamente nos níveis +1 e -1 (experimentos 3 e 7). Além disso, quando Brij 35 e n-octanol foram mantidos no **nível alto (1,1)**, como mostra o experimento 9, houve a formação de microbolhas, fato que impossibilita a análise e mostra que os dois fatores em nível alto não são satisfatórios para o sistema. Cabe ressaltar que os níveis de Brij 35 e n-octanol foram escolhidos a partir do estudo desenvolvido por Oliveira *et al.* (OLIVEIRA *et al.*, 2003) e não seria interessante trabalhar com níveis extremamente diferentes daqueles selecionados. Logo, o maior valor de resposta foi obtido quando Brij 35 e n-octanol foram mantidos em níveis baixos, concomitantemente, ou seja, o experimento 1.

Além disso, no estudo realizado foram testados dois possíveis padrões internos, o ácido tridecanóico (C13:0) e o ácido pentadecanóico (C15:0). Analisando os fatores como tempo de análise e estabilidade da linha base, o C15:0 foi escolhido como melhor opção, uma vez que alcança o detector com um tempo menor que o C13:0 promovendo uma análise mais rápida, apresentando uma menor perturbação da linha base após sua saída.

4.2.1 Cálculo dos coeficientes do modelo

Os coeficientes ($b_0, b_1, b_2, b_{11}, b_{22}, b_{12}$) calculados para o modelo são estimativas dos valores populacionais ($\beta_0, \beta_1, \beta_2, \beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{12}$), uma vez que para o cálculo desses valores populacionais o número de experimentos seria infinito. Tais coeficientes estimados (estimadores) são calculados a partir da relação $(X^t X)^{-1}(X^t Y)$ através do método dos mínimos quadrados. Os erros padrões para estes coeficientes, considerando que só existe **réplica no ponto central**, são calculados a partir da relação $\sqrt{(X^t X)^{-1} \cdot s^2_{(agrup)}}$, onde s^2 é desvio padrão na triplicata autêntica do ponto central (NETO, 2007). A matriz de contraste é montada a partir dos resultados obtidos com o planejamento de experimento, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5: Coeficientes de contraste para um fatorial 3^2 . A última coluna contém os valores da razão entre número de pratos C18:0 e ruído normalizado.

<i>Média</i>	<i>X1</i>	<i>X2</i>	<i>X1²</i>	<i>X2²</i>	<i>X1X2</i>	<i>N/R (10⁴)</i>
1	-1	-1	1	1	1	101,4615
1	-1	0	1	0	0	69,7680
1	-1	1	1	1	-1	67,8107
1	0	-1	0	1	0	29,3203
1	0	0	0	0	0	32,3709
1	0	1	0	1	0	54,8360
1	1	-1	1	1	-1	20,8024
1	1	0	1	0	0	32,1736
1	1	1	1	1	1	0
1	0	0	0	0	0	27.1432
1	0	0	0	0	0	28.5702

Fonte: O autor.

Sabendo que X1 refere-se o Brij 35, X2 ao n-octanol e os coeficientes estimadores ($b_0, b_1, b_2, b_{11}, b_{22}, b_{12}$) são calculados para as respectivas variáveis mostradas na tabela acima.

As matrizes utilizadas para cálculo dos coeficientes do modelo são mostradas abaixo:

$$X = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & -1 & 1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 0 & -1 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & 1 & 0 \\ 1 & 1 & -1 & 1 & 1 & -1 \\ 1 & 1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 & 1 & 1 & 1 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad Y = \begin{pmatrix} 101,46 \\ 69,77 \\ 67,81 \\ 29,32 \\ 32,37 \\ 54,84 \\ 20,80 \\ 32,17 \\ 0 \\ 27,14 \\ 28,57 \end{pmatrix}$$

$$(X'X)^{-1} = \begin{pmatrix} 0,2632 & 0 & 0 & -0,1579 & -0,1579 & 0 \\ 0 & 0,1667 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,1667 & 0 & 0 & 0 \\ -0,1579 & 0 & 0 & 0,3947 & -0,1053 & 0 \\ -0,1579 & 0 & 0 & -0,1053 & 0,3947 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,25 \end{pmatrix}$$

$$(X'Y) = \begin{pmatrix} 464,247 \\ -186,064 \\ -28,938 \\ 292,016 \\ 274,231 \\ 12,848 \end{pmatrix} \quad (X'X)^{-1}(X'Y) = \begin{pmatrix} 32,765 \\ -31,011 \\ -4,823 \\ 13,099 \\ 4,207 \\ 3,212 \end{pmatrix}$$

Logo, os coeficientes calculados para cada variável da Tabela 5 é dado por:

$$b_0 = 32,765; b_1 = -31,011; b_2 = -4,823;$$

$$b_{11} = 13,099; b_{22} = 4,207; b_{12} = 3,212$$

Logo, o erro para cada coeficiente é alcançado a partir da relação matemática abaixo:

$$\sqrt{(X^t X)^{-1} \cdot s^2_{(agrup)}} \quad (13)$$

Sendo o valor da variância para a triplicata no ponto central igual a $s^2 = 7,3018$, o erro é calculado utilizando os valores da diagonal principal da matriz $(X^t X)^{-1}$, como é mostrado abaixo:

$$\text{ERRO} = 7,3018 \cdot \begin{pmatrix} 0,2632 & 0 & 0 & -0,1579 & -0,1579 & 0 \\ 0 & 0,1667 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0,1667 & 0 & 0 & 0 \\ -0,1579 & 0 & 0 & 0,3947 & -0,1053 & 0 \\ -0,1579 & 0 & 0 & -0,1053 & 0,3947 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0,25 \end{pmatrix}$$

O modelo proposto a partir dos coeficientes fornecidos relação $(X^t X)^{-1}(X^t Y)$ mostrada anteriormente é dado por:

$$y = 32,765(\pm 1,386) - 31,011(\pm 1,103)x_1 - 4,823(\pm 1,103)x_2 + 13,099(\pm 1,698)x_1^2 + 4,207(\pm 1,698)x_2^2 + 3,212(1,351)x_1x_2 \quad (14)$$

4.2.2 Análise da variância para ajuste do modelo

Para saber se o modelo proposto pode ser realmente usado como um bom modelo de previsão para sistema estudado deve-se realizar análise da variância e verificar se há evidências de falta de ajuste neste modelo matemático (NETO *et al.* 2007).

A análise da variância do modelo foi realizada utilizando método dos mínimos quadrados e os estimadores dos parâmetros foram analisados conforme resultados apresentados na tabela 6.

Tabela 6: Tabela de análise de variância para o ajuste, pelo método dos mínimos quadrados de um modelo linear nos parâmetros. Onde: n= n° total de observações, p= n° de parâmetros do modelo, m= n° distintos de níveis da variável independente.

Fonte	Soma Quadrática	G. L.	Média Quadrática
Modelo	$SQ_{reg} = \sum n_i [(y_e)_i - y_m]^2$	p-1	$MQ_{reg} = SQ_{reg} / (p-1)$
Residual	$SQ_r = \sum \sum [y_{ij} - (y_e)_i]^2$	n-p	$MQ_r = SQ_r / (n-p)$
Falta de Ajuste	$SQ_{faj} = \sum n_i [(y_e)_i - y_{im}]^2$	m-p	$MQ_{faj} = SQ_{faj} / (m-p)$
Erro Puro	$SQ_{ep} = \sum \sum (y_{ij} - y_{im})^2$	n-m	$MQ_{ep} = SQ_{ep} / (n-m)$
Total	$SQ_t = \sum \sum (y_{ij} - y_m)^2$	n-1	

$$F_{calc} = MQ_{faj} / MQ_{ep} \quad F_{tab} (\alpha=0,01; v=3,2) = 99,16 \quad *(p=6; n=11; m=9)$$

Fonte: NETO *et al.*, 2007.

A análise da variância do modelo foi calculada e, como o valor de F calculado (70,29) foi menor que o de F tabelado (99,16), pode-se afirmar que para o intervalo de confiança de 99%, não há evidência de falta de ajuste no modelo. Logo, o modelo proposto pode ser usado como uma boa previsão do comportamento do sistema dentro do intervalo estipulado.

Para saber a significância de cada efeito no sistema, deve-se utilizar a seguinte relação matemática:

$$b_x \pm (\text{erro}_x \cdot t_{(2;0,01)}) \quad (15)$$

Onde b_x é o coeficiente estimador para cada variável, $erro_x$ é o erro de cada coeficiente obtido através da Equação 9, $t_{(2;0,01)}$ é o valor de *t-student* com 2 graus de liberdade e para o intervalo de 99% de confiança.

Caso o valor do coeficiente b_x for menor que produto entre o erro dos coeficientes e *t-student*, ou seja, o zero estiver contido neste intervalo, pode-se dizer que o efeito referente aos fatores não são significativos para o modelo (NETO *et al.*, 2007). Sendo assim, o módulo dos valores dos coeficientes linear ($b_1 = 31,011$) e quadrático ($b_1^2 = 13,099$) referentes ao fator Brij 35 são maiores que o produto dos seus respectivos erros (1,103 e 1,698) pelo valor de *t-student* para o intervalo estimado ($t_{(2;0,01)} = 9,925$), sendo, portanto, a variável Brij 35 significativa para o modelo matemático implementado. Entretanto, o mesmo fato não pode ser observado para os valores em módulo dos coeficientes linear ($b_2 = 4,823$), quadrático ($b_2^2 = 4,207$) e para o coeficiente referente à interação Brij 35/n-octanol ($b_{12} = 3,212$), uma vez que os valores para os respectivos coeficientes são **menores** que o produto dos seus respectivos erros (1,103; 1,698 e 1,351) pelo valor de *t-student* para o intervalo estimado ($t_{(2;0,01)} = 9,925$), logo, o zero estará contido no intervalo e o efeitos referentes ao n-octanol linear, quadrático ou interagindo com Brij 35 não serão significativos para o modelo implementado. Tal informação é útil no que diz respeito à interação de cada fator e sua importância na composição do eletrólito.

Uma vez implementado o modelo matemático e, verificado que não há evidência de falta de ajuste para o modelo no de intervalo de confiança estipulado, pôde-se implementar uma superfície de resposta e uma curva de nível que ajudam a delinear o planejamento proposto entre os pontos analisados, como mostram as Figuras 18 e 19.

