



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

PATRÍCIA MENDONÇA DE CASTRO BARRA

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM AMOSTRAS
ALIMENTÍCIAS E BIOLÓGICAS UTILIZANDO ELETROFORESE
CAPILAR DE ZONA**

JUIZ DE FORA

2014

PATRÍCIA MENDONÇA DE CASTRO BARRA

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM AMOSTRAS
ALIMENTÍCIAS E BIOLÓGICAS UTILIZANDO ELETROFORESE
CAPILAR DE ZONA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Química.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Departamento de Química - UFJF

CO-ORIENTADORA: Prof^{ta}. Dra. Céphora Maria Sabarense

Departamento de Nutrição - UFJF

Dedico esta tese à memória do meu pai
Francisco, eterno amigo e exemplo de vida...

Agradecimentos

A Deus, pois sem Ele eu não seria nada.

Ao meu saudoso pai, Francisco, pelo seu exemplo de luta e por todo esforço dedicado ao longo da sua vida para que eu pudesse me tornar uma pessoa de bons princípios e aguerrida para alcançar meus objetivos de maneira íntegra.

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

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

Aos meus sobrinhos, Laura, Henrique, Lavínia e Davi, por tornarem a minha vida mais alegre e cheia de luz.

Ao meu grande amor, Marcelo, por estar ao meu lado em todos os momentos, pelos conselhos profissionais, por acreditar em mim e por tornar minha vida mais especial.

Aos meus familiares, que mesmo longe nunca deixaram de me apoiar.

A minha amiga, Renata, pela compreensão, pela amizade incondicional e por todos os momentos de alegria.

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.

A minha co-orientadora, Céphora, pela amizade, pelo conhecimento e pela oportunidade de desbravar um “mundo novo”.

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

Às colegas, Danielle Aragão, Francine e Patrícia Lopes, pela ajuda inestimável durante e depois do período de experimentação animal.

Aos meus colegas dos outros laboratórios e instituições, 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.

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

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

“Façamos da interrupção um caminho novo,
da queda um passo de dança,
do medo uma escada,
do sonho uma ponte,
da procura um encontro.”

(Fernando Sabino)

RESUMO

Um método alternativo para a análise simultânea dos ácidos graxos (AG) majoritários *cis-trans*: esteárico (C18:0), eláídico (C18:1*t*), oleico (C18:1*c*), palmítico (C16:0), linoleico (C18:2*cc*) e linolênico (C18:3*ccc*), foi proposto utilizando a técnica de eletroforese capilar de zona (CZE) com detecção indireta. A metodologia foi otimizada através do planejamento composto central rotacional 2^3 (2^3 -CCD) e após estudos, juntamente com a Análise de Componentes Principais (PCA), chegou-se a um eletrólito com condições ótimas, composto por: 15,0 mmol L⁻¹ de tampão NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ com pH ≈ 6,86, 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS, 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35, 45% v/v de acetonitrila e 2,1 % de 1-octanol. A quantificação dos AG em amostras reais foi realizada através do cálculo de fator de resposta (F_R) com a posterior verificação da linearidade dos modelos matemáticos propostos. O método de CZE foi aplicado com sucesso e nenhuma diferença significativa foi encontrada dentro de intervalo de confiança de 95% quando comparado com a metodologia oficial por cromatografia à gás (GC) para as amostras alimentícias do tipo: azeite de oliva, óleo de soja, gordura vegetal hidrogenada, manteiga, margarina, requeijão e biscoito recheado.

Além da utilização da metodologia para análise de amostras alimentícias, foi também aplicada na determinação AG no fígado de ratos *Wistar* de três grupos, que consumiram dietas, cuja fração lipídica era composta por óleo de soja utilizado por diferentes períodos de tempo em processos de fritura por imersão. Após 45 dias consumindo essas dietas, os ratos foram submetidos à eutanásia e o teor de AG no fígado foi monitorado por CZE. Os resultados obtidos foram comparados com o método oficial por cromatografia à gás e não foram observadas diferenças significativas no intervalo de confiança de 95% e/ou 99%. Os resultados dos eletroferogramas do fígado dos ratos foram avaliados por PCA, sendo possível obter um reconhecimento de padrão e discriminar o grupo final dos grupos intermediários e controle e, indicando que o tempo de exposição total de óleo submetido a processos de fritura pode ser considerado relevante para a avaliação da qualidade do óleo.

Tendo observada diferença no teor de AG no fígado dos grupos de animais, buscou-se verificar possíveis biomarcadores para o metabolismo celular e, considerando que alguns elementos atuam como cofatores para a atividade enzimática, determinados minerais foram avaliados em amostras de fígado e fêmur dos ratos *Wistar* envolvidos no estudo supracitado, utilizando a técnica de espectroscopia de emissão atômica com plasma indutivamente

acoplado (ICP OES). Sabe-se que todos os animais envolvidos neste estudo receberam a mesma quantidade de selênio e de mesma origem (Mix mineral). Entretanto, os animais pertencentes ao grupo final apresentaram uma diminuição considerável no teor de selênio quando comparados aos grupos controle e intermediário. Logo, pode-se dizer que a interação do selênio com outros componentes da dieta (AG) foi alterada, uma vez que os animais deste trabalho foram afetados distintamente pela dieta, apresentando uma grande dispersão nos valores de selênio no grupo final. A diminuição no teor de selênio do grupo final pode estar relacionada com a diminuição da função antioxidante, já que os processos de oxidação geram também compostos altamente reativos, que em excesso aumentam o estresse oxidativo de estruturas celulares.

Palavras-chave: ácidos graxos, eletroforese capilar, cromatografia a gás, ratos *Wistar*.

ABSTRACT

An alternative method for the simultaneous analysis majority of *cis/trans* fatty acids (FA): stearic (C18:0), elaidic (C18:1 *9t*), oleic (C18:1 *9c*), palmitic (C16:0), linoleic (C18: 2 *9c 12c*) and linolenic (C18: 3 *9c 12c 15c*) by Capillary Zone Electrophoresis (CZE) with indirect detection was proposed. The methodology was optimized through central composite rotational design 2^3 (CCD - 2^3) and after studies, along with the Principal Component Analysis (PCA), the electrolyte with optimum conditions, consisted of 15.0 mmol L^{-1} $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ buffer at $\text{pH} \approx 6.86$, 4.0 mmol L^{-1} SDBS, 8.3 mmol L^{-1} Brij 35, 45 % v/v acetonitrile and 2.1 % 1-octanol. The FA quantification in real samples was performed by calculating the response factor (R_f) with the subsequent linearity of the proposed mathematical models verification. The CZE method was successfully applied and no significant difference was found within the range of 95 % when compared with the official method by gas chromatography (GC) for food samples such as: olive oil, soybean oil, hydrogenated vegetable fat, butter, margarine, spreadable cheese and filled cookie.

In addition to the use of the methodology for analysis of food samples was also applied to FA determination in the *Wistar* liver rat three groups and fed diets whose lipid fraction was composed of soybean oil used for different stages of time for deep frying processes. After 45 days consuming these diets, the rats were euthanized and the content of FA in liver was monitored by CZE. The results were compared with the official method by GC and no significant differences were observed in the range of 95 % and/or 99 % of confidence interval. The results of the rat liver electropherograms were evaluated by PCA, it was possible to obtain a recognition pattern and to discriminate the final group of the intermediate and control groups, indicating that total exposure time subjected to oil deep frying processes may be relevant for evaluating the quality of the oil.

After detecting differences in the content of FA in the liver of animal groups, we required to verify potential biomarkers for cellular metabolism and, whereas some elements act as cofactors for enzyme activity, certain minerals were evaluated in samples of *Wistar* liver and femur rat involved in the study mentioned above, using the technique of Inductively Coupled Plasma Optic Emission Spectroscopy (ICP OES). It is known that all animals involved in this study received the same amount of selenium from the same origin (Mineral Mix). However, the animals belonging to the late group showed a significant decrease in

selenium content in comparison with to the control and intermediate groups. Therefore, it is possible observe that the selenium interaction with other dietary components (FA) has been changed, since the animals in this study were distinctly affected by diet, with a broad dispersion in the values of selenium in the final group . The decrease in final group selenium content may be related to the decrease of antioxidant function , since oxidation processes also generate highly reactive compounds which excessive increase the oxidative stress of cell structures .

Key words: fatty acids, capillary zone electrophoresis, gas chromatography, *Wistar* rat

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos AG oleico, elaídico e vacênico, e seus respectivos pontos de fusão. ...	5
Figura 2: Estrutura química de alguns AG de importância biológica e nutricional.	5
Figura 3: Nomenclatura do AG linoleico de acordo com a IUPAC para nomenclatura ômega.	6
Figura 4: Fluxograma dos principais métodos de análise de AG <i>cis/trans</i>	11
Figura 5: Representação de cromatograma genérico mostrando tempo de retenção de um analito.	12
Figura 6: Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar.	17
Figura 7: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal, camada difusa, camada compacta e plano de cisalhamento.	19
Figura 8: Representação esquemática da migração de AG de diferentes tamanhos sob fluxo eletrosmótico normal e polaridade positiva. Ordem de migração das espécies seria C18, C16, C14 e por último C12.	23
Figura 9: Esquema para reação de hidrólise básica dos glicerídeos.	23
Figura 10: Representação esquemática do CCD rotacional para k=3 fatores.	26
Figura 11: Eletroferograma dos padrões de AG obtidos a partir do planejamento CCD. (1) C18:0, (2) C18:1 9t, (3) C18:1 9c, (4) C16:0, (5) C18:2 9c, 12c, (6) C18:3 9c, 12c, 15c, (7) C15:0 e (8) C13:0, todos com concentração de 0,50 mmol L ⁻¹	32
Figura 12: Resultados da PCA: gráficos de <i>loading</i> e <i>scores</i> , respectivamente.	33
Figura 13: Eletroferograma de padrões de AG (1) C18:0 - 0.50 mmol L ⁻¹ , (2) C18:1 9t - 0.50 mmol L ⁻¹ , (3) C18:1 9c - 0.90 mmol L ⁻¹ , (4) C16:0 - 0.50 mmol L ⁻¹ , (5) C18:2 9c, 12c - 0.90 mmol L ⁻¹ , (6) C18:3 9c, 12c, 15c - 0.50 mmol L ⁻¹ , (7) C13:0 (PI) - 0.50 mmol L ⁻¹ A- em 224 nm. B- em 206 nm, onde é possível verificar a inversão dos picos dos AG poli-insaturados.	35
Figura 14: Fluxograma esquemático para preparo das amostras por CZE.	40
Figura 15: Eletroferograma das 6 diferentes marcas de requeijão. Eletrólito: 15,0 mmol L ⁻¹ de NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ (pH 6,86); 4,0 mmol L ⁻¹ de SDBS, 8,3 mmol L ⁻¹ de Brij 35, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v de 1-octanol.	42

Figura 16: Fluxograma esquemático para preparo das amostras por CE.	45
Figura 17: Cromatogramas das amostras: A- Azeite de Oliva, B- Gordura Vegetal Hidrogenada, C- Margarina, D- Biscoito Recheado, E- Manteiga, F- Óleo de Soja.	48
Figura 18: Eletroferogramas da mistura de padrões de AG (1) C18:0, (2) C18:1 <i>9t</i> , (3) C18:1 <i>9c</i> , (4) C16:0, (5) C18:2 <i>9c</i> , <i>12c</i> , (6) C18:3 <i>9c</i> , <i>12c</i> , <i>15c</i> , (7) C13:0 (PI), todos com concentração de 0,50 mmol L ⁻¹ . Amostras: A- Azeite de Oliva, B- Gordura Vegetal Hidrogenada, C- Margarina, D- Biscoito Recheado, E- Manteiga, F- Óleo de Soja.	49
Figura 19: A - Modelo de caixa utilizada para manutenção dos animais e B- Animais alocados na gaiola utilizada no início do experimento (dia da foto 22 de julho de 2011).	53
Figura 20: Fluxograma da etapa envolvendo dieta e eutanásia.	55
Figura 21; A. Óleo de soja novo; B. Óleo de soja usado por tempo de fritura intermediário (1 semana e 4 ciclos); C. Óleo de soja usado por tempo máximo antes do descarte (2 semanas e 10 ciclos) e D. Ração em <i>pellet</i> obtida pela adição do óleo de soja aos ingredientes restantes de acordo com AIN 93-G (para cada grupo separadamente).	57
Figura 22: Fluxograma esquemático para preparo das amostras para análise por CE.	59
Figura 23: Fluxograma da etapa de extração da fração lipídica das amostras de fígado de ratos <i>Wistar</i>	60
Figura 24: Eletroferogramas das amostras de óleo de soja usado na dieta dos animais. A- Óleo de soja A (óleo novo), B- Óleo de soja B (usado por tempo intermediário) e C- Óleo de soja C (usado por tempo máximo antes do descarte). 1- C18:0, 2- C18:1 <i>9c</i> , 3- C16:0, 4- C18:2 <i>9c</i> , <i>12c</i> , 5- C18:3 <i>9c</i> , <i>12c</i> , <i>15c</i> e 6- C13:0 (PI).	62
Figura 25: Gráfico do teor de AG encontrado nas amostras de óleo de soja dos grupos controle (óleo novo), grupo intermediário (óleo usado no processo de fritura por tempo intermediário) e grupo final (óleo usado por tempo máximo antes do descarte), com respectivas barras de erro padrão.	63
Figura 26: Eletroferogramas das amostras de fígado dos ratos <i>Wistar</i> . A- Grupo controle, B- Grupo Intermediário e C- Grupo Final. 1- C18:0, 2- C18:1 <i>9c</i> , 3- C16:0, 4- C18:2 <i>9c</i> , <i>12c</i> , 5- C16:1 <i>9c</i> e 6- C13:0 (PI).	65