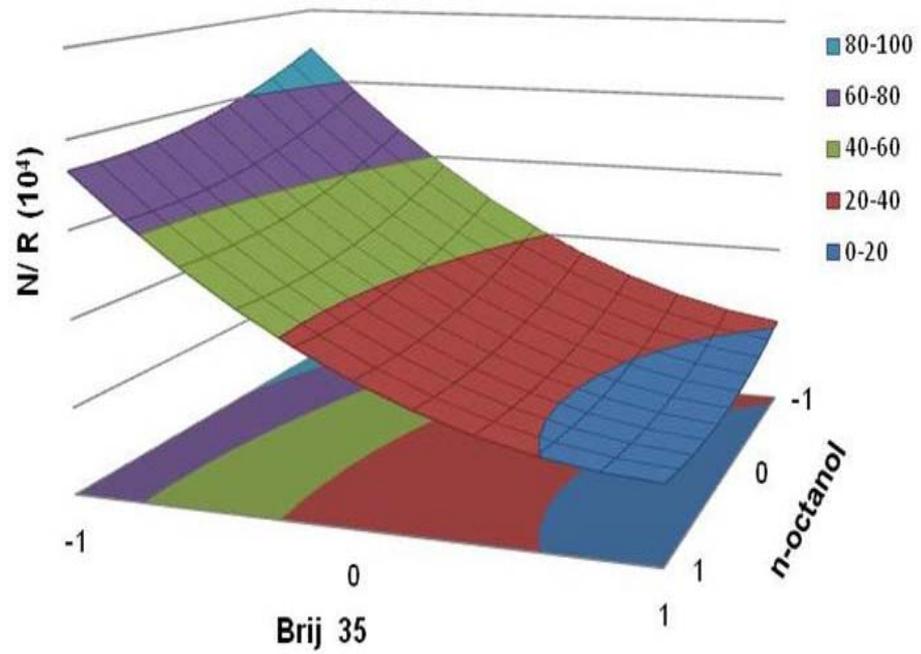


Figura 18: Superfície de resposta para o planejamento fatorial 3^2 .

Fonte: O autor.

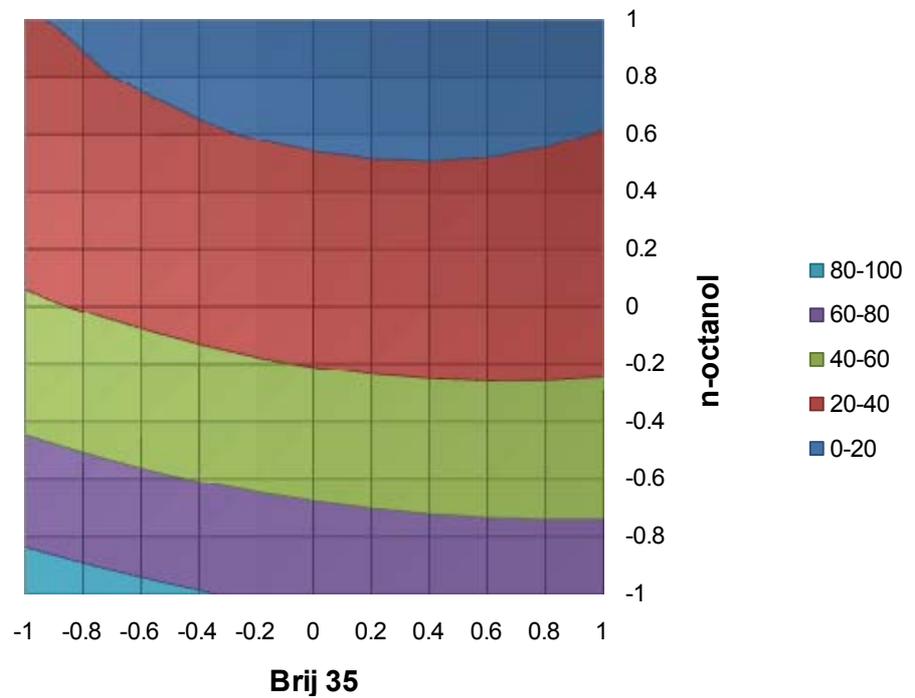


Figura 19: Curva de nível para planejamento fatorial 3^2 . A resposta é a razão entre número de pratos (N) e ruído normalizado (R).

Fonte: O autor.

Após a análise dos resultados obtidos pelo planejamento de experimentos, conclui-se que o fator Brij 35 afeta o sistema com maior impacto que o fator n-octanol, fato que pode ser comprovado analisando os valores da razão N/R e os coeficientes do modelo proposto. Em nível intermediário de Brij, não há variações muito significativas à medida que os níveis de n-octanol variam. Níveis altos de Brij e n-octanol ocasionaram a formação de microbolhas no sistema, impossibilitando a realização da corrida. A interação Brij 35 e n-octanol é sempre negativa quando estes fatores se encontram simultaneamente em níveis contrários.

O planejamento propiciou também a escolha dos níveis de Brij 35 e n-octanol mais favoráveis ao sistema, ou seja, os níveis inferiores nos dois fatores (8,0 mmol L⁻¹ de Brij 35 e 1,5% de n-octanol) correspondem à maior resposta (N/R). Sendo, portanto, o eletrólito otimizado nas condições: **15,0 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ / Na₂HPO₄; Brij 8,0 mmol L⁻¹, SDBS 4,0 mmol L⁻¹, n-octanol 1,5% v/v, acetonitrila 45% v/v.**

O estudo envolvendo planejamento fatorial foi de extrema importância na escolha dos níveis “ótimos” dos fatores em questão, uma vez que foi possível variar os dois fatores ao mesmo tempo e entender a importância de cada um no sistema estudado. Entretanto, mesmo com a melhora no perfil eletroforético do sistema após a otimização das variáveis Brij 35 e n-octanol, o objetivo de separação ainda não havia sido completamente atingido, pois a resolução do par crítico (C18:1 9t/ C18:1 9c) ainda não tinha alcançado o valor mínimo aceitável de 1,50.

A primeira otimização univariada empregada na tentativa de melhorar a resolução foi diluir a amostra saponificada no próprio eletrólito, mas o houve um aumento considerável no ruído da linha base e não demonstrou nenhuma evolução significativa no perfil de separação do par crítico analisado, como mostra o eletroferograma abaixo:

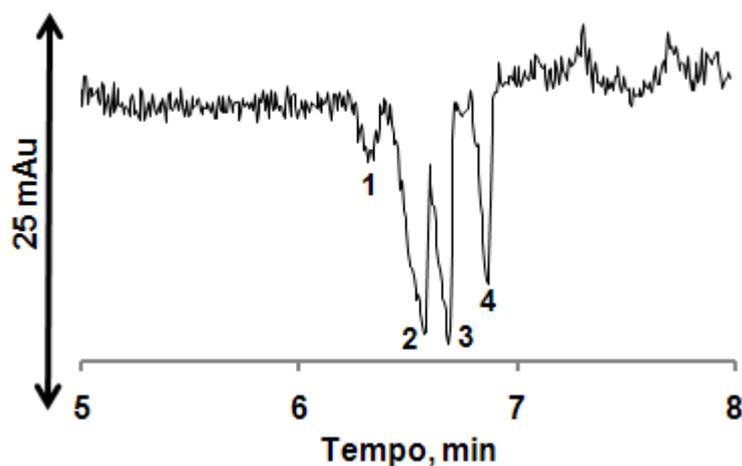


Figura 20: Eletroferograma de amostra de GVH diluída em eletrólito constituído por: $15,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$; Brij $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$, SDBS $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$, n-octanol 1,5% v/v, acetonitrila 45% v/v. Picos: 1- C18:0, 2- C18:1 9t, 3- C18:1 9c, 4- C16:0. **Condições de análise:** injeção 5 segundos a 12,5 mbar, voltagem de +28 kV, temperatura do cartucho de 25°C e detecção indireta em 224 nm.

Fonte: O autor.

A segunda otimização univariada levou em consideração o estudo realizado por espectroscopia Raman, onde a possibilidade de adição de maior proporção de solvente orgânico ao eletrólito condutor foi evidenciada na presença do tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$. Sendo assim, optou-se por acrescentar metanol ao eletrólito já que as amostras e os padrões eram diluídos neste solvente. A adição de etanol também foi avaliada, uma vez que sua toxicidade é menor que a do metanol e, se o resultado fosse favorável, o uso desse solvente seria mais benéfico ao usuário.

Optou-se por testar pequenas quantidades de solvente orgânico para evitar perturbações abruptas na estabilidade da linha base do sistema. Para isso, utilizaram-se proporções de 5% v/v, 8% v/v e 10% v/v de metanol acrescentadas ao eletrólito constituído até então por: $15,0 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$; Brij $8,0 \text{ mmol L}^{-1}$, SDBS $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$, n-octanol 1,5% v/v, acetonitrila 45% v/v.

4.3 Estratégias para otimização do sistema

Os eletroferogramas da **figuras 21, 22 e 23** apresentam uma amostra de gordura vegetal hidrogenada (GVH) analisada com eletrólito citado anteriormente acrescido de 5%, 8% e 10% v/v, respectivamente, de metanol. Observa-se que não houve melhora significativa na separação do par crítico em questão nos eletroferogramas das **figuras 21 e 23**. Entretanto, a visualização do eletroferograma correspondente à **figura 22** mostra que a separação dos pares eláidico e oléico alcança a linha base, fato que até então não tinha sido alcançado com nenhum outro eletrólito testado.

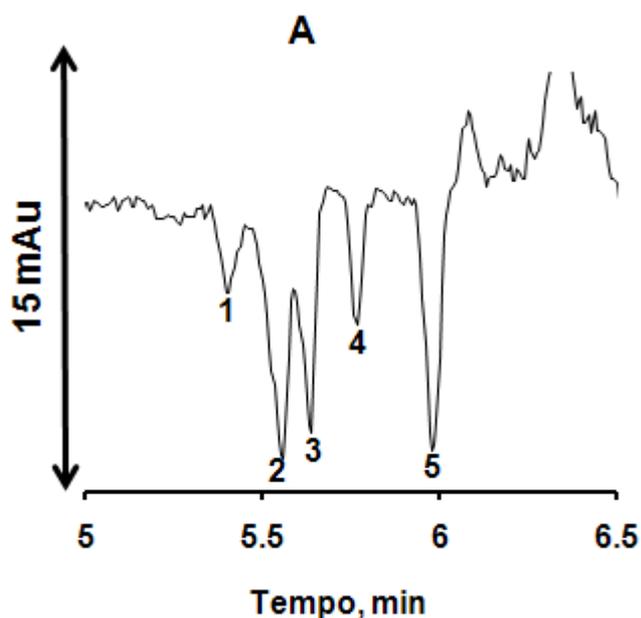


Figura 21: Eletroferograma de amostra de GVH diluída em metanol (1) C18:0, (2) C18:1 9t, (3) C18:1 9c, (4) C16:0. Eletrólito constituído por: 15,0 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ / Na₂HPO₄; Brij 8,0 mmol L⁻¹, SDBS 4,0 mmol L⁻¹, n-octanol 1,5% v/v, acetonitrila 45% v/v e **5% metanol v/v**. Condições de análise: injeção 5 segundos a 12,5 mbar, voltagem de +28Kv, temperatura do cartucho de 25°C e detecção indireta em 224 nm.

Fonte: O autor.

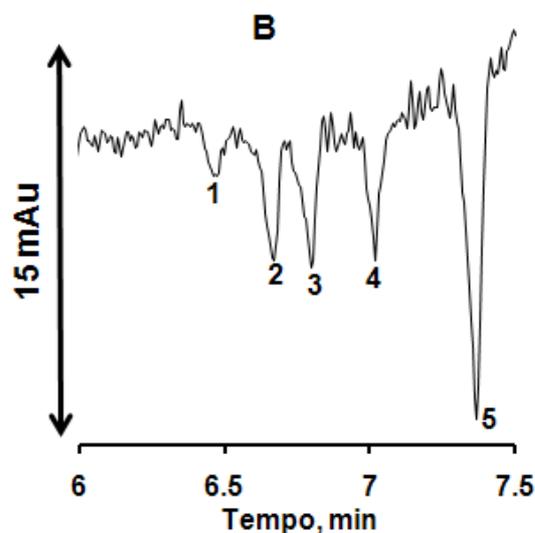


Figura 22: Eletroferograma de amostra de GVH diluída em metanol (1) C18:0, (2) C18:1 9t, (3) C18:1 9c, (4) C16:0. Eletrólito constituído por: 15,0 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ / Na₂HPO₄; Brij 8,0 mmol L⁻¹, SDBS 4,0 mmol L⁻¹, n-octanol 1,5% v/v, acetonitrila 45% v/v e **8% metanol v/v**. Condições de análise: injeção 5 segundos a 12,5 mbar, voltagem de +28Kv , temperatura do cartucho de 25°C e detecção indireta em 224 nm.

Fonte: O autor.

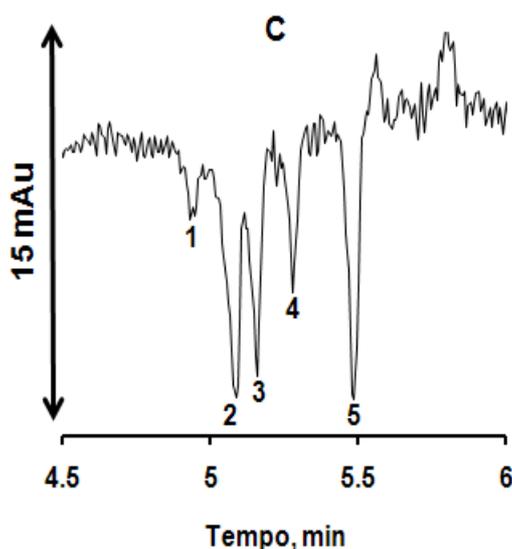


Figura 23: Eletroferograma de amostra de GVH diluída em metanol (1) C18:0, (2) C18:1 9t, (3) C18:1 9c, (4) C16:0. Eletrólito constituído por: 15,0 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ / Na₂HPO₄; Brij 8,0 mmol L⁻¹, SDBS 4,0 mmol L⁻¹, n-octanol 1,5% v/v, acetonitrila 45% v/v e **10% metanol v/v**. Condições de análise: injeção 5 segundos a 12,5 mbar, voltagem de +28Kv , temperatura do cartucho de 25°C e detecção indireta em 224 nm.

Fonte: O autor.

Tomando como base o bom resultado obtido com o eletrólito acrescido de 8% de metanol, fez-se uma terceira otimização univariada com a mesma proporção de etanol na expectativa de que os resultados fossem semelhantes no intuito de trabalhar com um solvente menos tóxico. Entretanto, a utilização do etanol não apresentou resultados vantajosos, pois promoveu a formação de um precipitado com aspecto gelatinoso logo após o processo de saponificação impossibilitando a análise e, com relação à composição do eletrólito, o acréscimo de etanol não melhorou a separação do par crítico (picos 2 e 3) como mostra o eletroferograma da figura 24.

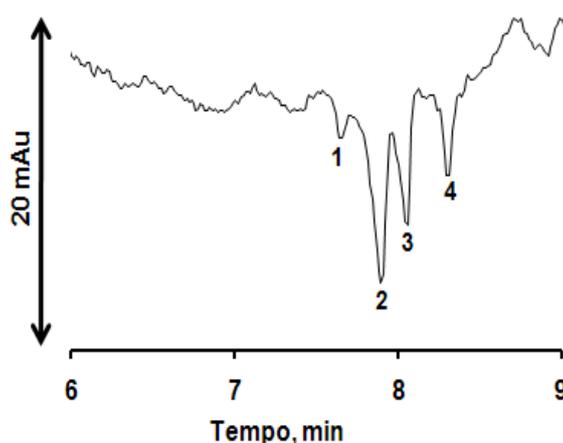


Figura 24: Eletroferograma de amostra de GVH diluída em metanol (1) C18:0, (2) C18:1 9t, (3) C18:1 9c, (4) C16:0. Eletrólito constituído por: 15,0 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ / Na₂HPO₄; Brij 8,0 mmol L⁻¹, SDBS 4,0 mmol L⁻¹, n-octanol 1,5% v/v, acetonitrila 45% v/v e **8% etanol v/v**. Condições de análise: injeção 5 segundos a 12,5 mbar, voltagem de +28Kv, temperatura do cartucho de 25°C e detecção indireta em 224 nm.

Fonte: O autor.

Como já foi dito anteriormente, o melhor eletroferograma foi obtido com adição de 8% de metanol ao eletrólito (Figura 22). Entretanto, para confirmar que realmente ocorre melhor separação com o eletrólito em questão, deve-se verificar a resolução do par crítico *ácido eláidico/ ácido oléico*, utilizando a expressão matemática mostrada na equação 12.

$$R_{S_{\text{elaídico/oleico}}} = \frac{2(\text{tr}_{\text{oleico}} - \text{tr}_{\text{elaídico}})}{(W_{\text{elaídico}} + W_{\text{oleico}})} \quad (12)$$

O valor obtido para resolução entre o par ácido elaídico e ácido oléico encontrado foi de 1,51, ou seja, o valor encontrado foi maior que o mínimo aceitável para uma separação completa entre dois picos adjacentes, fato inédito na análise destes ácidos utilizando esta metodologia. Sendo assim, a adição de 8.0% de metanol ao eletrólito possibilitou a separação total para o par crítico em questão, com ruído aceitável, boa estabilidade de linha base e curto tempo de análise (Figura 25). Estabelecendo, portanto, a condição ótima com **15.0 mmol L⁻¹ de KH₂PO₄/Na₂HPO₄, 4.0 mmol L⁻¹ SDBS, 8.0 mmol L⁻¹ Brij 35, 45%v/v ACN, 1.5% v/v n-octanol e 8% v/v metanol.**

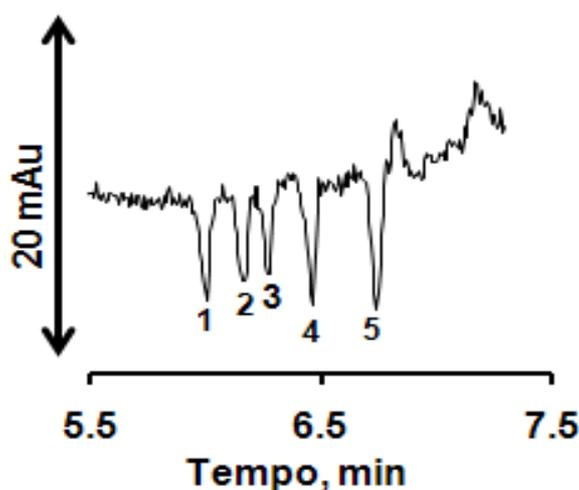


Figura 25: Eletroferograma de padrões de ácidos graxos 1- C18:0, 2- C18:1 9t, 3- C18:1 9c, 4- C16:0, 5- C15:0 (PI), todos com concentração de 0,50 mmol L⁻¹. Eletrólito constituído por: 15,0 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ / Na₂HPO₄; Brij 8,0 mmol L⁻¹, SDBS 4,0 mmol L⁻¹, n-octanol 1,5% v/v, acetonitrila 45% v/v e 8% metanol v/v. Condições de análise: injeção 5 segundos a 12,5 mbar, voltagem de +28Kv, temperatura do cartucho de 25°C e detecção indireta em 224 nm.

Fonte: O autor.

4.4 Cálculos do fator de resposta e verificação da falta de ajuste do modelo

Uma vez otimizada a metodologia que permitiu a separação eficiente dos ácidos graxos elaídico (C18:1 9t) e oléico (C18:1 9c) em padrões (resolução calculada entre estes pares adjacentes foi maior que 1,5), a etapa seguinte foi calcular o fator de resposta utilizando uma curva de calibração, verificar a linearidade do modelo matemático proposto e, se o modelo não apresentar falta de ajuste, aplicá-lo na análise de amostras alimentícias amplamente consumidas pela população e que já possuam um histórico de *trans* em suas formulações.

Sendo assim, a proposta de quantificação do teor de *trans* total nas amostras de gordura vegetal hidrogenada, requeijão e margarina foi baseada no cálculo de um fator de resposta (R_f), descrito pela equação matemática 13.

$$\frac{A_{C18:1t}}{[C18:1t]} = R_f \frac{A_{C15:0}}{[C15:0]} \quad (16)$$

Onde: $A_{C18:1t}$ é a área correspondente ao C18:1t, $A_{C15:0}$ é a área correspondente ao padrão interno (PI) C15:0, $[C18:1t]$ é a concentração de C18:1t em mmol/L e $[C15:0]$ é a concentração do padrão interno (PI).

Para cálculo do fator de resposta, elaborou-se uma curva de calibração com padrões de elaídico preparados em cinco níveis de concentração: 1- 0,30; 2- 0,40; 3- 0,50; 4- 0,60; 5- 0,70 mmol L⁻¹ e a utilização do ácido pentadecanóico (C15:0) como padrão interno, cuja concentração foi fixada em 0,50 mmol L⁻¹.

O modelo descritivo foi obtido a partir de triplicatas autênticas para cada nível de concentração da curva e forneceu como resultado uma curva analítica para a razão das áreas ($A_{C18:1t}/A_{C15:0}$) versus a razão das concentrações ($[C18:1t]/[C15:0]$) como mostra a Figura 26.