Figura 27: Cromatogramas obtidos para as amostras de fígado dos animais dos grupos controle, intermediário e final. A- Grupo Controle, B- Grupo Intermediário e C- Grupo Final. 1- C16:0, 2- C16:1 <i>9c</i> , 3- C18:0, 4- C18:1 <i>9c</i> , 5- C18:2 <i>9c</i> , <i>12c</i> e 6- C22:1 <i>9c</i>	66
Figura 28: Gráfico do teor de AG encontrado nas amostras fígado de ratos <i>Wistar</i> dos grupos controle (óleo novo), grupo intermediário (óleo usado no processo de fritura por tempo intermediário) e grupo final (óleo usado por tempo máximo antes do descarte), com respectivas barras de erro padrão.....	68
Figura 29: Lâminas histológicas para amostras de fígado dos animais avaliados (aumento de 400X). A- Lâmina histológica representativa do grupo controle. Marcação das zonas 1, 2 e 3. B- Lâmina histológica representativa do grupo intermediário. Marcação das zonas 1, 2 e 3. C- Lâmina histológica representativa do grupo final. Marcação das zonas 1, 2 e 3 (* marcação para tríade porta e X vênula central).	70
Figura 30: Gráfico de <i>Scores</i> obtidos através da análise de Componentes Principais (PCA)..	72
Figura 31: Gráfico de Box Plot para lipoproteína de baixa densidade (LDL).	72
Figura 32: Desenho esquemático de uma fonte de plasma acoplado indutivamente. Geometrias de observação de fontes de ICP: (A) Geometria axial (B) geometria radial.....	76
Figura 33: Desenho representando o nebulizador do tipo Meinhard.....	78
Figura 34: Fluxograma do processo de digestão das amostras de fêmur e fígado para análise por ICP OES. Fonte: o autor.....	80
Figura 35: Gráfico de <i>Box Plot</i> dos metais zinco, magnésio e cálcio nas amostras de fêmur dos animais dos grupos controle, intermediário e final.	81
Figura 36: Gráfico de <i>Box Plot</i> dos metais ferro, manganês, zinco, cobre selênio e sódio nas amostras de fígado dos animais dos grupos controle, intermediário e final.....	85
Figura 37: Espectro de infravermelho do padrão de ácido elaídico (linha preta) e padrão de ácido elaídico após reação com solução de AgNO ₃ (linha vermelha).	90
Figura 38: Eletroferogramas de padrões de ácidos graxos. A- Ácido elaídico 0,50 mmol L ⁻¹ , B- Ácido Vacênico 0,50 mmol L ⁻¹ , C- Mistura dos ácidos elaídico e vacênico 0,50 mmol L ⁻¹ , D- Ácido elaídico 0,50 mmol L ⁻¹ após reação com AgNO ₃ , E- Ácido vacênico 0,50 mmol L ⁻¹	

após reação com AgNO_3 , F- Mistura dos ácidos elaídico e vacênico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ após reação com AgNO_3 91

Figura 39: Eletroferograma de padrões de ácidos graxos. 1- Elaídico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, 2- Vacênico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$. A- Eletrólito: $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Brij; 45% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $4,7 \text{ mmol L}^{-1}$ de metil- β -ciclodextrina. B- Eletrólito: $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Brij; 45% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $5,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de β -ciclodextrina sulfatada. C- Eletrólito: $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Brij; 45% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de β -ciclodextrina. Condições de análise: injeção 5 s x 12,5 mbar, +19 kV, 25°C , detecção indireta em $224 (\pm 2) \text{ nm}$, capilar de TSH com 40 cm de comprimento efetivo, $75 \mu\text{m}$ D.I e 375 mm D.E. e 48,5 cm de comprimento total..... 92

Figura 40: Eletroferograma de padrões de ácidos graxos. 1- Elaídico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, 2- Vacênico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$. A- Eletrólito: $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; 45% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $4,7 \text{ mmol L}^{-1}$ de metil- β -ciclodextrina. B- Eletrólito: $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; 45% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $5,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de β -ciclodextrina sulfatada. C- Eletrólito: $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; 45% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de β -ciclodextrina. Condições de análise: injeção 5 s x 12,5 mbar, +19 kV, 25°C , detecção indireta em $224 (\pm 2) \text{ nm}$, capilar de TSH com 40 cm de comprimento efetivo, $75 \mu\text{m}$ D.I e 375 mm D.E. e 48,5 cm de comprimento total..... 93

Figura 41: Eletroferogramas de padrões de ácidos graxos para o ensaio 7. 1- Oleico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, 2- Vacênico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, 3- Elaídico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$. A- Eletrólito: $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; 30% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de β -ciclodextrina. Condições de análise: injeção 5 s x 12,5 mbar, +19 kV, 25°C , detecção indireta em $224 (\pm 2) \text{ nm}$, capilar de TSH com 40 cm de comprimento efetivo, $75 \mu\text{m}$ d.i e 375 μm d.e. e 48,5 cm de comprimento total..... 95

Figura 42: Eletroferogramas de padrões de AG ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) para os eletrólitos descritos na Tabela 18. E – Elaídico (C18:1 9t), V – Vacênico (C18:1 11t) e O – Oleico (C18:1 9c)..... 97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Tabela de declaração do teor de nutrientes em rótulos alimentícios.	8
Tabela 2: Principais métodos utilizados no processo de extração da fração lipídica de diversas amostras.	14
Tabela 3: Matriz do planejamento composto central 2^3 (CCD) contendo níveis, fatores e a resposta expressa como resolução entre os pares críticos C18:1t/C18:1c e C16:0/C18:2cc....	31
Tabela 4: Resultados do planejamento CCD 2^3	33
Tabela 5: Resultados estatísticos: Falta de ajuste do modelo e F_R calculado para cada ácido graxo de interesse.	37
Tabela 6: Resultados da análise de diferentes marcas de requeijão com GVH por CE comparadas com GC.....	43
Tabela 7: Volumes usados na diluição das amostras para análise por CE.	46
Tabela 8: Tabela com os teores dos AG majoritários determinados por CE e GC e expressos em g de AG/100g de amostra das diferentes amostras alimentícias,.....	50
Tabela 9: Composição da dieta usada para os roedores em fase de crescimento (AIN-93G).	54
Tabela 10: Ordem sequencial dos alimentos usados no processo de fritura por imersão da empresa supracitada, bem como a separação dos grupos intermediário e final.	56
Tabela 11: Teor de AG nas amostras de óleo de soja por CZE e GC.	63
Tabela 12: Teor de AG majoritários encontrados nas amostras de fígado dos ratos <i>Wistar</i> pertencentes aos grupos controle, intermediário e final expresso em grama de AG por 100g de amostra.	67
Tabela 13: Valores dos testes bioquímicos de HDL, LDL e colesterol total para as amostras dos animais estudados.	69
Tabela 14: Metais determinados por ICP OES e seus respectivos comprimentos de onda.....	79
Tabela 15: Teor de zinco, magnésio e cálcio nas amostras de fêmur dos animais dos grupos controle, intermediário e final.	83

Tabela 16: Resultados estatísticos e teores expressos em $\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ de ferro, magnésio, sódio, zinco, cálcio, cobre, selênio e manganês nas amostras de fígado dos animais dos grupos controle, intermediário e final.	87
Tabela 17: Matriz do planejamento experimental 3^2 contendo os níveis e os fatores escolhidos.	94
Tabela 18: Composição dos eletrólitos usados no estudo da separação dos AG elaídico, vacênico e oleico.	96

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN: acetonitrila

Ag⁺-HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência impregnada com prata, do inglês: *Silver ion High Performance Liquid Chromatography*

AGE: ácidos graxos essenciais

AGI: ácido graxo insaturado

AGP: ácido graxo poli-insaturado

AGS: ácido graxo saturado

AGT: ácido graxo trans

ANOVA: análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOCS: do inglês *American Oil Chemist's Society*

ATR-IR: infravermelho com refletância total atenuada, do inglês: *attenuated total reflection infrared*

BGE: eletrólito de corrida, do inglês *background electrolyte*

Brij 35: éter laurílico de polioxietileno 23, do inglês: *Polyoxyethylene (23) lauryl ether*.

CBR: Centro de Biologia de Reprodução

CCD: planejamento composto central, do inglês *composite central design*

CE: eletroforese capilar, do inglês: *capillary electrophoresis*

C_{f,e}: concentração molar na fase estacionária

C_{f,m}: concentração molar na fase móvel

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

d.e.: diâmetro externo do capilar

d.i.: diâmetro interno do capilar

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

EOF: fluxo eletroosmótico, do inglês: *electroosmotic flow*

ECL: comprimento de cadeia equivalente, do inglês *equivalent chain length*

FDA: do inglês: *Food and Drug Administration*

FT-IR: infravermelho com transformada de Fourier, do inglês: *fourier transform infrared spectroscopy*

F_r: Fator de resposta

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

GC-FID: cromatografia a gás com detector de chama, do inglês *flame ionization detector gas chromatography*

GC-MS: cromatografia a gás com detector de massas, do inglês *mass spectroscopy detector gas chromatography*

HPLC: cromatografia a líquido de alta eficiência, do inglês: *high performance liquid chromatography*

HDL: colesterol de alta densidade, do inglês *high density lipoprotein*

ICP OES: espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado, do inglês: *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LDL: colesterol de baixa densidade, do inglês *low density lipoprotein*

MEKC: cromatografia eletrocinética capilar micelar, do inglês: *micellar electrokinetic capillary chromatography*

MeOH: metanol

pH: potencial hidrogeniônico

pKa: - log de K_a

PI: padrão interno

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

t_R: tempo de retenção

UV: ultravioleta

UV-vis: ultravioleta-visível

WHO: do inglês: *World Health Organization*

E: campo elétrico

K: coeficiente de distribuição

K_a: constante de dissociação ácida

L_{ef}: comprimento efetivo do capilar

L_{tot}: comprimento total do capilar

q: carga do analito em C

p⁰: pressão de vapor

ΔH_v: entalpia de vaporização

R: constante dos gases

T: temperatura da coluna cromatográfica

r: raio iônico efetivo

t_m: tempo de migração do analito

V: voltagem

ε₀: constante de permissividade do vácuo

ε_r: permissividade relativa da solução

ζ: potencial zeta

μ_{ef} : mobilidade eletroforética

μ_{eo} : mobilidade eletrosmótica

μ_{obs}: mobilidade observada

v_{eo} : velocidade eletrosmótica

η: viscosidade

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
1.1	ÁCIDOS GRAXOS	4
1.1.1	Nomenclatura dos ácidos graxos	6
1.1.2	Ácidos graxos trans: origens e implicações	6
1.1.3	Importância biológica dos ácidos graxos	9
1.1.4	Métodos de análise de ácidos graxos	10
1.1.4.1	Cromatografia a gás	11
2	ELETROFORESE CAPILAR	15
2.1	INTRODUÇÃO	15
2.2	CONCEITO	16
2.3	INSTRUMENTAÇÃO	16
2.3.1	Modos de introdução da amostra	17
2.4	PRINCÍPIOS E FUNDAMENTOS	18
2.4.1	Fluxo eletrosmótico	18
2.4.2	Mobilidade eletrosmótica	19
2.4.3	Mobilidade eletroforética	21
2.4.4	Mobilidade observada	21
2.5	ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS POR ELETROFORESE CAPILAR	22
3	PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS	24
3.1	DELINEAMENTO COMPOSTO CENTRAL OU PLANEJAMENTO ESTRELA	25
3.2	ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS (PCA)	26
3.3	FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
5	OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS MAJORITÁRIOS POR CZE	29
5.1	FERRAMENTAS ESTATÍSTICAS	29
5.2	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS	29