A equação obtida a partir do modelo, bem como os erros para cada parâmetro foram calculados pelo método dos mínimos quadrados. Sendo

$y(\pm 0,025) = 0,642(\pm 0,023)x + 0,003(\pm 0,026)$ a equação e apresentando um coeficiente de correlação (r) igual a 0,992.

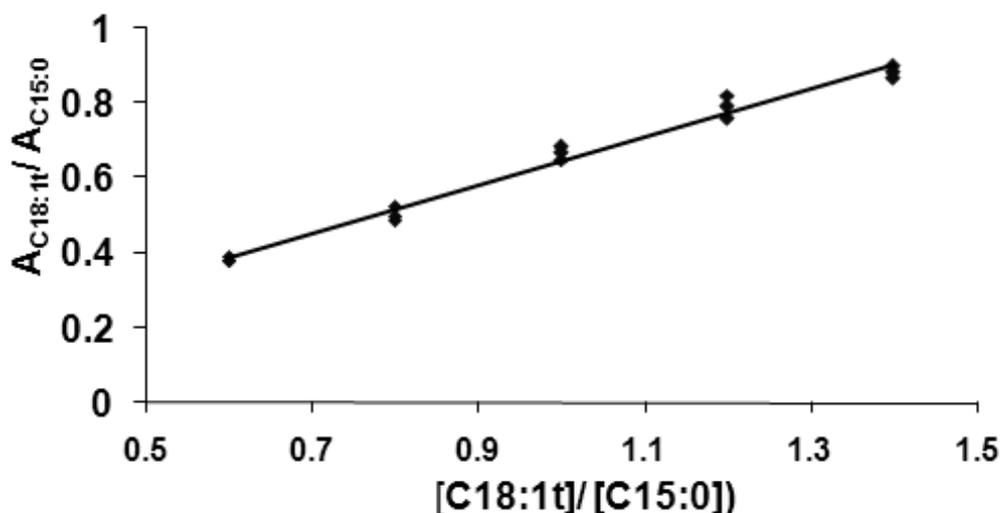


Figura 26: Curva analítica de calibração para a razão das áreas ($A_{C18:1t}/A_{C15:0}$) versus a razão das concentrações ($[C18:1t]/[C15:0]$).

Fonte: O autor.

Para que o modelo possa ser usado de maneira correta na quantificação das amostras, sua linearidade deve ser verificada e não apresentar falta de ajuste. Para isso, utilizou-se Teste de hipótese *a priori* recomendado pela IUPAC (DANZER & CURRIE, 1998).

$$F_{\text{calculado}} = \frac{S_{y,x}^2}{S_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p-2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / (m-p)} \quad (17)$$

Onde: m_i = número de medidas de cada ponto ($m_i=3$); p = número de pontos ($p=5$); $m = m_i \times p$ ($m=15$).

Se o valor calculado de F_{calc} ($p-2, m-p$) for **menor** que o valor de F_{tabelado} dentro do intervalo estimado, não haverá falta de ajuste no modelo e o coeficiente

angular da equação obtida poderá ser usado como fator de resposta para quantificação de *trans* em amostras.

Os resultados obtidos para cada réplica e utilizados para verificação da falta de ajuste do modelo estão reunidos na Tabela 6.

Tabela 7: Tabela com os valores das réplicas obtidas para a curva de calibração

[C18:1t]/[C15:0]	$A_{C18:1t}/A_{C15:0}$	$A_{C18:1t}/A_{C15:0}$	$A_{C18:1t}/A_{C15:0}$
	1ª réplica	2ª réplica	3ª réplica
0,6	0,39	0,38	0,38
0,8	0,49	0,52	0,49
1,0	0,65	0,68	0,67
1,2	0,76	0,79	0,82
1,4	0,90	0,87	0,88

$$F_{\text{tabelado}}(0,05; 3,10) = 3,71; F_{\text{calculado}}(0,05; 3,10) = 3,46$$

Fonte: O autor.

Como o valor de F calculado (3,46) foi menor que o de F tabelado (3,71), pode-se afirmar que para o intervalo de 95% estimado, não há evidência de falta de ajuste no modelo implementado e, portanto, o fator de resposta (Rf) **0,64** pode ser utilizado para quantificar *trans* total em amostras alimentícias de acordo com a equação (16).

Após a implementação da curva de calibração com padrões, obtenção do fator de resposta e verificação da linearidade do método proposto, as seguintes amostras alimentícias foram analisadas: gordura vegetal hidrogenada (marcas A e B), margarina de uso culinário, requeijão com gordura vegetal hidrogenada A, requeijão com GVH e biscoito recheado sabor morango (análise somente do

recheio). Segue abaixo, na figura 27, a fotografia tirada das amostras analisadas no dia das análises realizadas por eletroforese capilar.

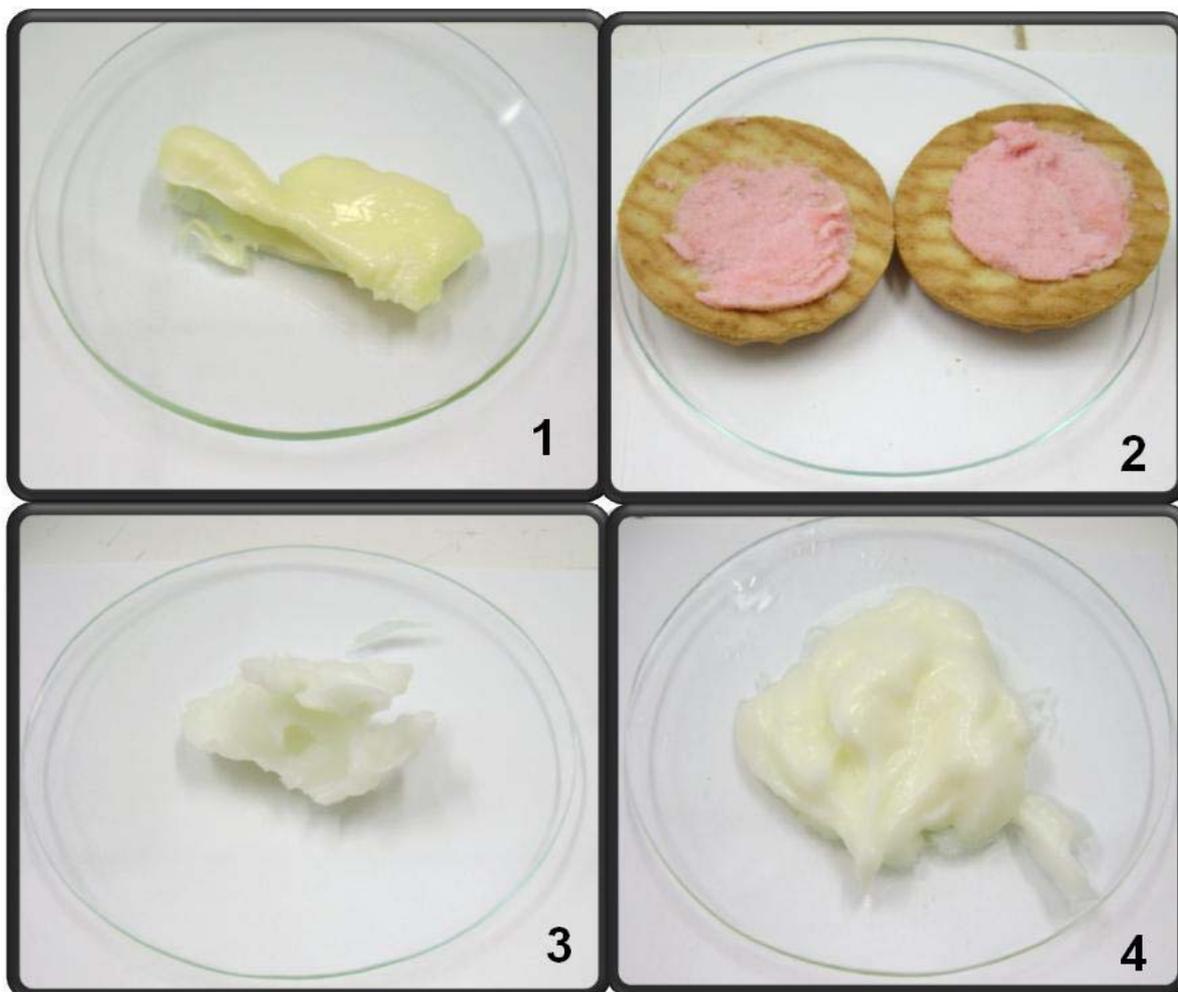


Figura 27: Fotografia das amostras analisadas por eletroforese capilar. 1- Margarina de uso culinário, 2- Biscoito recheado sabor morango, 3- Gordura vegetal hidrogenada A (GVH - A), 4- Requeijão cremoso com GVH – A.

Fonte: O autor.

A presença de eláidico na amostra de gordura vegetal hidrogenada foi confirmada por adição de padrão, como mostra o eletroferograma abaixo.

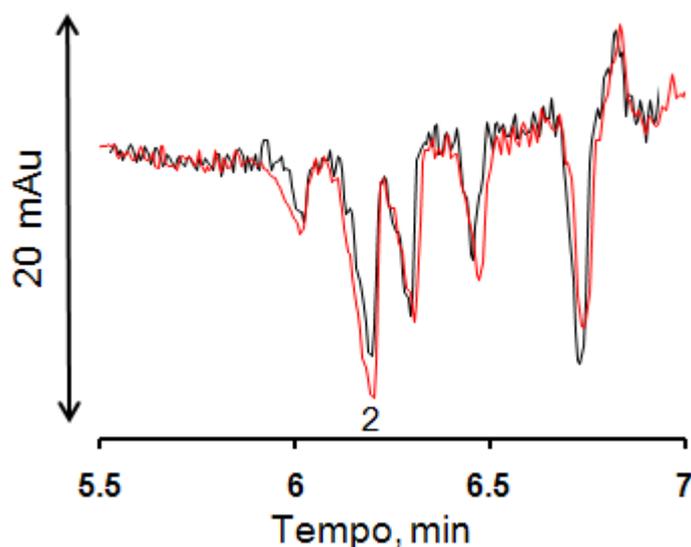


Figura 28: Eletroferograma para confirmação da presença de eláidico na amostra de GVH (pico 2). **Eletroferograma em preto** é referente à amostra e **eletroferograma em vermelho** é referente à amostra dopada com padrão de C18:1 9t. **Eletrólito:** 15 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ / Na₂HPO₄, SDBS 4,0 mmol L⁻¹, Brij 35 8,0 mmol L⁻¹, ACN 45% v/v, MeOH 8% v/v e n-octanol 1,5%. **Condições operacionais:** injeção de 5 segundos a 12,5 mbar, voltagem aplicada de +28Kv, temperatura controlada no interior do cartucho a 25°C e detecção indireta em 224 nm.

Fonte: O autor.

Seguem abaixo os eletroferogramas obtidos para as amostras analisadas utilizando o eletrólito otimizado:

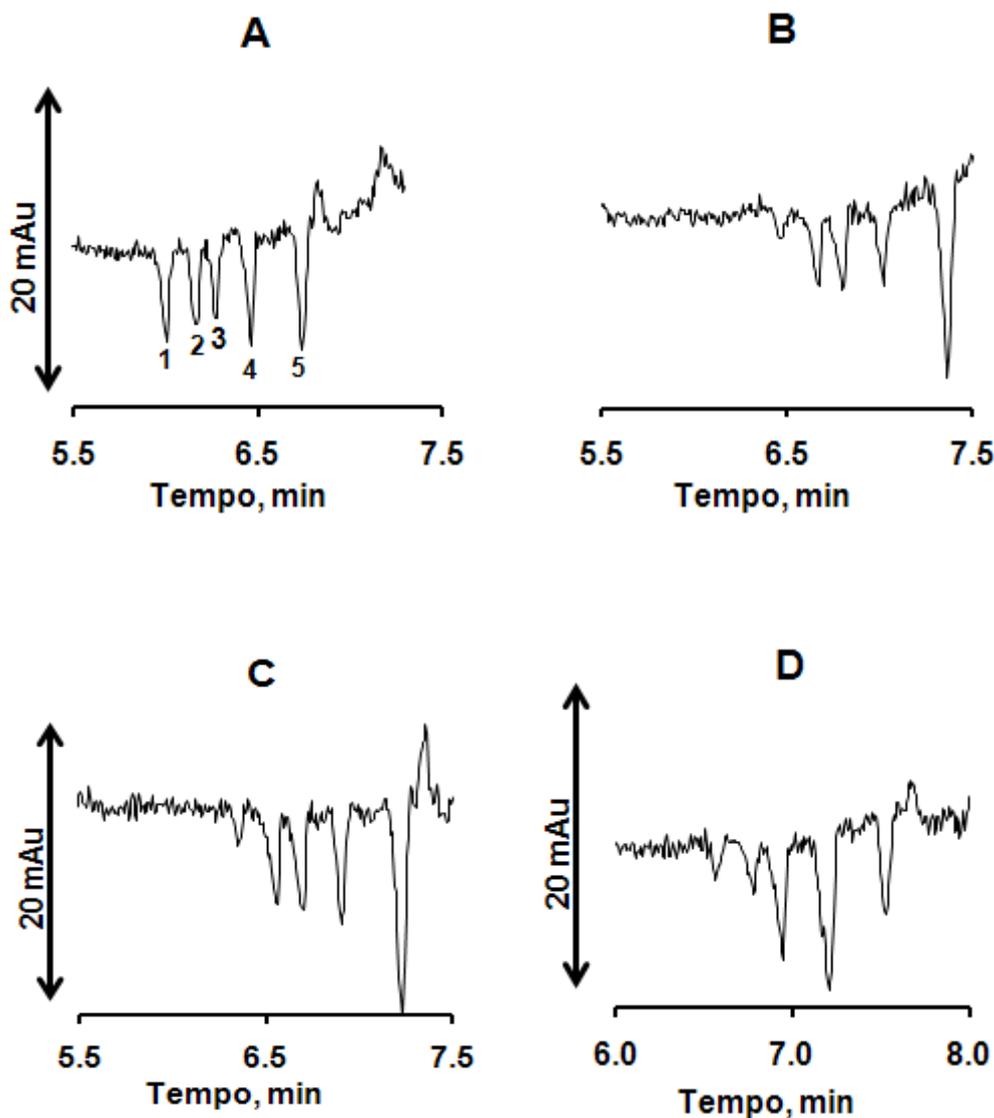


Figura 29: **A-** Eletroferogramas de padrões de ácidos graxos 1- C18:0, 2- C18:1 9t, 3- C18:1 9c, 4- C16:0, 5- C15:0 (PI), todos com concentração de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$. **B-** Eletroferograma da amostra de GVH A. **C-** Eletroferograma da amostra de requeijão. **D-** Eletroferograma da amostra de margarina. **Condições operacionais:** injeção de 5 segundos a 12,5 mbar, Voltagem aplicada de +28Kv, temperatura controlada no interior do cartucho a 25°C e detecção indireta em 224 nm. Eletrólito: $15 \text{ mmol L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ / Na_2HPO_4 , $4 \text{ mmol L}^{-1} \text{ SDBS}$, $8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Brij 35}$, 45% v/v ACN, 8% v/v MeOH e 1,5% n-octanol.

Fonte: O autor.

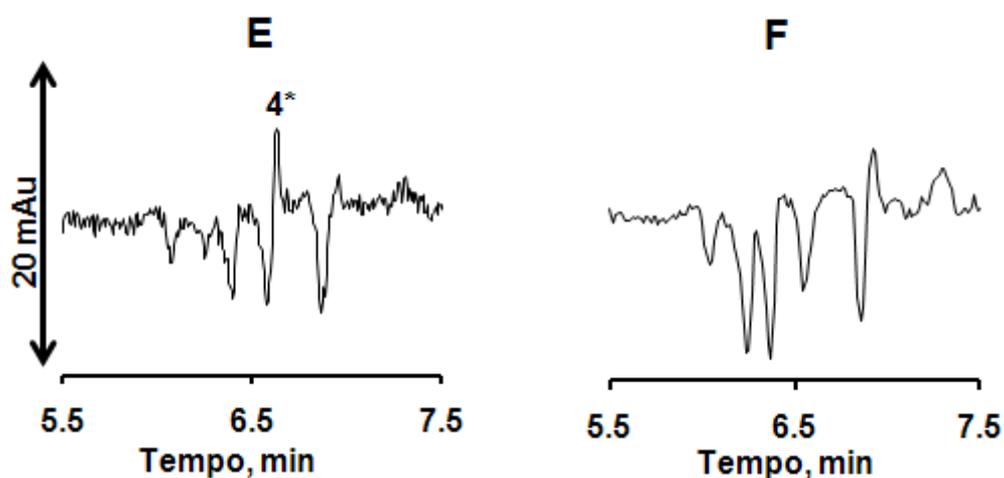


Figura 30: E- Eletroferograma da amostra de margarina 4*- C18:2 cc (em 206 nm), F- Eletroferograma da amostra de GVH B. **Condições operacionais:** injeção de 5 segundos a 12,5 mbar, Voltagem aplicada de +28Kv, temperatura controlada no interior do cartucho a 25°C e detecção indireta em 224 nm. Eletrólito: 15 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ / Na₂HPO₄, 4 mmol L⁻¹ SDBS, 8 mmol L⁻¹ Brij 35, 45% v/v ACN, 8% v/v MeOH e 1,5% n-octanol.

Fonte: O autor.

Não foi possível analisar réplicas da amostra de biscoito recheado devido a problemas no equipamento, logo, não foi possível calcular desvio padrão da medida e estabelecer comparação com o valor de referência, sendo tomado como um **estudo exploratório**. Entretanto, a análise foi realizada e mesmo com o ruído da linha base acima do ideal, a resolução entre o par crítico elaídico / oléico foi maior que o mínimo desejável para uma separação completa possibilitando a quantificação do teor de trans. Na lista de ingredientes presentes no biscoito recheado contém gordura vegetal hidrogenada e a tabela nutricional presente no rótulo refere o teor de trans como 1,70 g *trans*/ porção de 30 g de biscoito. O valor encontrado na análise por CE fornece o teor de trans como 1,59 g *trans* / porção, indicando que o método pode ser eficiente na quantificação de trans total em matrizes bem distintas. As réplicas para esse tipo de amostra serão feitas em momento oportuno.

A figura abaixo mostra o eletroferograma obtido na análise do biscoito recheado.

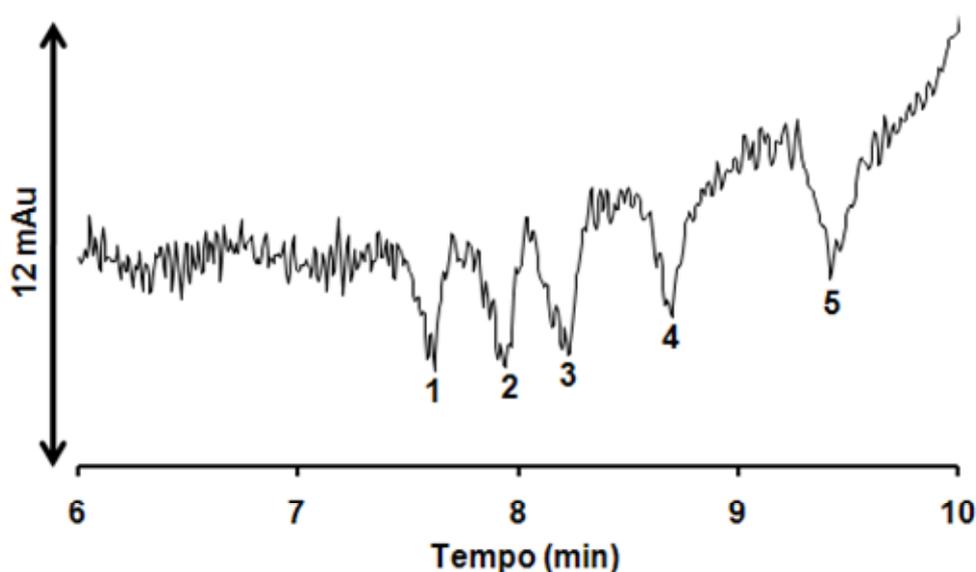


Figura 31: Eletroferograma de amostra de biscoito recheado sabor morango 1- C18:0, 2- C18:1 9t, 3- C18:1 9c, 4- C16:0, 5- C15:0 (PI).
Eletrólito: 15 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ / Na₂HPO₄, 4 mmol L⁻¹ SDBS, 8 mmol L⁻¹ Brij 35, 45% v/v ACN, 8% v/v MeOH e 1,5% n-octanol.
Condições operacionais: injeção de 5 segundos a 12,5 mbar, voltagem aplicada de +28Kv, temperatura controlada no interior do cartucho a 25°C e detecção indireta em 224 nm.

Fonte: O autor.