5.3	METODOLOGIA	35
5.3.1	Instrumentação	35
5.3.2	Cálculo dos fatores de resposta para ácidos graxos	36
6	DETERMINAÇÃO DE TRANS TOTAL EM AMOSTRAS DE REQUEIJÃO	39
6.1	PREPARO DA AMOSTRA	40
6.1.1	Preparo da amostra para análise por CZE	40
6.1.2	Preparo da amostra para análise por GC	40
6.2	INSTRUMENTAÇÃO	41
6.2.1	Eletroforese capilar	41
6.2.2	Cromatografia a gás	41
6.3	QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE TRANS TOTAL POR CZE E COMPARAÇÃO COM MÉTODO OFICIAL	42
7	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS MAJORITÁRIOS EM DIVERSAS AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS	45
7.1	PREPARO DE AMOSTRA	45
7.1.1	Preparo das amostras para análise por CZE	45
7.1.2	Preparo das amostras para análise por GC	46
7.2	INSTRUMENTAÇÃO	46
7.2.1	Eletroforese Capilar	46
7.2.2	Cromatografia à gás	47
7.3	COMPARAÇÃO ENTRE CZE E GC	47
8	ENSAIO BIOLÓGICO	52
8.1	BREVE HISTÓRICO	52
8.2	PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO PROJETO	53
8.3	ANIMAIS	53
8.3.1	Manutenção dos animais	54
8.3.2	Dietas	54
8.3.3	Eutanásia	57
8.3.4	Obtenção das amostras hepáticas e análise histopatológica	58
8.4	PREPARO DE AMOSTRA	58
8.4.1	Preparo das amostras para análise por CZE	58

8.4.2	Preparo das amostras para análise por GC	59
8.5	INSTRUMENTAÇÃO	60
8.5.1	Eletroforese Capilar	60
8.5.2	Cromatografia à gás	61
8.6	DETERMINAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO DE AMOSTRAS DE ÓLEO DE SOJA E TECIDO BIOLÓGICO POR CZE	61
8.7	INTERPRETAÇÃO DAS ANÁLISES DE ÁCIDOS GRAXOS EM ASSOCIAÇÃO COM OS RESULTADOS OBTIDOS PARA BIOQUÍMICA E HISTOLOGIA	69
9	DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO EM FÍGADO E FÊMUR DE RATOS WISTAR	74
9.1	FUNDAMENTOS DE ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓPTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO	75
9.2	INSTRUMENTAÇÃO	78
9.3	PREPARO DE AMOSTRA	79
9.3.1	Procedimento de digestão das amostras	79
10	SEPARAÇÃO DOS HOMÓLOGOS DE POSIÇÃO VACÊNICO E ELAÍDICO POR CZE	90
10.1	“COMPLEXAÇÃO” DOS ÁCIDOS GRAXOS COM NITRATO DE PRATA (AgNO ₃)	90
10.2	TESTES COM CICLODEXTRINAS	92
11	CONCLUSÃO	100
12	REFERÊNCIAS	102
	APÊNDICE - PRODUÇÃO CIENTÍFICA	112
	ANEXO - PROTOCOLO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – UFJF	114

1 INTRODUÇÃO

1.1 Ácidos Graxos

Os ácidos graxos (AG), constituintes fundamentais estruturais dos lipídios, são definidos de forma genérica como ácidos carboxílicos, comumente monocarboxílicos, alifáticos, não ramificados que podem ser representados pela forma simplificada **RCOOH**. O grupamento **R** é, geralmente, uma cadeia hidrocarbonada longa com número par de átomos de carbono, podendo ser saturada, monoinsaturada ou poliinsaturada. O grupo carboxila constitui a região polar e a cadeia **R**, a região apolar da molécula (Graziola, Solis e Curi, 2002).

Os AG podem ser classificados de acordo com o número de átomos de carbono presentes na molécula, sendo denominados AG de cadeia curta aqueles cuja cadeia carbônica possua de 2 a 4 átomos de carbono, de cadeia média aqueles com 6 a 10 átomos de carbono e de cadeia longa os que possuem mais de 12 átomos de carbono. Os AG também podem ser classificados de acordo com a presença ou não de insaturações, sendo denominados AG 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 carbônica (Graziola, Solis e Curi, 2002).

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, favorecem o aumento da interação entre as cadeias. 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 (Graziola, Solis e Curi, 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 exemplificado pela Figura 1 (Graziola, Solis e Curi, 2002).

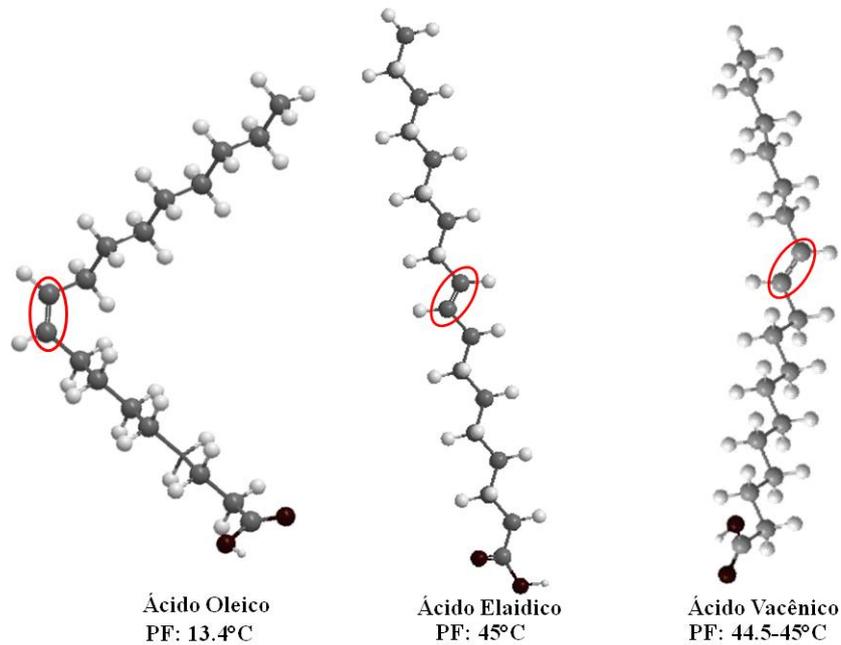


Figura 1: Estrutura dos AG oleico, elaidico e vacênico, e seus respectivos pontos de fusão.
Fonte: O autor.

A Figura 2 mostra a estrutura química de alguns AG de importância biológica e nutricional que serão foco deste trabalho.

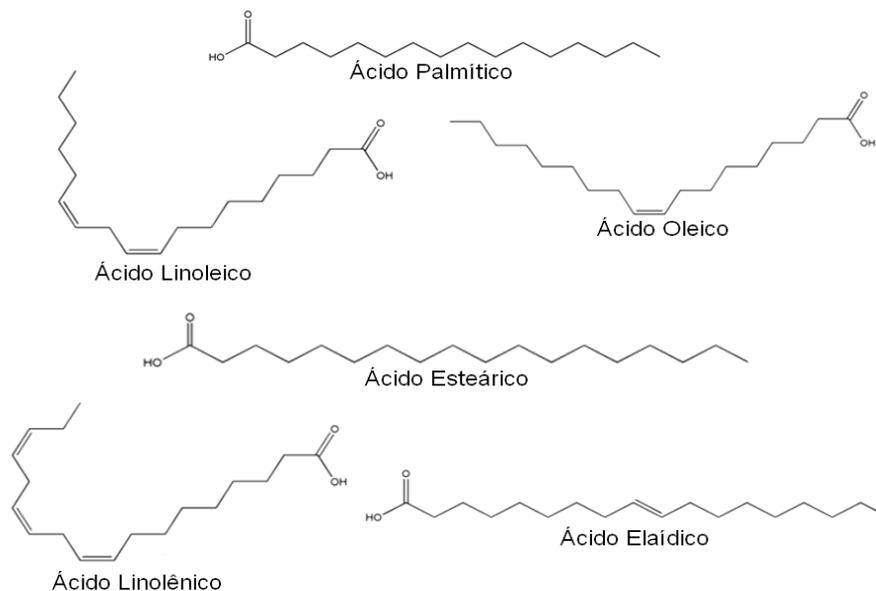


Figura 2: Estrutura química de alguns AG de importância biológica e nutricional.
Fonte: O autor.

1.1.1 Nomenclatura dos ácidos graxos

A notação utilizada para AG 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* (Δ) é usado para identificar a posição da dupla ligação sem especificar a isomeria *cis/trans* da insaturação. Por exemplo, o ácido eláidico 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 *9t* quando a isomeria da insaturação for explicitada.

Os bioquímicos propuseram uma modificação do sistema de nomenclatura para os AG, 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 linoleico pode ser abreviada 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 (Graziola, Solis e Curi, 2002).

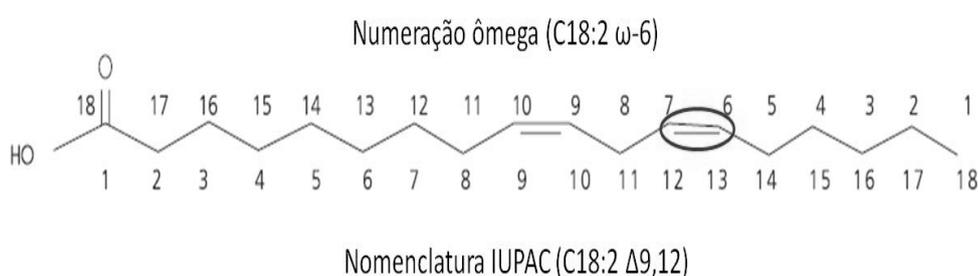


Figura 3: Nomenclatura do AG linoleico de acordo com a IUPAC para nomenclatura ômega.
Fonte: o autor.

1.1.2 Ácidos graxos *trans*: origens e implicações

Existem pelo menos três fontes para a obtenção de AG *trans* (AGT). A primeira fonte é o processo de hidrogenação parcial catalítica que converte óleos vegetais (líquidos a

temperatura ambiente) em gorduras sólidas ou semissólidas com propriedades de fusão apropriadas para produtos tais como gorduras (“*shortening*”) e margarinas, além de aumentar a estabilidade à oxidação e o período de vida útil do produto (Albuquerque *et al.*, 2011). Estudos evidenciam que o teor de AGT oriundos do processo de hidrogenação catalítica de óleos vegetais é expresso em ácido elaídico (C18:1 *9t*), uma vez que compreende de 80-100% do total de AGT presente em produtos industrializados que utilizam gordura vegetal parcialmente hidrogenada (GVH), inclusive em tabelas nutricionais (Silva e Ferraz, 2006; Stender, Astrup e Dyerberg, 2008). A segunda fonte de AGT é oriunda do processo de biohidrogenação que ocorre em ruminantes, sendo esta fonte responsável pela presença de ácido vacênico (C18:1 *11t*), o qual pode ser encontrado na carne e em produtos lácteos (Jakobsen *et al.*, 2008). Por fim, a terceira fonte de obtenção AGT (majoritariamente ácido elaídico) é através do processo de aquecimento de óleos vegetais em altas temperaturas durante o processo de fritura por imersão de alimentos, sendo que esta formação de *trans* está relacionada com o tempo de exposição do óleo a altas temperaturas (Richter *et al.*, 2009).

Estudos realizados em leitões mostram que AGT oriundo do processo de hidrogenação catalítica do óleo de soja (ácido elaídico) inibem a ação de enzimas *dessaturases* como, por exemplo, ciclooxigenase (COX-2), prejudicando a conversão do ácido linoleico (C18:2 *9c,12c*) em ácido araquidônico (C20:4 *5c, 8c, 11c, 14c*). O ácido araquidônico é convertido em prostaglandina, sendo a prostaciclina (PGI₂) a fração majoritária que apresenta um importante papel nas atividades anti-inflamatórias do organismo, além de atuar na prevenção de coágulos nas artérias e veias (Kummerow, Mahfouz e Zhou, 2007; Kummerow, 2009). Além disso, estudos mostram que os AGT oriundos da GVH aumentam o processo inflamatório nas artérias, afetando negativamente o funcionamento do endotélio, sendo, portanto, apontado como um fator de risco para doenças cardiovasculares (Erkkila *et al.*, 2008; Sun e Campos, 2008).

Desde 1995 a *World Health Organization* (WHO) recomendava o controle no consumo de alimentos com AGT, mas não determinava o valor quantitativo desse consumo (Who, 1995). Em 2002, uma consulta promovida pela referida organização foi realizada com o intuito de atualizar as recomendações sobre dieta, nutrição e prevenção de doenças crônicas reiterou que as dietas deveriam fornecer no máximo 1% de gordura *trans* do total calórico diário (Nishida *et al.*, 2004). No Brasil, o Guia Alimentar para População Brasileira (GAPB), lançado em 2005, restringe o consumo de gordura *trans* a 1% do valor energético diário, o

que corresponde a aproximadamente 2 g/dia em uma dieta de 2.000 calorias (Anvisa, 2003; Brasil, 2005).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 359 tornou obrigatória a declaração no rótulo dos produtos industrializados, o teor de gordura *trans* relativo à porção do produto, sendo que esta porção é regulamentada pela própria Resolução. Desse modo, segundo a RDC nº 360, pode ser considerado e divulgado como “não contém *trans*” todo alimento industrializado que apresentar teor de gordura *trans* menor ou igual a 0,2 g/porção, sendo o referido valor descrito como “não significativo”, como pode ser observado na Tabela 1 (Anvisa, 2003; Proença e Silveira, 2012). Logo, diante do exposto, torna-se de suma importância a determinação do teor de *trans* nos diversos alimentos, bem como sua correta rotulagem.