O percentual de trans total em amostras alimentícias pode ser calculado através de um rearranjo da equação 1, resultando na equação dada por:

$$\%trans = \frac{A_{C18:1t} \cdot [C_{15:0}] \cdot v \cdot MM_{C18:1t}}{Rf \cdot A_{C15:0} \cdot m} \cdot 100 \quad (18)$$

Onde: $A_{C18:1t}$ é a área correspondente ao C18:1t, $A_{C15:0}$ é a área correspondente ao padrão interno (PI) C15:0, $[C18:1t]$ é a concentração de C18:1t em mmol L⁻¹, $[C15:0]$ é a concentração do padrão interno fixada em 0,5 mmol L⁻¹, $MM_{C18:1t}$ é a massa molar do ácido elaídico em g/mol, m é a massa de amostra pesada em miligramas, v é o volume utilizado para diluir a massa de amostra em litros e Rf é o fator de resposta obtido pela curva do modelo descritivo obtido com padrões.

É importante ressaltar que, do ponto de vista prático, a utilização do cálculo do fator de resposta é de grande utilidade no procedimento de quantificação de trans (elaídico) em diferentes matrizes, uma vez que basta a utilização de C15:0 como padrão interno na concentração $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ adicionado na amostra para que a concentração do analito de interesse seja obtida utilizando a relação matemática (18), não havendo necessidade da implementação de uma nova curva de calibração para cada amostra distinta.

Uma informação que deve ser considerada em relação ao processo de integração dos picos para obtenção das áreas dos ácidos graxos e que auxilia na parametrização (padronização) da integração para todas as amostras, é que a largura dos picos medida a meia altura (*width*), exemplificado na figura 32, foi em torno de 0,05 para o ácido elaídico e de 0,04 para o ácido pentadecanóico em todas as amostras quantificadas.

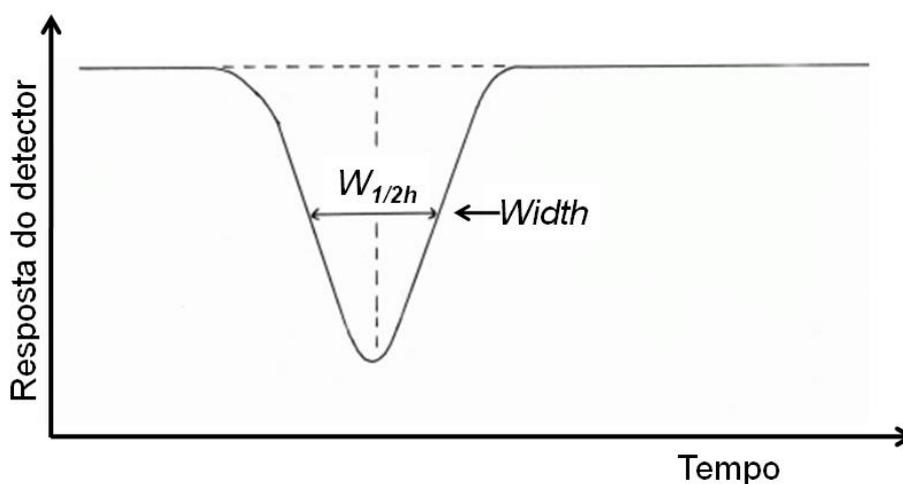


Figura 32: Representação da medida da largura dos picos medidos a meia altura (*width*) em um eletroferograma genérico.

Fonte: O autor.

A Tabela 8 resume algumas informações a respeito das amostras analisadas em réplicas autênticas.

Tabela 8: Resultados da quantificação, cálculo da resolução entre o par crítico e número de pratos teórico do ácido elaídico.

Amostras	Trans total (% m/m)	Desvio Padrão^{&}	LOQ (mmol L⁻¹)	Resolução do par C18:1t / C18:1c	Nº de pratos/m C18:1t (10⁴)
GVH A	18,99	1,03	0,215	1,51	41,98
GVH B	28,68	1,77	0,547	1,55	53,82
Margarina	8,71	0,74	0,538	1,52	51,80
Requeijão A	0,90	0,04	0,202	1,51	56,90
Requeijão B	3,89	0,09	0,351	1,51	47,60
Biscoito recheado*	5,29	-	0,586	1,51	25,90

[&]réplicas autênticas

*Biscoito recheado sabor morango (apenas o recheio foi analisado). Apenas uma medida foi realizada.

Fonte: O autor.

4.5 Comparação entre a metodologia otimizada por CE e o método oficial AOCS Ce 1h-05

Após a otimização da metodologia por CE, fez-se a comparação com o método oficial Ce 1h-05 aprovado e recomendado pela agência internacional *American Oil Chemist's Society* (AOCS) para amostra de gordura vegetal hidrogenada (GVH).

O método oficial Ce 1h-05 utiliza cromatografia gás/líquido (GLC) com coluna capilar de sílica de 100 metros com fase estacionária composta por um filme líquido

de cyanopropylpolysiloxano com 0,25 μm de espessura, temperatura da coluna constante a 180°C e detector de ionização de chama (FID). Todo o procedimento de análise foi realizado pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ na cidade de São Paulo.

A amostra de GVH foi submetida à etapa de metilação de acordo com HARTMAN & LAGO, conforme descrito no item 3.3.2. deste trabalho. As seis réplicas autênticas foram injetadas no cromatógrafo gasoso de acordo com as condições especificadas no método oficial. A figura 33 mostra um dos cromatogramas obtidos para análise da amostra.

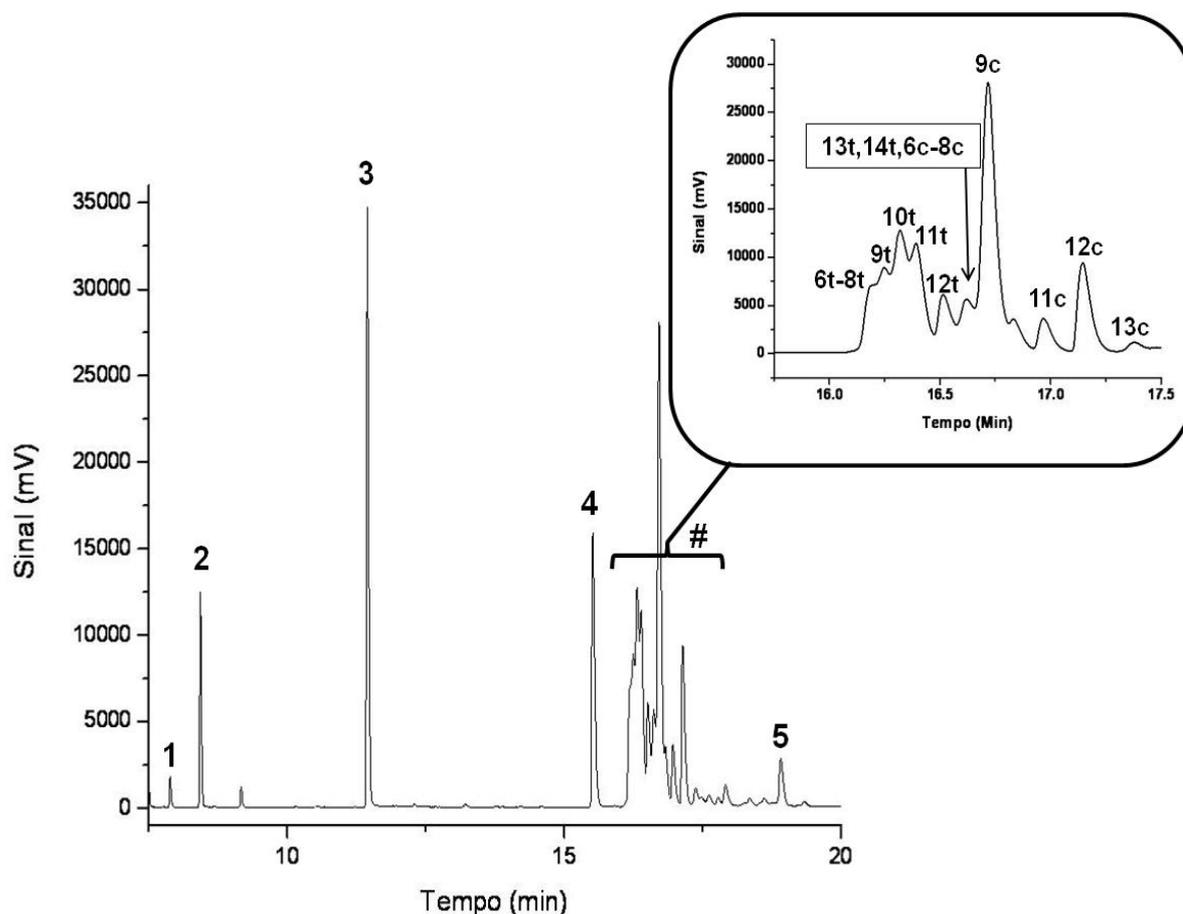


Figura 33: Cromatograma dos ésteres metílicos de ácidos graxos da gordura vegetal hidrogenada em análise por GC/FID. **1-** 12:0; **2-** 13:0 (padrão interno); **3-** 16:0; **4-** 18:0, **#** Região de isômeros cis/trans do 18:1; **5-** 18:2 c/c. **# Expansão parcial do cromatograma da região cis/trans.** Condições cromatográficas: temperatura da coluna mantida isotermicamente a 180°C, temperatura do injetor e detector mantida a 250°C; gás de arraste hidrogênio ultra puro e pressão de 170kPa exercida na coluna, detector de ionização de chama, coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de cyanopropylpolysiloxano (CP-7420™, 100 m x 0,25 mm id, 0,25 μm).

Fonte: O autor.

Os picos são identificados por GC por comparação entre os tempos de retenção da amostra e os padrões metílicos (FAMEs), juntamente com a injeção do padrão interno (FAME 13:0) e por comparação com cromatograma de amostras de referência de gordura vegetal hidrogenada (ver figura 5.16 do Official Method AOCS Ce1h-05).

Fator de resposta apropriado foi calculado para converter as porcentagens de área dos picos em porcentagem de massa dos componentes da amostra (% m/m na amostra). O fator de resposta foi calculado teoricamente para cada FAME, com a ajuda de um cromatograma obtido da análise da mistura de padrões de ésteres metílicos de composição conhecida, nas mesmas condições de análise da amostra e expresso em função do éster metílico do ácido palmítico (K_{C16}) (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005).

Os resultados obtidos por CE e por GC estão resumidos na tabela abaixo.

Tabela 9: Resultados da comparação entre cromatografia gasosa (GC) e eletroforese capilar (CE) para amostra de gordura vegetal hidrogenada.