Tabela 1: Tabela de declaração do teor 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 <i>trans</i>	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

Por outro lado, os AGT de origem natural, ou seja, aqueles formados a partir do processo de biohidrogenação de bactérias presentes na 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 linoleico formando ácido vacênico (C18:1 *11t*) como componente de maior proporção (Jakobsen *et al.*, 2008). Este é metabolizado no rúmen de vacas e búfalas originando como produto final alguns ácidos linoleicos conjugados tais como: C18:2 *9c,11t* e C18:2 *10t,12c*. Estes AG apresentam ação benéfica para saúde humana, principalmente no combate e prevenção de alguns tipos de doenças, conforme relatos da literatura (Destailats *et al.*, 2007).

A formação de AGT pode ocorrer também durante alguns processos culinários, como por exemplo, na fritura por imersão. O processo de fritura por imersão é um dos meios mais antigos de preparo de alimentos. Tal processo é dado pela imersão de um alimento em um recipiente preenchido com óleo aquecido a uma temperatura de 150-190°C. O aquecimento e transferência de massa simultânea entre óleo, alimento e ar durante o processo de fritura produz uma característica peculiar aos alimentos. Entretanto, durante o processo de fritura por imersão, ocorrem mudanças consideráveis na composição do óleo, tais como: hidrólise, polimerização, oxidação, formação de compostos não voláteis, entre outros (Choe e Min, 2007). A decomposição térmica de um óleo de fritura é afetada por muitas variáveis, tais como insaturação dos AG, temperatura do óleo, a absorção de oxigênio, presença de metais nos substratos e no óleo, o tipo de óleo e pela natureza do alimento frito (Arroyo *et al.*, 1992). Uma mudança na composição dos AG dos óleos usados no processo de fritura por imersão a ser considerada, é a diminuição do teor de AG monoinsaturados e poli-insaturados, com o consequente aumento do teor de AGS, bem como a ocorrência de processos de oxidação. Tais modificações comprometem a qualidade nutricional do óleo e dos alimentos fritos (Ulbricht e Southgate, 1991).

1.1.3 Importância biológica dos ácidos graxos

Os AGT de origem industrial (majoritariamente ácido elaídico) não são sintetizados no organismo dos animais, embora os isômeros *trans* monoinsaturados possam ser alongados e dessaturados e os poli-insaturados podem ser hidrolisados, oxidados e saturados. Portanto, o consumo destes AG reflete na deposição em diversos tecidos e órgãos dos animais, tendo como consequência alterações no metabolismo (Sabarense e Filho, 2003). Em geral, os efeitos do ácido elaídico estão associados ao aumento do risco de desenvolvimento de doenças relacionadas ao metabolismo de lipídios, como por exemplo, aterosclerose (Ascherio *et al.*, 1994).

Já para o ácido vacênico, sabe-se que este pode ser alongado e dessaturado, pelo sistema enzimático de ruminantes e humanos, podendo produzir AG conjugados do ácido linoleico (Ex: C18:2 *9t,11c*), aos quais são atribuídos efeitos positivos na prevenção de algumas doenças (Mozaffarian, Aro e Willet, 2009). Estima-se que mais de 80% do C18:2 *9t,11c* presente na gordura dos ruminantes sejam endogenamente sintetizados pela $\Delta 9$ -dessaturase utilizando ácido vacênico como substrato (Gebauer *et al.*, 2011).

Através do processo de fritura por imersão é possível ocorrer a formação de AGT e AG saturado. Considerando o óleo de soja o meio de fritura, o AGT mais provável a ser formado será o ácido elaídico, uma vez que o ácido linoleico corresponde em torno de 50% do teor de AG no óleo. Entretanto, a formação de AGT em óleo de fritura pode estar condicionada à fritura de um mesmo tipo de alimento, normalmente de origem vegetal durante muitos ciclos (Bansal *et al.*, 2009).

Desse modo, pode-se avaliar a deposição de gordura em tecidos de animais, bem como seus efeitos no organismo do animal, utilizando como fonte lipídica da dieta o óleo empregado na fritura por imersão de diversos. Neste caso, o rato é o animal tradicionalmente utilizado por ser de fácil manejo e curto período de crescimento e desenvolvimento (Krinke, Bullock e Bunton, 2000).

1.1.4 métodos de análise de ácidos graxos

Os principais métodos analíticos para determinação de AG, com configuração *cis* e *trans*, incluem cromatografia a gás (GC do inglês *Gas Chromatography*) acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID do inglês *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector*) (AOCS, 1996; Golay *et al.*, 2009), cromatografia a gás acoplado a um detector de massas (GC-MS do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*) (Huang, Wang e Crenshaw, 2006), cromatografia líquida de alta eficiência impregnada com prata (Ag⁺-HPLC do inglês *Silver Ion High Performance Liquid Chromatography*) (Delmonte *et al.*, 2004), infravermelho com transformada de Fourier (FTIR do inglês *Fourier Transform Infrared*) (AOCS, 1999), infravermelho com refletância total atenuada (ATR-IR do inglês *Attenuated Total Reflection Infrared*) (Mossoba *et al.*, 2007) e eletroforese capilar (CE do inglês *Capillary Electrophoresis*) (Barra *et al.*, 2012), conforme fluxograma apresentado na Figura 4. No presente trabalho, será dado enfoque à metodologia por GC, uma vez que esta é a técnica clássica, e será abordada também a técnica de CZE, já que esta é a técnica alternativa proposta para determinação de AG.

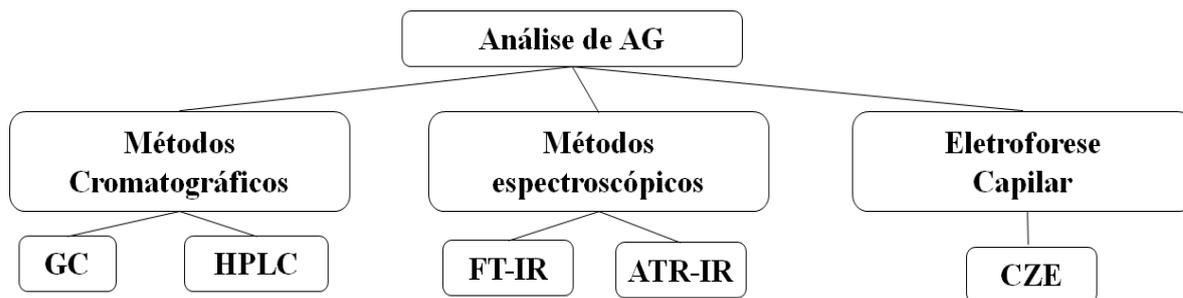


Figura 4: Fluxograma dos principais métodos de análise de AG *cis/trans*.
Fonte: o autor.

1.1.4.1 Cromatografia a gás

A GC 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 e Mcnair, 2009).

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 e Smith, 1999).

A constante de equilíbrio K para essa reação é chamada de coeficiente de distribuição ou coeficiente de partição (cromatografia gás-líquido), e pode ser definido como:

$$K = \frac{C_{f.e}}{C_{f.m}} \quad (1)$$

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

O tempo de retenção (t_R) 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 GC, 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 5. Para a determinação dos tempos de retenção ajustados (t_R') é necessário conhecer o tempo que uma espécie da fase móvel que não tenha interação 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.

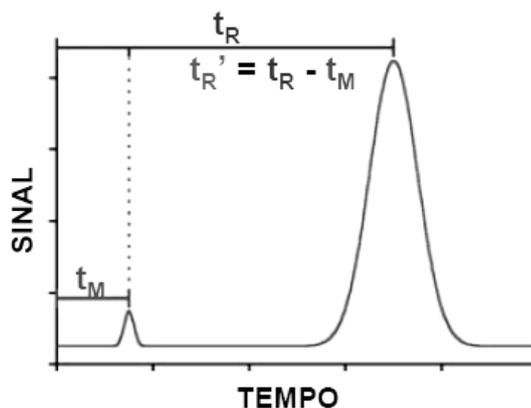


Figura 5: Representação de cromatograma genérico mostrando tempo de retenção de um analito.
 Fonte: Adaptado de Braithwaite e Smith, 1999.

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 atravessa 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, sólida ou líquida, 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 pode ser racionalizada 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 (Braithwaite e Smith, 1999; Kolb e Ettre, 2006).

Um grande número de detectores que operam em princípios diferentes foi desenvolvido para utilização em GC, mas apenas alguns deles continuam sendo utilizados de uma forma significativa. O detector de ionização de chama (GC-FID) é o mais empregado em aplicações de GC de um modo geral, uma vez que pode ser usado com praticamente todos os compostos orgânicos, e tem uma elevada sensibilidade e estabilidade, um baixo volume morto, um tempo de resposta rápido e a resposta é linear ao longo de ampla faixa (Miller e Mcnair, 2009).

Um detector FID é composto por uma chama de gás hidrogênio (H_2) e ar, além de um prato coletor. O efluente passa pela coluna do equipamento de GC e chega à chama, onde após a pirólise, produz íons e elétrons. A corrente gerada é proporcional aos íons formados, o que depende da concentração dos compostos orgânicos na forma gasosa sendo, portanto, medida por um picoamperímetro (Miller e Mcnair, 2009).

A análise de AG por GC requer uma etapa extração da fração lipídica da amostra e posteriores etapas de saponificação e derivatização a ésteres metílicos (FAMES do inglês *Fatty Acid Methyl Esters*) (Sebedio e Ratnayake, 2008; Golay *et al.*, 2009).

Muitos métodos de extração da fração lipídica podem ser utilizados. Contudo, os mais comuns estão listados na Tabela 2.

Tabela 2: Principais métodos utilizados no processo de extração da fração lipídica de diversas amostras.

Método	Solventes utilizados	Referência
Folch	clorofórmio/metanol (2:1)	Folch <i>et al.</i> , 1957
Bligh e Dyer	clorofórmio/metanol/água (1:2:0,8)	Bligh & Dyer, 1959
Sheppard	etanol/éter dietílico (3:1)	Sheppard, 1963
Hara e Radin	hexano/isopropanol (3:2)	Hara & Radin, 1978

A análise de AG por GC-FID é realizada normalmente em uma coluna polar com 60 m ou 100 m de comprimento, tais como SP-2560 e CPE-Sil 88, cuja fase estacionária líquida imobilizada é composta por cianopropil/polisiloxano (Ratnayake *et al.*, 2002). Em condições adequadas, uma boa separação de isômeros *cis/trans* pode ser obtida por GC-FID. Entretanto, para uma separação completa de homólogos de posição tais como vacênico e elaídico, faz-se necessário o uso de coluna de 200 m (CP-Select CB para FAMEs, 200 m de comprimento, 0,25 mm d.i., e espessura de filme de 0,25 μm), contudo o tempo de análise torna-se excessivamente longo, 245 minutos, inviabilizando o uso dessa metodologia para análises de rotina (Golay *et al.*, 2009).

Algumas vezes, devido a complexidade dos cromatogramas, especialmente na região entre C11:0 and C18:1, uma separação prévia, eventualmente pode ser necessária, utilizando cromatografia em camada delgada impregnada com prata (Ag^+ -TLC do inglês *Silver Ion Thin Layer Chromatography*) antes da análise por GC para resolver completamente a sobreposição dos AG na região dos isômeros *trans* C18:1 (Golay *et al.*, 2006).

De acordo com Christie (1989), a cromatografia impregnada com prata pode ser usada para separar os FAMEs de acordo com o seu grau de insaturação (Christie, 1989). Esta separação é baseada na formação de um complexo reversível de transferência de carga entre orbitais *d* da prata e elétrons π das ligações duplas do AG insaturados. Assim, a separação dos isômeros *cis/trans* baseia-se no número, posição e configuração das ligações duplas (Dobson, Christie e Nikolova-Damyanova, 1995; Delmonte e Rader, 2007).

2 ELETROFORESE CAPILAR

2.1 Introdução

A CE é uma técnica de separação que vem crescendo continuamente e dentre as metodologias nesta técnica para análise de AG, é possível destacar diferentes modos e diferentes possibilidades de detecção dos analitos de interesse, como por exemplo: eletroforese em meio não aquoso (NACE, do inglês *non aqueous capillary electrophoresis*) com detector de fluorescência no infravermelho próximo (Jr e Johnson, 2000) ou NACE combinado com detecção por fluorescência indireta (Wang, Wei e Liz, 1998), eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês *capillary zone electrophoresis*) com detecção direta ou indireta por UV (Drange e Lundanes, 1997; Oliveira *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*, 2003b; Castro *et al.*, 2010; Porto, Souza e Oliveira, 2011; Barra *et al.*, 2012), cromatografia eletrocínética micelar sob detecção UV (MECK-UV, do inglês *micellar electrokinetic chromatography under UV detection*) (Gareil e Collet, 1996; Collet e Gareil, 1997) e eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato (CE-C⁴D, do inglês *capillary electrophoresis with contactless conductivity detection*) (Oliveira *et al.*, 2003a; Surowiec, Kamla e Kenndler, 2004).

Devido às características químicas dos AG, que são baixa absorvidade molar, a baixa solubilidade em meio aquoso e a presença de AG homólogos e isômeros, os eletrólitos (BGE, do inglês *background electrolyte*) mais utilizados levam em consideração a otimização de variáveis, tais como: tampões como fosfatos ou Tris/HCl, tampões cromóforos como Tris/p-hidroxibenzoato ou p-anisato (Gareil e Collet, 1996), agentes cromóforos como dodecilbenzeno sulfonato de sódio (SDBS) (Oliveira *et al.*, 2003a), solventes orgânicos como metanol (Liu, Cao e Chen, 2005), acetonitrila (ACN) (Surowiec, Kamla e Kenndler, 2004) e/ou 1-octanol (Oliveira *et al.*, 2003), agentes surfactantes como dodecil sulfonato de sódio (SDS) (Bohlin *et al.*, 2003), *polyoxyethylene 23 lauryl ether* (Brij 35) (Oliveira *et al.*, 2003a) e seletores quirais como ciclodextrinas (Gareil e Collet, 1996; Liu, Cao e Chen, 2005).

Desde a década de 90, a análise de AG de cadeia longa por CZE tem despertado interesse na comunidade científica devido a versatilidade da técnica associada ao curto tempo de análise e ausência de etapa de derivatização da amostra. Durante os últimos dez anos, diferentes tipos de matrizes alimentícias como óleos e gorduras foram analisados pelo GQAQ utilizando a técnica de CZE (Oliveira *et al.*, 2001; Oliveira *et al.* 2003a; Oliveira *et al.*, 2003b;

Oliveira *et al.*, 2006; Castro *et al.*, 2010; Porto, Souza e Oliveira, 2011; Barra *et al.*, 2012; Barra *et al.*, 2013; Castro *et al.*, 2013). Entretanto, estudos envolvendo análise de AG em amostras de fígado e/ou outros tecidos de animais por CZE ainda são incipientes e avaliação do teor de AG neste tipo de matriz faz-se necessário.

2.2 Conceito

A CE é uma técnica de separação que opera em meio líquido, baseada no transporte diferenciado de compostos neutros, iônicos ou ionizáveis, mediante a aplicação de um campo elétrico em um tubo capilar preenchido com uma solução de eletrólito conveniente. Historicamente, foi desenvolvida por *Arne Tiselius*, no início da década de 30, para o estudo de proteínas do soro sanguíneo (Tavares, 1996). As separações em CE podem ser realizadas por vários modos, com mecanismos singulares e seletividade característica, como: fronteira móvel, zona, isotacoforese, focalização isoelétrica e em gel (Baker, 1995; Tavares, 1996). Neste trabalho será discutida apenas a CZE, uma vez que este foi o modo de eletroforese utilizado para as análises em questão.

2.3 Instrumentação

O sistema básico de CE, representado na Figura 6, consiste de uma fonte de alta tensão, capilar de sílica fundida, revestidos externamente por poliimida, teflon ou poliacrilato, eletrodos de platina, reservatórios para soluções eletrolíticas e um detector apropriado. Os comandos para controle do equipamento, aquisição e tratamento de dados são realizados mediante interface com um computador. A fonte de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar, através da conexão com os eletrodos, que são imersos em reservatórios contendo eletrólito. O sistema pode ser termostatizado por circulação de ar forçado ou líquido refrigerante através do cartucho contendo o capilar (Baker, 1995; Tavares, 1996).

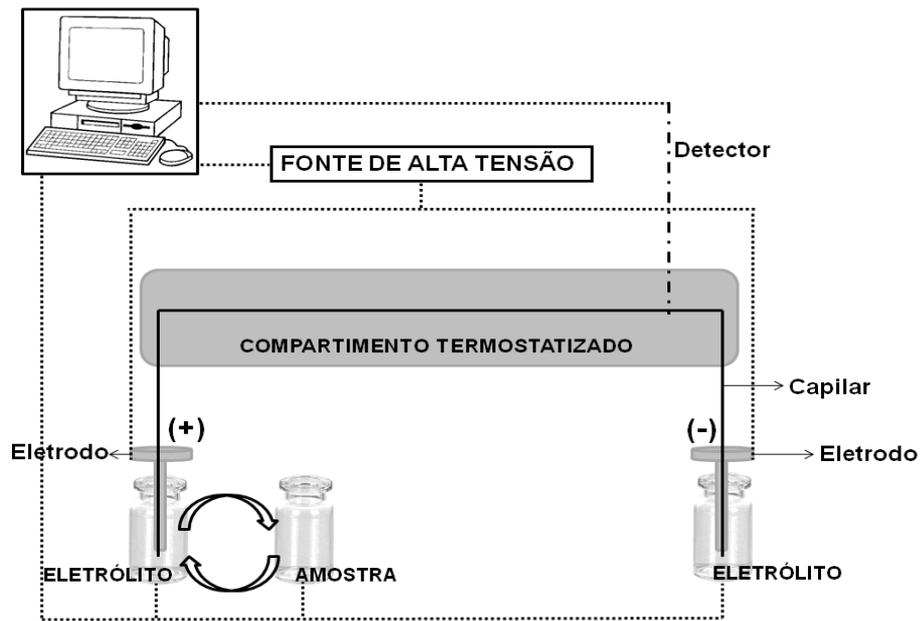


Figura 6: Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar.
Fonte: O autor.

2.3.1 Modos de introdução da amostra

A introdução da amostra em CZE utiliza volumes reduzidos, na ordem de 1 a 10 nL e a maneira pela qual a amostra é introduzida no capilar tem implicação direta na análise quantitativa. (Baker, 1995; Tavares, 1996).

O volume introduzido no capilar é uma alíquota representativa da composição da amostra, e depende do tempo de injeção, dimensões do capilar, viscosidade da solução tampão e da diferença de pressão estabelecida. As amostras podem ser introduzidas mediante gradiente de pressão (pressão positiva ou sifonagem), 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 eletrocinética (Tavares, 1996).

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 representativa que a eletrocinética, porque é baseada estritamente na transferência de volume (a reprodutibilidade de área é de aproximadamente 1 %, desvio padrão relativo) (Tavares, 1996).

2.4 Princípios e fundamentos

2.4.1 Fluxo eletrosmótico

Em CZE, além dos solutos, uma solução tamponada pode compor o BGE que se move através do capilar sob a influência de um campo elétrico; este fenômeno é denominado fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *Electroosmotic Flow*). Sob a aplicação de voltagem positiva na injeção, utilizando capilar de sílica fundida cuja parede interna é composta por grupos silanóis, o EOF ocorre do anodo para catodo, ou seja, a solução tampão flui do reservatório de entrada (anodo) através do capilar e é descartada no reservatório de saída (catodo). Em contato com uma solução tampão a superfície interna do capilar adquire carga, isto ocorre devido a dois fenômenos: ionização ou adsorção.

Capilares de sílica fundida possuem na parede interna vários grupos silanóis (Si-OH) de caráter ácido (pKa 5,9). Em contato com o meio aquoso parte desses grupos são ionizados e a superfície interna do capilar torna-se negativamente carregada. Quando uma diferença de potencial é aplicada nas extremidades do capilar preenchido com eletrólito apropriado, um campo elétrico é estabelecido tangencialmente ao longo deste eletrólito (Baker, 1995).

A camada compacta que é mostrada na Figura 7 é formada na região imediatamente adjacente à superfície devido à adsorção específica, por forças eletrostáticas e/ou de coesão, de moléculas de água e alguns íons, provavelmente desidratados, e através da adsorção não específica de íons hidratados que se ligam fracamente a superfície estabelecida (Baker, 1995; Tavares, 1996).

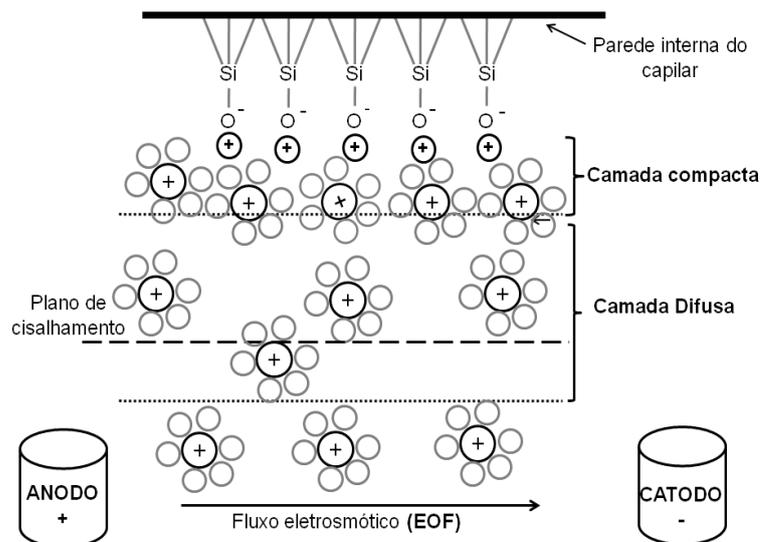


Figura 7: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal, camada difusa, camada compacta e plano de cisalhamento.
 Fonte: O autor.

O EOF é caracterizado por um perfil radial constante da velocidade, não contribui, portanto, para o alargamento de bandas. Esta característica peculiar devido a presença do EOF permite uma distinção da técnica de CE em relação aos métodos cromatográficos em fase líquida, que apresentam um perfil parabólico para fluxo da coluna, característico do fluxo induzido por pressão. Além disto, o EOF, geralmente de grande magnitude, contribui significativamente pela condução dos solutos, independente da carga, em direção ao detector. Portanto, permite, hipoteticamente, a análise simultânea de amostras contendo solutos catiônicos, aniônicos, neutros e ionizáveis (Baker, 1995; Tavares, 1996).

2.4.2 Mobilidade eletrosmótica

A distribuição não homogênea dos íons na camada difusa produz um gradiente de velocidade, conhecido como velocidade eletrosmótica (v_{eo}). A v_{eo} pode ser calculada de modo simplificado pela equação de Helmholtz-Smoluchowski (Equação 2) (Baker, 1995).

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

Onde: ϵ_r é a permissividade relativa da solução;

ϵ_0 é a constante de permissividade do vácuo ($\epsilon_0 = 8,85 \times 10^{-12} \text{ C}^2 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-2}$);

ζ é o potencial desenvolvido no plano de cisalhamento, denominado potencial zeta, em V;

\vec{E} é o campo elétrico aplicado em V cm^{-1} ;

η é a viscosidade da solução tampão em N s m^{-2} .

Os fenômenos eletrocinéticos estão associados ao movimento de partículas carregadas através de um meio contínuo ou do movimento do meio contínuo sobre uma superfície carregada. Este efeito causado pela formação de cargas elétricas nas interfaces é chamado de Potencial Zeta (ζ) que é definido como a medida do potencial elétrico entre a dupla camada difusa quando partículas carregadas são submetidas a um campo elétrico (Figura 7), sendo, portanto, dependente da força iônica do tampão e da espessura 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 e ϵ é a constante dielétrica da solução tampão.

A mobilidade eletrosmótica (μ_{eo}), dada em $\text{cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$, é a razão da velocidade eletrosmótica (v_{eo}) pelo campo elétrico aplicado (E), e é mostrada através da Equação 3.

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (3)$$

A camada difusa é a região na qual a concentração de íons de carga oposta à superfície do capilar diminui aproximando-se da concentração dos íons em solução. Sob a ação de um campo elétrico, os cátions solvatados migram em direção ao cátodo transportando moléculas de água, o que induz o fluxo de solução como um todo, conhecido como **fluxo eletrosmótico** (EOF) (Baker, 1995; Tavares, 1996).

2.4.3 Mobilidade eletroforética

A separação das espécies de interesse 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.

A mobilidade eletroforética (μ_{ep}), fenômeno exclusivo de um soluto, corresponde a sua velocidade (v_{ep}) em um campo elétrico unitário (Equação 4) (Baker, 1995; Tavares, 1996). Desta forma, observam-se zonas de amostras distintas de acordo com a mobilidade. A equação 5 mostra a mobilidade eletroforética de acordo com a relação entre a carga das espécies e o seu raio iônico efetivo. Logo, espécies como menores raios iônicos hidratados e altamente carregadas possuem alta mobilidade eletroforética.

$$\vec{\mu}_{ep} = \frac{\vec{v}_{ep}}{\vec{E}} \quad (4)$$

Onde: \vec{v}_{ep} é a velocidade eletroforética em cm s^{-1} ;

\vec{E} é o campo elétrico aplicado em V cm^{-1} .

$$\mu_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (5)$$

Onde: q é carga do analito em C,

η é a viscosidade do meio em N s m^{-2}

r é o raio iônico efetivo solvatado em pm (10^{-12}m);

2.4.4 Mobilidade observada

Quando a separação envolve solutos com caráter ácido-base, a mobilidade eletroforética do soluto depende do pH do eletrólito. Neste caso, o termo mobilidade observada (μ_{obs}), o qual incorpora o produto das mobilidades eletroforéticas das espécies em equilíbrio e a distribuição das concentrações relativas de cada espécie no pH considerado, é empregado (Tavares, 1996; 1997). Assim sendo, o controle do pH é aconselhável e a escolha

de uma solução tampão adequada tem implicações diretas na otimização da separação. Adicionalmente, a suscetibilidade do fluxo eletrosmótico a variações de pH requer que o tampão apresente constância no valor de pH (alta capacidade).