<i>Amostras</i> <i>(réplicas autênticas)</i>	<i>GC</i> <i>(%m/m)</i>	<i>CE</i> <i>(%m/m)</i>
1	27,51	29,0
2	27,85	31,28
3	27,44	29,84
4	29,51	28,57
5	30,39	25,52
6	31,4	27,88
Média	29,02	28,68
Desvio padrão	1,67	1,77

Fonte: O autor.

Antes de comparar os métodos, deve-se averiguar se os dados obtidos seguem uma distribuição normal (gaussiana). Para verificar a normalidade dos dados, utiliza-se o teste de Shapiro-wilk ($n < 50$).

✓ **Teste de normalidade (Shapiro-Wilk)**

$$W_{\text{calc}} = \frac{\left(\sum a_i (X_{(n+1)-i} - X_i) \right)^2}{\sum (X_i - \bar{X})^2} \quad (19)$$

Onde n é o número de medidas, i varia de 1 a $n/2$ e a_i é uma constante tabelada.

❖ GC (Intervalo de 95% de confiança e $n=6$)

$$W_{\text{calc}} = 0,867$$

$$W_{\text{tab}} = 0,788$$

$$p\text{-value} = 0,25$$

❖ CE (Intervalo de 95% de confiança e $n=6$)

$$W_{\text{calc}} = 1,457$$

$$W_{\text{tab}} = 0,788$$

$$p\text{-value} = 0,92$$

Para que os dados sejam considerados de acordo com uma distribuição normal, o valor calculado deve ser **MAIOR** que o valor tabelado para o intervalo estimado ou **p-value** fornecido pelo software estatístico SPSS para normalidade ser maior que **0,05** no intervalo estabelecido de 95%. Logo, tanto os valores obtidos por CE quanto por GC seguem uma distribuição normal e testes estatísticos paramétricos podem ser usados para comparação.

Como as amostras analisadas por GC e por CE são as mesmas (alíquota retirada do frasco e enviada para análise por GC), sabe-se que as amostras são

independentes e a escolha do teste estatístico *t-student* deve levar em consideração a possibilidade de agrupar as variâncias dos dois métodos.

- ✓ **Teste F** para verificar homocedasticidade (Intervalo de 95% de confiança)

$$F_{\text{calc}} = \frac{S_{\text{CE}}^2}{S_{\text{GC}}^2} \quad (20)$$

$$\diamond F_{\text{calc}} = 1,12$$

$$F_{\text{tab}(5,5)} = 5,05$$

$$p\text{-value: } 1,29$$

Para que as variâncias possam ser agrupadas, o valor calculado de F deve ser menos que o valor tabelado ou **p-value** fornecido pelo software estatístico SPSS para homocedasticidade ser maior que **0,05** no intervalo estabelecido de 95%. Como o valor de F calculado foi menor que o tabelado, as variâncias são consideradas iguais e podem ser agrupadas de modo que o teste estatístico indicado para a comparação entre os métodos de análise é o teste ***t-student agrupado***.

- ✓ **Teste *t-student* para variâncias agrupadas.**

$$t_{\text{calc}} = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S_{\text{agrup}} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad (21)$$

$$S_{\text{agrup}} = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}} \quad (22)$$

$$\diamond t_{\text{calc}} = 0,312$$

$$t_{\text{tab}}(0,05; 5) = 2,751$$

$$p\text{-value: } 2,23$$

Como o valor de *t-student* calculado foi menor que o valor tabelado ($t_{\text{calc}} = 0,312 < t_{\text{tab}}(0,05; 5) = 2,751$) e o valor do *p-value* correspondente fornecido pelo software estatístico foi maior que 0,05 no intervalo estimado de 95%, pode-se dizer que **não há diferenças significativas** entre os resultados obtidos pelo método oficial **AOCS Ce 1h-05** e o método otimizado **por eletroforese capilar** neste trabalho. Os resultados obtidos pelos dois métodos podem ser ressaltados pelo gráfico mostrado na Figura 34.

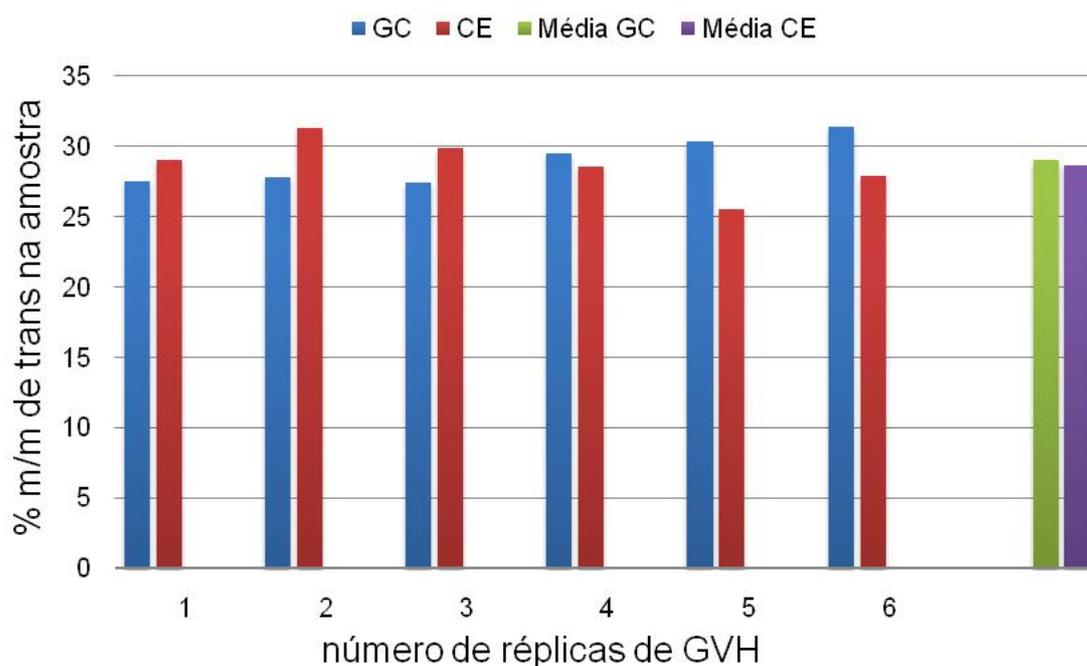


Figura 34: Gráfico do teor de trans em amostras de gordura vegetal hidrogenada (GVH) comparando o método oficial por cromatografia à gás (GC) com o método implementado por eletroforese capilar (CE).

Fonte: O autor.

Portanto, a metodologia otimizada neste trabalho apresentou bons resultados para determinação de trans total nas amostras alimentícias propostas, não

apresentou diferenças significativas quando comparado com o método oficial AOCS Ce 1h-05 para amostra de gordura vegetal hidrogenada e oferece grande potencial para análise de diferentes amostras. Cabe ressaltar, que as amostras analisadas apresentam uma matriz com relevante grau de complexidade e o método otimizado por CE apresenta como vantagens em comparação aos métodos clássicos (GC, por exemplo), curto tempo de análise (8 minutos), ausência de passos de derivatização e uso de colunas capilares não específicas.

5 CONCLUSÃO

Foi proposta uma metodologia alternativa para quantificação do teor de trans total em amostras alimentícias por CZE sob detecção indireta por UV. Um estudo da influência dos cátions presentes na composição do tampão fosfato foi realizado mediante espectroscopia Raman, sendo que o estudo evidenciou que na presença do tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ocorre uma incorporação diferenciada de solvente no meio, formando “microambientes” ricos em solvente orgânico, fato de interesse, uma vez que os ácidos graxos em questão são solúveis em solventes orgânicos. Logo, optou-se por trabalhar com o tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ na constituição do eletrólito.

Mesmo com a mudança no tampão do eletrólito, a resolução do par *cis/trans* ainda não alcançava o valor mínimo de 1,50, logo, alguns parâmetros do sistema ainda deveriam ser otimizados para que a separação total do ácido elaídico e ácido oléico pudesse ser obtida. Utilizou-se, portanto, um planejamento fatorial completo 3^2 como ferramenta auxiliar na otimização de dois componentes do eletrólito, Brij 35 e n-octanol, uma vez que algumas características do eletrólito em questão já eram conhecidas. A resposta analisada foi a razão entre número de pratos do C18:0 e ruído normalizado, sendo que ficou evidente que os níveis inferiores (-1,-1) para ambos os fatores forneceram a melhor resposta ($N/R=101,5 \cdot 10^4$). Além disso, a partir dos coeficientes do modelo proposto e da análise da tabela 2 é possível perceber que o Brij 35 é mais significativo que o n-octanol para a resposta analisada na composição do eletrólito. Os eletroferogramas do estudo envolvendo planejamento de experimentos, também auxiliaram na escolha do melhor padrão interno a ser usado, optando-se pelo ácido pentadecanóico frente ao ácido tridecanóico.

Após a escolha dos níveis de Brij 35 e n-octanol e baseado na espectroscopia Raman, optou-se por aumentar a fração de solvente orgânico (acréscimo de 8% de metanol) no eletrólito de modo a melhorar ainda mais a resolução do par *cis/trans*. Sendo, portanto, o eletrólito otimizado composto por: **15 mmol L⁻¹ KH₂PO₄ / Na₂HPO₄; 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS, 8,0 mmol L⁻¹ de Brij 35, 45% v/v ACN, 8% v/v MeOH e 1,5% n-octanol.**

Com o eletrólito otimizado, realizou-se análise das amostras alimentícias de gordura vegetal hidrogenada (GVH), margarina, requeijão e biscoito recheado, obtendo valores de resolução suficiente para a quantificação das amostras, além de parâmetros como número de pratos para o ácido elaídico e limite de quantificação.

O método otimizado foi comparado com a metodologia oficial AOCS *Ce 1h-05* para amostra de gordura vegetal hidrogenada. A análise por cromatografia foi realizada pelo Instituto Adolfo Lutz, sendo que os valores encontrados para os dois métodos não apresentaram diferenças significativas para um intervalo estimado de 95% de confiança, evidenciando a potencialidade do método otimizado por eletroforese capilar. Cabe ressaltar que a metodologia por CE não apresenta passos de derivatização, faz uso de colunas não - específicas e possui um curto tempo de análise (8 minutos).

Os resultados apresentados nesta dissertação já renderam um artigo publicado na revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (ACS) e possui grande potencial para outros trabalhos e publicações, inclusive como parte do meu projeto de doutorado proposto. O artigo citado está em anexo.