A mobilidade observada (μ_{obs}) de um determinado soluto é a soma vetorial entre as μ_{ef} e μ_{eo} , como mostra a equação 6 (Baker, 1995; Tavares, 1996).

$$\vec{\mu}_{obs} = \vec{\mu}_{ep} + \vec{\mu}_{eo} \quad (6)$$

Experimentalmente, pode-se determinar o valor da μ_{obs} através da injeção de uma solução contendo o analito de interesse e conhecendo as dimensões do capilar, a voltagem aplicada e o tempo de migração da espécie de interesse, conforme demonstrado na Equação 7.

$$\mu_{obs} = \frac{L_{ef} \cdot L_{tot}}{t_m \cdot V} \quad (7)$$

Onde: L_{ef} é o comprimento efetivo do capilar em cm;

L_{tot} é o comprimento total do capilar em cm;

t_m é o tempo de migração do analito de interesse em segundos (s);

V é a voltagem aplicada em volts (V).

2.5 Análise de ácidos graxos por eletroforese capilar

Os AG de cadeia longa são monocarboxílicos e considerados como ácidos fracos cujo $pK_a \sim 5$. Sendo assim, garantir que as espécies estejam desprotonadas, ou seja, na forma aniônica, deve-se utilizar no eletrólito um tampão com pH acima de 5. Desse modo, a análise é realizada em modo contraeletrosmótico (mobilidades eletroforética e eletrosmótica na mesma direção, porém em sentidos contrários), onde os AG com menor relação carga/tamanho migram primeiro e podem ser detectados por UV de modo direto (caso as espécies absorvam no comprimento de onda de interesse) ou indireto (caso as espécies não absorvam na região de interesse). Logo, faz-se necessário, em alguns casos, a utilização de um agente cromóforo) (Drange and Lundanes, 1997). Os AG de cadeia mais longa resistem menos ao fluxo eletrosmótico que os AG de cadeia mais curta, logo, AG cadeia hidrocarbonada maior são “arrastados” mais facilmente pelo fluxo eletrosmótico, passando pelo detector mais rapidamente, como é ilustrado pela Figura 8.

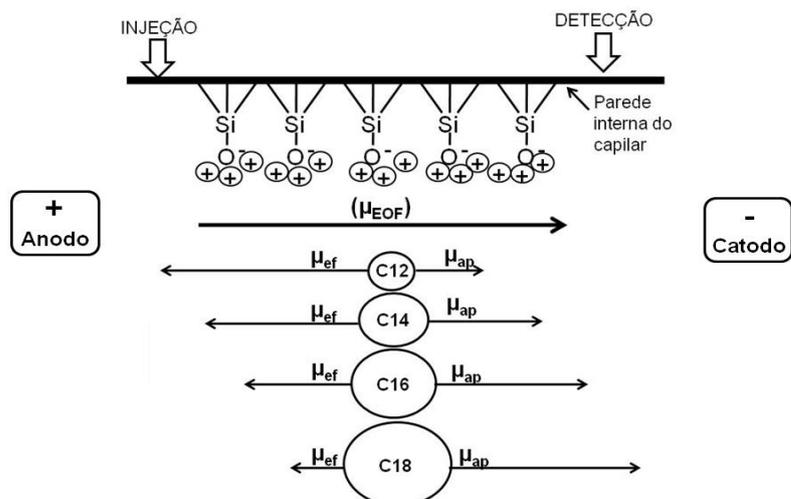


Figura 8: Representação esquemática da migração de AG de diferentes tamanhos sob fluxo eletrosmótico normal e polaridade positiva. Ordem de migração das espécies seria C18, C16, C14 e por último C12.
Fonte: o autor.

Como já foi mencionado anteriormente, os AG encontrados em óleo e gorduras estão, predominantemente, na forma de triacilglicerídeos (TG). No entanto, os AG para serem analisados por CZE devem estar dissociados do glicerol, ou seja, os AG devem estar na sua forma livre e carregados negativamente (pH do BGE maior que o pKa das espécies). Logo, faz-se necessário a realização da reação de hidrólise dos glicerídeos (amostras de óleo e/ou gordura) com a posterior formação de sais de AG. Tal reação, como exemplifica a Figura 9, consiste em uma hidrólise alcalina (saponificação), onde há adição de uma base forte (solução de NaOH dissolvida em MeOH) à amostra. Esta reação ocorre sob refluxo contínuo em haste de vidro, em um banho térmico com temperatura controlada de 75-80°C (Morrison e Boyd, 1992).

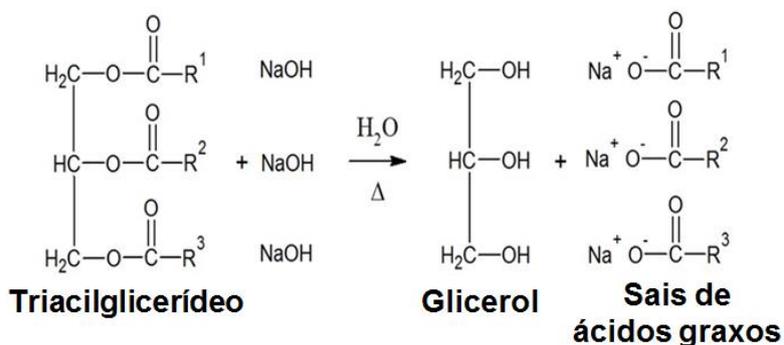


Figura 9: Esquema para reação de hidrólise básica dos glicerídeos.
Fonte: Adaptado de Morrison e Boyd, 1992.

3 PLANEJAMENTO E OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS

A essência de um bom planejamento consiste em projetar um experimento de forma que ele seja capaz de fornecer exatamente o tipo de informação que procuramos.

O planejamento fatorial é um recurso elegante capaz de auxiliar no planejamento dos experimentos para a obtenção dos dados de forma organizada e sistemática. Além disso, dentre os métodos de planejamento de experimentos disponíveis na literatura, o planejamento fatorial é o mais indicado quando se deseja estudar os efeitos de duas ou mais variáveis de influência, sendo que em cada tentativa ou réplica, todas as combinações possíveis dos níveis de cada variável são investigadas (Neto, Scarminio e Bruns, 2007).

Entretanto, o sucesso de um planejamento fatorial dependerá do conhecimento claro de seus objetivos e da maneira em que será estruturado e realizado. Para executar um planejamento fatorial é necessário definir quais são os fatores relevantes para o sistema e especificar os níveis em que cada fator será estudado, isto é, os valores dos fatores que serão empregados em cada ensaio (Neto, Scarminio e Bruns, 2007).

Montgomery (1997) propõe as seguintes etapas para o desenvolvimento de um planejamento de experimentos (Montgomery, 1997):

- Caracterização do problema,
- Escolha dos fatores de influência e níveis,
- Seleção das variáveis de resposta,
- Determinação de um modelo de planejamento de experimento,
- Condução do experimento,
- Análise dos dados,
- Conclusões e recomendações.

Nos dados multivariados, é possível analisar mais de uma variável simultaneamente, e assim identificar a correlação entre elas. Este tipo de análise permite um entendimento mais completo e sistematizado dos resultados analíticos (Massart *et al.*, 1997).

Técnicas de planejamento experimental permitem variar, de forma simultânea e sistemática, todas as variáveis relevantes envolvidas no processo ou no desenvolvimento de um produto, de tal maneira que a influência de cada variável possa ser estimada de forma precisa. A relação entre as variáveis envolvidas e a resposta ou propriedades do sistema

(produto ou processo) é então descrita através de modelos matemáticos que fornecem ao investigador um completo entendimento de seu domínio experimental e com um número mínimo de experimentos, permitindo a rápida tomada de decisões e evitando gastos desnecessários com novos experimentos (Massart *et al.*, 1997).

3.1 Delineamento composto central ou planejamento estrela

No presente trabalho, uma vez que já era do nosso conhecimento quais são os fatores importantes para o sistema sob investigação, o delineamento composto central (CCD do inglês *Central Composite Design*) foi utilizado. Tal planejamento é um delineamento simétrico e de segunda ordem, constituído de duas partes: o fatorial 2^k , com um ou mais pontos centrais, e a parte axial.

Box e Wilson, em 1951, apresentaram o CCD e suas vantagens, como por exemplo o pouco número de ensaios, devido à presença das seguintes partes no planejamento: um planejamento fatorial completo de dois níveis; experimentos no ponto central, isto é, $x_i = 0$ para todo i e, experimentos nos pontos axiais em que $x_i = \pm\alpha$ e $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$. Estes pontos são situados nos eixos do sistema de coordenadas com distância $\pm\alpha$ da origem e formam a parte estrela do planejamento (Box e Wilson, 1951).

Ainda, de acordo com Atkinson e Donev (1992), os delineamentos compostos pertencem a uma família de delineamentos eficientes, os quais requerem poucos ensaios para sua realização. Além disso, ele possui características interessantes para a busca do ponto que dê a resposta ótima, que são: um número menor de tratamentos em relação aos fatoriais completos e pode ser realizado sequencialmente, de forma a caminhar no sentido da otimização do sistema (Atkinson e Donev, 1992; Montgomery, 1997).

Em suma, o CCD é um delineamento que foi desenvolvido com o objetivo de permitir encontrar o ponto de resposta máxima ou mínima, em ensaios com k fatores, cada um com cinco níveis, e com um número de pontos inferior a outros tipos de delineamentos utilizados, por exemplo, o fatorial 2^3 , como pode ser exemplificado pela Figura 9.

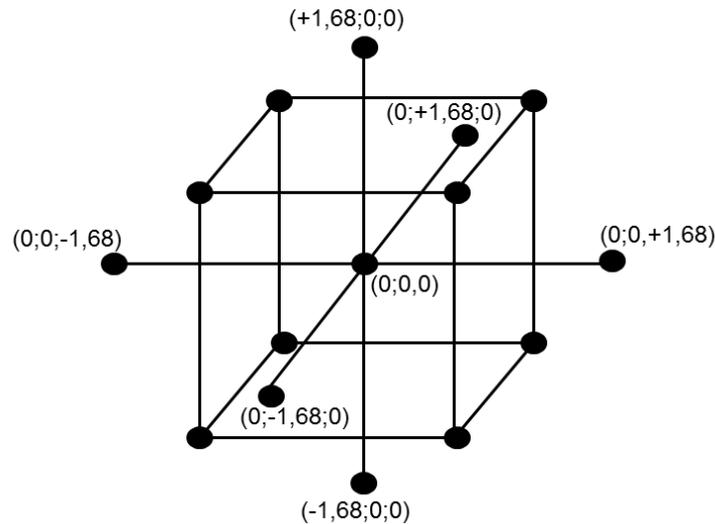


Figura 10: Representação esquemática do CCD rotacional para $k=3$ fatores.
Fonte: o autor.

Dentre as diversas vantagens da utilização de um planejamento fatorial, destacam-se as seguintes (Neto, Scarminio e Bruns, 2007):

- redução do número de ensaios sem prejuízo da qualidade da informação;
- estudo simultâneo de diversas variáveis, separando seus efeitos;
- determinação da confiabilidade dos resultados;
- realização da pesquisa em etapas, num processo iterativo de acréscimo de novos ensaios;
- seleção das variáveis que influenciam um processo com número reduzido de ensaios;
- representação do processo estudado através de expressões matemáticas;
- elaboração de conclusões a partir de resultados qualitativos.

3.2 Análise de componentes principais (PCA)

Análise de componentes principais (PCA do inglês *Principal Component Analysis*) é um método utilizado quando se deseja reduzir o número de variáveis e/ou eliminar sobreposições, utilizando para esta finalidade os dados a partir de combinações lineares das variáveis originais. Tais combinações são chamadas de componentes principais, que podem ser utilizadas como variáveis de previsão ou critério em análises subsequentes. Em outras palavras, a PCA é um método estatístico linear que encontra os autovalores e autovetores da

matriz de covariância dos dados e, com esse resultado, pode-se realizar a redução dimensional dos dados e analisar os padrões principais de variabilidade presentes. PCA é um método exploratório porque auxilia na elaboração de hipóteses gerais a partir dos dados coletados, contrastando com estudos direcionados nos quais hipóteses prévias são testadas. É também capaz de separar a informação importante da redundante e aleatória (Jolliffe, 2002).