Portanto, o método otimizado neste trabalho mostrou-se adequado na quantificação do teor total de trans em diferentes amostras alimentícias sem passos de extração e derivatização, levando em consideração a alta complexidade das matrizes envolvidas, mostrando-se como um método simples e promissor na utilização para controle da qualidade de alimentos.

REFERÊNCIAS

American Oil Chemist's Society. **Official Methods and Recommended Practices of the AOCS**. Urbana, USA: Champaign (IL): AOCS, 5th ed. Additions and revisions 1999-2006. Method *Ce 1h-05*.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA - RDC 359/03

ARO A., VAN-AMELSVOORT J., BECKER W., VAN ERP-BAART M. A., KAFATOS A., LETH T. Trans fatty acids in dietary fats and oils from 14 European countries: the TRANSFAIR Study. **Journal of Food Composition Analysis**, Amsterdam, Netherlands, v. 11, p. 137-49, 1998

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. New York: A Wiley Interscience publication. 1995, p. 1-51.

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**, Weinheim, Germany, v. 31, no 14, p. 2667-2676, 2008.

BANSAL, G., ZHOU, W. B., TAN, T. W., NEO, F. L., LO, H. L., Analysis of trans fatty acids in deep frying oils by three different approaches. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v.116, p. 535-541, 2009.

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

BLIGH, E.G., DAYER, W., J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, Canadian, v. 37, p. 911-917, 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**, Amsterdam, Netherlands, v. 985, p. 471-478, 2003.

BRAITHWAITE, A., SMITH, F.J. **Chromatographic Methods**. Netherlands: Kluwer Academics Publishers, 1999.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA.** Alimentos: Resolução - RDC 360 de 23 de dezembro de 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 07 maio 2008.

BRONDZ, I. Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography and related techniques. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, Netherlands, v. 465, p. 1-37, 2002.

CURI, R., POMPEIA, C., MIYASAKA, C. K., PROCOPIO, J. **Entendendo a Gordura – Os ácidos graxos.** São Paulo: Manole, 2002.

DANZER, K., CURRIE, L. A. Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry Part 1: Fundamentals and Single Component Calibration. **International Union of Pure and Applied Chemistry**, North Carolina, USA, v. 70, p. 993-1014, 1998.

DELMONTE, P., RADER, J. I. Evaluation of gas chromatographic methods for the determination of *trans* fat. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, Germany, v. 389, p. 77-85, 2007.

DESTAILLATS, F., GOLAY, P. A., JOFFRE, F., WISPELAERE, M., HUG, B., GIUFFRIDA, F., FAUCONNOT, L., DIONISI, F. Comparison of available analytical methods to measure trans-octadecenoic acid isomeric profile and content by gas-liquid chromatography in milk fat. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, Netherlands, v. 1145, p. 222-228, 2007.

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**, Amsterdam, Netherlands, v. 694, p. 471-479, 1995.

ERKKILÄ A., DE MELLO V.D., RISÉRUS U., LAAKSONEN D. E. Dietary fatty acids and cardiovascular disease: an epidemiological approach. **PubMed**, Bethesda, USA, v. 47, p. 172-187, 2008.

UNITED STATES OF AMERICA. Food labeling: trans fatty acids in nutrition labeling, nutrient content claims, and health claims. **FDA - Final rule**, v. 68, p. 41433-41506, 2003.

FOLCH, J., LEES M., SLOANE, S. G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, USA, v. 226, p. 497-509, 1957.

GARDINER, D. J. **Practical Raman spectroscopy.** New York: Springer-Verlag, 1989.

GATTÁS, G., BRUMANO, G. Ácido linoléico conjugado (CLA). **Revista Eletrônica Nutritime**, Viçosa, Brasil, v. 2, p. 164-171, Jan/Fev 2005.

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**, Gaithersburg, USA, v. 92, no. 5, p. 1301-1309, 2009.

GUNSTONE F. **Fatty Acid and Lipid Chemistry**, London: Blackie Academic & Professional, 1996.

GUNSTONE, F. **The chemistry of oils and fat**. London: Blacwell Publising, CRC Press, 2004.

HARTMAN, L., LAGO, R. A. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, UK, v. 22, no. 8, p. 475-97, 1973.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: ANVISA, 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Animal and vegetable Fats and Oils Preparation of methyl esters of fatty acids, **ISO Method 5509**, Geneva, 2004.

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: 07 jan. 2009.

JAKOBSEN, M. U., OVERVAD, K., DYERBERG J., HEITMANN B. Intake of ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease. **International Journal of Epidemiology**, Oxford, UK, v. 37, p. 173-182, 2008.

JUANÉDA, P. Utilization of reversed-phase high-performance liquid chromatography as an alternative to silver-ion chromatography for the separation of cis- and trans-C18:1 fatty acid isomers. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, Netherlands, v. 954, p.285-289, 2002.

JUANÉDA, P., LEDOUX, M., SÉBÉDIO, J. L. Analytical methods for determination of trans fatty acid content in food. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, Germany, v. 109, p. 901-917, 2007.

KANNAMKUMARATH, S. S., WROBEL, K., WROBEL, K., B'HYMER, C., CARUSO, J. A. Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: an attractive complementary technique for elemental speciation analysis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, Netherlands, v. 975, p. 245-266, 2002.

KIM, Y., HIMMELSBACH, D. S., KAYS, S. E. ATR-Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy for Determination of trans Fatty Acids in Ground Cereal Products without Oil Extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 55, p. 4327-4333, 2007.

KOLB, B., ETTRE, L. S. **Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and practice**. New Jersey: Wiley Interscience. 2nd ed., 2006.

KUMMEROW, F. A., MAHFOUZ, M. M., ZHOU, Q. Trans fatty acids in partially hydrogenated soybean oil inhibit prostacyclin release by endothelial cells in presence of high level of linoleic acid. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**. New York, v. 84, p.138-153, 2007.

KUMMEROW, F. A. The negative effects of hydrogenated trans fats and what to do about them. **Atherosclerosis**. Amsterdam, v. 205, p. 458–465, 2009.

KRAMER, J. K. G., HERNANDEZ, M., CRUZ-HERNANDEZ, C. Combining Results of Two GC Separations Partly Achieves Determination of All cis and trans 16:1, 18:1, 18:2 and 18:3 Except CLA Isomers of Milk Fat as Demonstrated Using Ag-Ion SPE Fractionation. **Lipids**, Columbia, USA, v. 43, p. 259-273, 2008.

LANDERS, J. P. **Handbook of High Performance Capillary Electrophoresis**, New York: CRC Press, 1993.

LI, T., ZHANG W., LEE, R. Z., ZHONG, Q. Nickel-boron alloy catalysts reduce the formation of trans fatty acids in hydrogenated soybean oil. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 114, p. 447-452, 2009.

LIU, X., CAO, Y., CHEN, Y. Separation of conjugated linoleic acid isomers by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, Netherlands, v. 1095, p. 197-200, 2005.

MICHA R., MOZAFFARIAN D. Trans fatty acids: effects on metabolic syndrome, heart disease and diabetes. **Nature Reviews Endocrinology**. New York, v. 5, p. 335-344, 2009.

MILLER, J. M., McNAIR, H. M. **Basic Gas Chromatography**. New Jersey: Wiley-Interscience. 2^{sd} ed., 2009.

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

MORRISON, R., BOYD, R. **Química orgânica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 7th ed., p. 1253, 1981.

MOSSOBA, M. M., MILOSEVIC, V., MILOSEVIC, M., KRAMER, J. K. G., AZIZIAN, H. Determination of total trans fats and oils by infrared spectroscopy for regulatory compliance. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Heidelberg, GE, v. 389, p. 87-92, 2007.

NETO, B. B., SCARMINIO, I. S., BRUNS. R. E. Como fazer experimentos. 3rd ed. Campinas: 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 Chromatography A**, Amsterdam, Netherlands, v. 924, p. 533-539, 2001.

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**, Weinheim, GE, v. 24, p. 1641-1647, 2003.

OLIVEIRA, M. A. L. Análise de ácidos graxos em óleos e gorduras por eletroforese capilar. 2003. **Tese (Doutorado em Química Analítica)** - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

OTIENO, A. C., MWONGELA, S. M. Capillary electrophoresis based methods for the determination of lipids - A review. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, Netherlands, v.624, no.2, p. 163-174, 2008.

PLACZEK, G. Rayleigh-Streuung und Raman-Effekt. **Handbuch der Radiologie**. Verlagsgesellschaft, v. 6, p. 205, 1934.

RATNAYAKE, W. M. N. Overview of Methods for the Determination of trans Fatty Acids by Gas Chromatography, Silver-Ion Thin-Layer Chromatography, Silver-Ion Liquid Chromatography, and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Heidelberg, GE, v. 87, p. 523-539, 2004.

REIMERS, J. R., HALL, L. E[†]. The Solvation of Acetonitrile. **Journal of the American Chemists Society**, Washington, DC, v. 121, p. 3730-3744, 1999.

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**, Amsterdam, Netherlands, v. 708, p. 339-350, 1995.

SALA O. Uma molécula didática. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 914-920, 2008.

SILVA, F. O., FERRAZ, V. Double use of microwaves in fatty acid preparation for elaidic acid determination as phenacyl ester using high-performance liquid chromatography in Brazilian fat products. **Talanta**, Amsterdam, Netherlands, v. 68, p. 643-645, 2006.

SILVA, J. A. F., COLTRO, W. K. T., CARRILHO, E., TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 740-744, 2007.

SUN Q. M. A. J., CAMPOS H. H. U. F. B. Plasma and erythrocyte biomarkers of dairy fat intake and risk of ischemic heart disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, USA, v. 86, p. 929-937, 2008.

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**, Amsterdam, Netherlands, v. 1024, p. 245-254, 2004.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 19, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M., COLOMBARA, R., MASSARO, S. Simultaneous determination of anions by capillary electrophoresis: characteristics and applications. **Química Nova**, São Paulo, v. 20, p. 512-518, 1997.

TAVELLA M. T., PETERSON G., ESPECHE M., CAVALLERO E., CIPOLLA L., PEREGO L., CABALLERO B. Trans fatty acid content of a selection of foods in Argentina. **Food Chemistry**, Amsterdam, Netherlands, v. 69, p. 209-213, 2000.

VAN POPPEL G., VAN ERP-BAART M., LETH T., GEVERS E., VAN AMELSVOORT J., LANZMANN-PETITHORY D., KAFATOSE, A., ARO, A. Trans fatty acids in foods in Europe: the TRANSFAIR Study. **Journal of Food Composition Analytical**, Amsterdam, Netherlands, v. 11, p. 112-136, 1998.

**APÊNDICE – Artigo publicado pelo
“Journal of Agricultural and Food Chemistry”**