3.3 Ferramentas estatísticas

A comparação dos resultados obtidos entre GC e CZE foi feita utilizando teste t-student para par de médias (Massart *et al.*, 1997; Neto, Scarminio e Bruns, 2007). Os softwares Microsoft Excel 2009 e SPSS Statistics 8.0 foram utilizados para cálculo dos pressupostos de normalidade, homocedasticidade e independência. Por fim, para cálculo da PCA dos eletroferogramas dos fígados dos ratos foi utilizado o software MatLab, onde os dados foram processados usando os parâmetros: 1-Norm, $area = 1$, SNV e mean center.

Os cálculos serão mostrados nos capítulos subsequentes.

4 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a otimização de metodologia analítica alternativa para análise de ácidos graxos *cis/trans* majoritários em amostras alimentícias e biológicas utilizando a eletroforese capilar de zona (CZE) como técnica de separação.

4.1 Objetivos específicos

- 1- Otimização da metodologia por CZE para análise de ácidos graxos *cis/trans* em diferentes amostras alimentícias e biológicas.
- 2- Análise de amostras de óleo vegetal novo e após o uso em processo de fritura por imersão com o intuito de investigar a ocorrência de alterações no teor de ácidos graxos dessas amostras, e comparar os resultados obtidos por CZE com a metodologia oficial por GC.
- 3- Utilização do perfil de ácidos graxos majoritários para avaliar o efeito do consumo de óleo de soja usado em frituras por imersão em ratos *Wistar*, inferindo quais as consequências para a saúde do animal.
- 4- Avaliação do perfil de alguns elementos minerais (metais) presentes no fígado dos animais estudados a fim de correlacionar com o processo metabólico dos lipídios.
- 5 – Estudo paralelo: estudo da separação dos homólogos de posição ácido vacênico e ácido eláidico por CZE.

5 OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA PARA ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS MAJORITÁRIOS POR CZE

A principal técnica utilizada para determinação do perfil de AG em diversas amostras é a GC, que inclui etapas de extração da fração lipídica e posterior derivatização em ésteres metílicos. Nesse cenário, a otimização de uma metodologia alternativa por CZE para esta determinação de AG majoritários em diferentes matrizes alimentícias e biológicas foi desenvolvida e será apresentada nos capítulos subseqüentes.

5.1 Ferramentas estatísticas

A verificação da falta de ajuste dos modelos implementados foi avaliada através do teste de hipótese *a priori* (ANOVA). A comparação dos resultados entre GC e CE foi feita utilizando teste t-student para par de médias (Massart *et al.*, 1997; Neto, Scarminio e Bruns, 2007). Os softwares Microsoft Excel 2009 e SPSS Statistics 8.0 foram utilizados para cálculo dos pressupostos de normalidade, homocedasticidade e independência.

5.2 Planejamento de experimentos

Em 2003, o grupo de pesquisa da professora Marina Tavares, da Universidade de São Paulo, realizou um excelente trabalho envolvendo a separação simultânea de AG *cis-trans* por CZE, usando SDBS, 1-octanol e Brij 35 como aditivos no eletrólito de corrida (Oliveira *et al.*, 2003b). No entanto, naquele momento, não foi possível realizar profundas considerações quantitativas devido a problemas relacionados com a adsorção no interior da parede capilar, fato que resultava na diminuição da resolução devido ao alargamento das bandas separadas e falta de repetibilidade da área de pico e no tempo de migração das espécies. Entretanto, as causas para a ausência de repetibilidade foram investigados em 2007 pelo Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ) da Universidade Federal de Juiz de Fora (Balesteros *et al.*, 2007). Os resultados confirmaram a suspeita de que a dissolução do revestimento externo do capilar (poliimida) pelo eletrólito estaria prejudicando a separação dos AG.

Em princípio, a solução para o problema de adsorção citado acima, foi a remoção de uma parte do revestimento externo nas extremidades de entrada e saída do capilar (1,5 cm), tamanho suficiente para evitar o contato da poliimida com a solução de eletrólito. No entanto, este processo pode ser considerado pouco atrativo, uma vez que prejudica o tempo de vida do

capilar devido frequentes quebras durante o ajuste do cartucho no equipamento de CE e ao longo das análises. Logo, uma nova investigação para a análise simultânea de AG *cis-trans* majoritários foi realizada, utilizando um capilar de sílica fundida com revestimento externo a base de polímero de Flúor (TSH). O capilar TSH é mais resistente à abrasão e oferece propriedades únicas de resistência a solventes orgânicos.

Foi realizado um planejamento composto central 2^3 contendo três fatores, dois níveis principais, adicionado de seis níveis axiais e três pontos centrais, totalizando dezessete ensaios com a finalidade de otimizar a separação simultânea de C18:0, C18:1 *9t*, C18:1 *9c*, C16:0, C16:1 *9c*, C18:2 *9c*, *12c* e C18:3 *9c*, *12c*, *15c*. Os fatores considerados no estudo foram Brij 35, ACN e 1-octanol. Cabe ressaltar, que o fator Brij35 tem influência na separação do par *cis-trans*, ACN garante a solubilidade dos AG no sistema aquo-orgânico evitando, assim, a formação de micelas entre os AG e, o álcool 1-octanol que atua como co-solvente auxiliando na separação entre os AG contendo o mesmo comprimento da cadeia equivalente (ECL), tais como C16:0 e C18:2 *9c*, *12c* (Oliveira *et al.*, 2003b). Padrões de ácidos graxos C18:0, C18:1 *9t*, C18:1 *9c*, C16:0, C18:2 *9c*, *12c*, C16:1 *9c*, C18:3 *9c*, *12c*, *15c*, C15:0 e C13:0 foram usados para o estudo do desempenho da separação. Neste estudo, C13:0 e C15:0 foram considerados como possíveis padrões internos. Outras variáveis, tais como: voltagem, temperatura do cartucho, dimensão do capilar, comprimento de onda, concentração dos AG na mistura de padrão e componentes do eletrólito (concentração do SDBS e do tampão fosfato) foram mantidos constantes.

A Tabela 3 mostra a matriz do CCD contendo níveis, fatores e as respostas consideradas. As respostas avaliadas levaram em conta a resolução entre os pares críticos C18:1t/C18:1c e C16:0/C18:2cc, uma vez que os outros pares de AG adjacentes não apresentaram problemas de resolução e a Figura 11 mostra os eletroferogramas representativos obtidos a partir dos modelos experimentais de CCD.

Tabela 3: Matriz do planejamento composto central 2^3 (CCD) contendo níveis, fatores e a resposta expressa como resolução entre os pares críticos C18:1t/C18:1c e C16:0/C18:2cc.

Ensaio	Brij 35	1-octanol	ACN	R _{C18:1t/C18:1c}	R _{C16:0/C18:2cc}
1	-1	-1	-1	1,26	1,05
2	1	-1	-1	0,95	0,97
3	-1	1	-1	1,10	1,05
4	1	1	-1	1,01	1,06
5	-1	-1	1	1,18	1,00
6	1	-1	1	0,96	0,94
7	-1	1	1	1,25	1,00
8	1	1	1	1,05	1,07
9	-1,68	0	0	1,44	1,16
10	1,68	0	0	1,02	1,06
11	0	-1,68	0	1,00	0,99
12	0	1,68	0	0,97	0,97
13	0	0	-1,68	1,01	1,17
14	0	0	1,68	1,09	0,92
15	0	0	0	1,10	1,10
16	0	0	0	0,94	1,04
17	0	0	0	1,20	1,05

Brij 35 (mmol L⁻¹): (-1) 9,0;(0) 10,0; (1) 11,0; (-1,68) 8,3; (1,68) 11,7

1-octanol (% v/v): (-1) 1,8; (0) 2,0; (1) 2,2; (-1,68) 1,7; (1,68) 2,3

ACN (% v/v): (-1) 44,0; (0) 45,0; (1) 46,0; (-1,68) 43,3; (1,68) 46,7

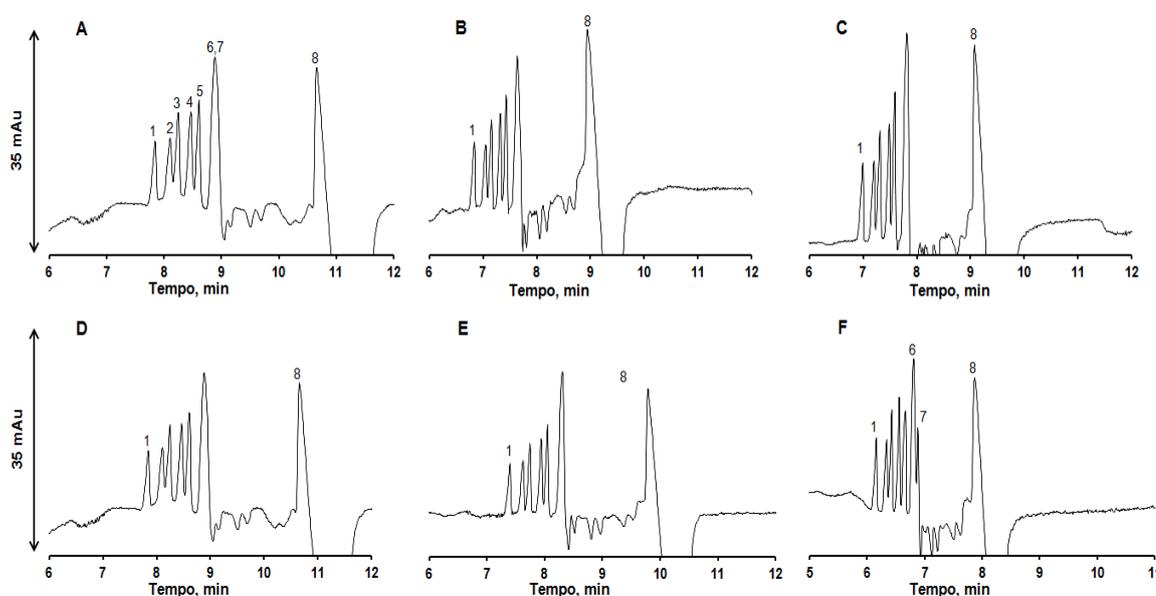


Figura 11: Eletroferograma dos padrões de AG obtidos a partir do planejamento CCD. (1) C18:0, (2) C18:1 9t, (3) C18:1 9c, (4) C16:0, (5) C18:2 9c, 12c, (6) C18:3 9c, 12c, 15c, (7) C15:0 e (8) C13:0, todos com concentração de 0,50 mmol L⁻¹.

As condições para ACN, Brij 35 e 1- octanol são as descritas no planejamento CCD 2³ para: A- Ensaios 12, 2, 6, 11, 16, 5 com perfis semelhantes, B- Ensaios 4, 10, 8 com perfis semelhantes, C- Ensaios 17, 1, 7 com perfis semelhantes, D- Ensaios 3, 15, 14 com perfis semelhantes, E- Ensaio 9, F- Ensaio 13. Todos os eletrólitos foram adicionados com 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS e 15,0 mmol L⁻¹ de tampão NaH₂PO₄/Na₂HPO₄. **Condições operacionais:** injeção por 5 s a 12,5mbar, voltagem +19 kV, detecção indireta em 224 nm (picos invertidos) e temperatura de 25 °C no interior do cartucho, capilar TSH com 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo) 75 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo.

Fonte: o autor.

Através da análise dos resultados obtidos a partir de planejamento CCD (Tabela 3), é possível observar que, por meio do cálculo de resolução não foi possível obter a separação completa dos pares críticos em questão, isto é, C18:1 9t/C18:1 9c e C16:0/C18:2 cc. Destaca-se que os melhores valores de resolução foram encontrados para o ensaio 9, isto é 1,44 para C18:1 9t/C18:1 9c e 1,16 para C16:0/C18:2 cc. Por outro lado, o cálculo convencional do planejamento CCD mostrado na Tabela 4, não gerou informação relevante para a separação, uma vez que apenas o efeito ACN foi considerado significativo dentro do intervalo de 95% (valor de p-valor menor que 0,05) para o par crítico C16:0/C18:2 cc.

Tabela 4: Resultados do planejamento CCD 2³.

Fator	R _{C18:1t/C18:1c}			R _{C16:0/C18:2cc}		
	Coefficiente.	Erro	p-valor	Coefficiente	Erro	p-valor
Constante	1,080	0,075	0,005*	1,060	0,018	0,000*
X₁	-0,112	0,035	0,088	-0,017	0,009	0,195
X₂	0,001	0,035	0,986	0,014	0,009	0,257
X₃	0,018	0,035	0,652	-0,040	0,009	0,045*
X₁ X₁	0,054	0,039	0,298	0,011	0,010	0,382
X₂ X₂	-0,032	0,039	0,496	-0,035	0,010	0,066
X₃ X₃	-0,009	0,039	0,835	-0,012	0,010	0,326
X₁ X₂	0,030	0,046	0,584	0,027	0,011	0,137
X₁ X₃	-0,002	0,046	0,962	0,010	0,011	0,472
X₂ X₃	0,032	0,046	0,556	0,005	0,011	0,703

*Efeitos significativos dentro do intervalo de 95% de confiança.

Onde X₁: Brij 35; X₂: 1-octanol; X₃: ACN.

Como o cálculo convencional do planejamento não apresentou informações relevantes, um estudo envolvendo a análise de componentes principais (PCA do inglês *Principal Component Analysis*) foi realizado, como pode ser observado pela Figura 12.

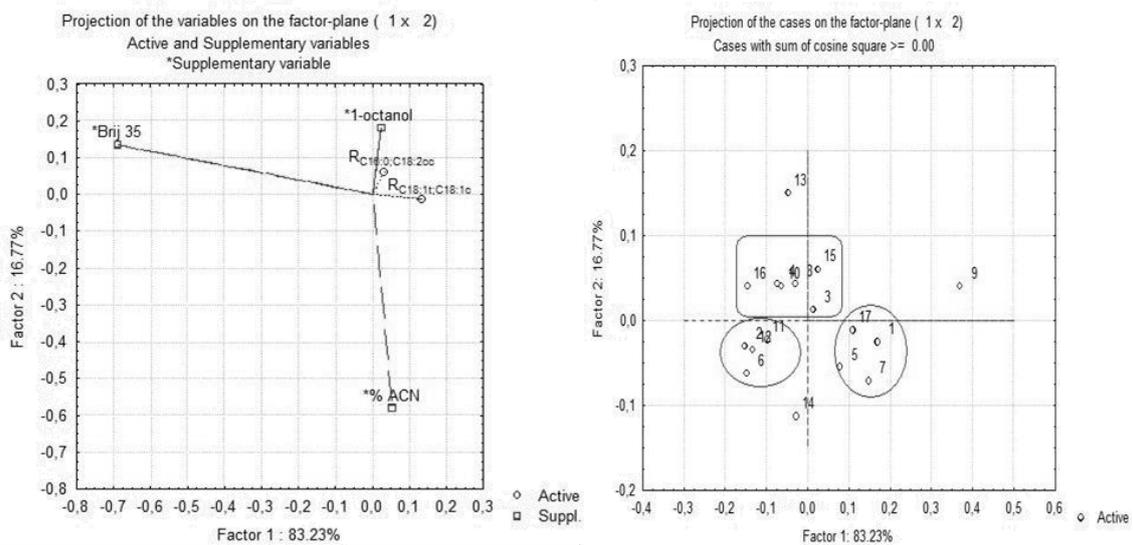


Figura 12: Resultados da PCA: gráficos de *loading* e *scores*, respectivamente.
Fonte: o autor.

Os gráficos de *scores* e *loadings* obtidos por meio dos cálculos de PCA fornecem informações sobre os objetos e variáveis, respectivamente. Logo, os *scores* representam o conjunto de 17 ensaios realizados, enquanto que os *loadings* fornecem informações sobre os fatores investigados Brij 35, 1-octanol e ACN.

Analisando o gráfico de *scores*, observou-se que o ensaio 9 permaneceu muito separado, em comparação com aos outros ensaios, uma vez que este ensaio apresenta melhores resultados de resolução para ambos os pares críticos quando comparado com os outros ensaios desenvolvidos. Por outro lado, através da análise do gráfico *loadings*, foi possível observar que os pares críticos são influenciados diretamente pela variável 1-octanol, já que este fator se encontra mais próximo das respostas.

Assim, a partir deste resultado, um novo ensaio experimental foi realizado mantendo-se as variáveis Brij 35 e ACN com níveis fixos de acordo com o ensaio 9 e variando apenas 1-octanol na faixa de 2,0-2,2% v/v, com incremento de 0,1% v/v, uma vez que para valores de 1-octanol abaixo de 2,0% v/v no planejamento CCD, a resolução calculada foi distante de 1,5. Portanto, após o novo ensaio experimental realizado, a melhor resposta foi obtida com o valor de 2,1% v/v de 1-octanol, como pode ser observado nos eletroferogramas obtidos a 224 nm e 206 nm, apresentados na Figura 13. O comprimento de onda de 206 nm é muito importante para confirmar a presença dos ácidos linoleico e linolênico, já que como estes ácidos apresentam duas ou mais insaturações na cadeia de carbônica, apresentam sinal de pico positivo, já que neste comprimento de onda a absorvidade molar destes AG é maior do que a do cromóforo (SDBS).

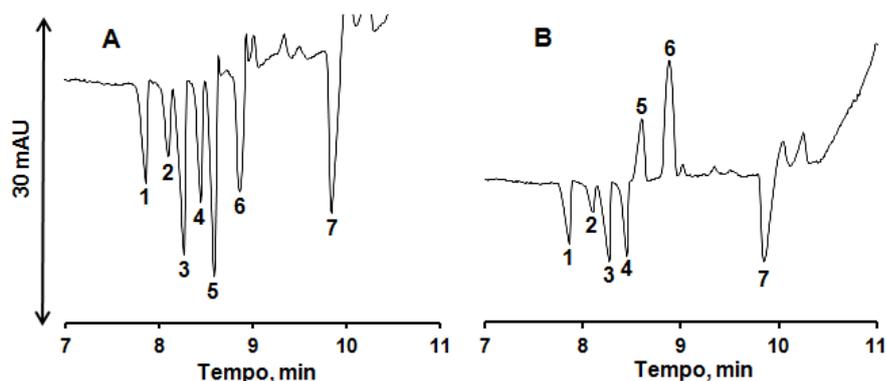


Figura 13: Eletroferograma de padrões de AG (1) C18:0 - 0.50 mmol L⁻¹, (2) C18:1 9t - 0.50 mmol L⁻¹, (3) C18:1 9c - 0.90 mmol L⁻¹, (4) C16:0 - 0.50 mmol L⁻¹, (5) C18:2 9c, 12c - 0.90 mmol L⁻¹, (6) C18:3 9c, 12c, 15c - 0.50 mmol L⁻¹, (7) C13:0 (PI) - 0.50 mmol L⁻¹ A- em 224 nm. B- em 206 nm, onde é possível verificar a inversão dos picos dos AG poli-insaturados.

Eletrólito: 15,0 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH 6,86); 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS, 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v de 1-octanol. **Condições de análise:** injeção 5 s x 12,5 mbar, +19 kV, 25°C, detecção indireta em 224 (±2) nm e 206 (±2) nm, capilar de TSH com 40 cm de comprimento efetivo, 75 µm d.i e 375 µm d.e. e 48,5 cm de comprimento total.

Fonte: o autor.

Após todos os estudos apresentados acima, definiu-se o eletrólito de suporte capaz de realizar a separação simultânea em linha base dos ácidos C18:0, C18:1 9t, C18:1 9c, C16:0, C18:2 9c, 12c; C18:3 9c, 12c, 15c e C13:0. Tal eletrólito consiste de: **15,0 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ de pH 6,8; 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS; 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35; 45% v/v de ACN e 2,1% de 1-octanol.**

5.3 Metodologia

5.3.1 Instrumentação

As análises por CZE foram realizadas em um equipamento Agilent 7100, (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA, equipado com arranjo de diodos DAD), a aquisição dos dados foi realizada pelo software HP ChemStation, rev B.04.03. Em todos os experimentos foram usados capilares de sílica fundida com revestimento externo de polímero de flúor (TSH - Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA), contendo 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo), 75 µm de d.i e 375 mm de d.e.

5.3.2 Cálculo dos fatores de resposta para ácidos graxos

A proposta de quantificação dos AG C18:0, C18:1 9t, C18:1 9c, C16:0, C18:2 9c, 12c, C18:3 9c, 12c, 15c e C16:1 9c em amostras reais, baseou-se no cálculo de um fator de resposta (F_R) para cada AG, utilizando C13:0 como padrão interno (PI) (Castro *et al.*, 2010). Inicialmente, alguns testes foram realizados usando C15:0 como possível PI. Entretanto, este AG apresenta comprimento de cadeia equivalente e tempo de migração iguais ao do C18:3 ccc, fatos que tornam o C15:0 inadequado para uso como padrão interno.

Para calcular o F_R , uma curva analítica com réplicas autênticas e aleatórias foi realizada utilizando padrões de C18:0, C18:1 9t, C18:1 9c, C16:0, C18:2 9c, 12c, C18:3 9c, 12c, 15c e C16:1 9c e C13:0. As concentrações dos padrões supracitados foram de 0,15; 0,30; 0,50; 0,70; 0,90 e 1,10 mmol L⁻¹ para todos os AG, exceto para o C16:1 9c cuja faixa linear empregada foi de 0,05; 0,30; 0,55; 0,80 e 1,05 mmol L⁻¹. Porém, destaca-se que a concentração do PI (C13:0) foi fixada em 0,5 mmol L⁻¹ em todas as curvas.

O modelo de regressão para cada AG foi implementado utilizando método dos mínimos quadrados. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk, homocedasticidade foi averiguada utilizando teste de Levene (diferentes números de réplicas no nível) ou teste de Cochran (mesmo número de réplicas no nível) e a independência dos resíduos foi examinada por meio do teste de Durbin-Watson.

As curvas analíticas para C18:1 9c, C16:0 e C18:2 9c,12c apresentaram comportamento heterocedástico, ou seja, as variâncias apresentaram forte dispersão ao longo da retas. Desse modo, fez-se necessário o uso do modelo de regressão que utiliza método dos mínimos quadrado ponderados (Massart *et al.*, 1997). Após a implementação da regressão, a falta de ajuste do modelo foi verificada através do teste de hipótese *a priori* (ANOVA) que é descrito pela Equação 7 (Danzon e Currie, 1998).

$$F_{calc} = \frac{S_{y,x}^2}{S_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p - 2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} (\bar{y}_{ij} - \hat{y}_i)^2 / (m - p)} \quad (7)$$

Onde: m_i é o número de medidas de cada nível da curva, p é o número de níveis usados na construção da curva analítica e m é o número total de observações, ou seja, número de níveis multiplicado pelo número de réplicas em cada nível.

Este teste é realizado através da comparação entre os valores calculados e o valor tabelado, dentro de um intervalo de confiança adequado. Se o valor de F calculado for maior ou igual ao valor de F tabelado (crítico), o modelo de regressão linear não pode ser aplicado, pois apresenta falta de ajuste.

Neste trabalho, os modelos implementados foram satisfatórios, ou seja, não apresentaram falta de ajuste dentro de um intervalo de 95% de confiança, uma vez que todos os valores de F calculados foram menores que os valores tabelados para todos os AG estudados. Sendo assim, a hipótese nula pode ser aplicada, indicando que o teste de linearidade pode ser considerado satisfatório ao longo de toda a faixa de concentração estudada e os coeficientes angulares dos modelos gerados podem ser usados na etapa de quantificação como fatores de resposta.

Os valores de F_R de cada AG foram 0,477; 0,506; 0,555; 0,589; 0,626; 0,818 e 0,425 para C18:0, C18:1 9t, C18:1 9c, C16:0, C18:2 9c, 12c, C18:39c, 12c, 15c e C16:1 9c, respectivamente, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5: Resultados estatísticos: Falta de ajuste do modelo e F_R calculado para cada ácido graxo de interesse.

AG	F_{calc}	F_{tab}	Coefficiente angular	Intercepto	r
C18:0	0,39	5,41 ^{&}	0,477(±0,021)	- 0,018(±0,033)	0,999
C18:1t	2,89	3,84 ^{\$}	0,506(±0,018)	- 0,103(±0,027)	0,992
C18:1c	2,54	3,84 ^{\$}	0,555(±0,021)	- 0,046 (±0,021)	0,984
C16:0	2,36	3,84 ^{\$}	0,589(±0,022)	- 0,028(±0,030)	0,960
C18:2cc	0,43	3,36 [*]	0,626(±0,022)	- 0,0736(±0,031)	0,999
C18:3ccc	3,04	3,84 ^{\$}	0,818(±0,032)	- 0,002(±0,042)	0,991
C16:1 c	1,37	3,70 [#]	0,425(±0,025)	0,053(±0,025)	0,978

* $F_{tab}(v_1=4, v_2=11)$; ^{\$} $F_{tab}(v_1=4, v_2=8)$; [&] $F_{tab}(v_1=3, v_2=5)$; [#] $F_{tab}(v_1=3, v_2=10)$
 v_1 : grau de liberdade do numerador; v_2 : grau de liberdade do denominador.
 Intervalo de 95% de confiança.

A quantificação dos AG usando os fatores de resposta calculados é descrita pela Equação 8.

$$\frac{A_{AG}}{[AG]} = F_R \frac{A_{C13:0}}{[C13:0]} \quad (8)$$

Onde: A_{AG} é a área de cada AG em questão, $A_{C13:0}$ é a área do PI, $[AG]$ é a concentração de cada AG em mmol L^{-1} , $[C13:0]$ é a concentração do PI fixada em $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ e F_R é o coeficiente angular do modelo obtido para cada AG.

Uma vez que o modelo foi considerado satisfatório, o coeficiente angular da curva analítica implementada pode ser usado como F_R na Equação 8, desde que o PI C13:0 seja adicionado na amostra na concentração de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$. Logo, a concentração de cada AG (em porcentagem) em amostras reais pode ser obtida utilizando um rearranjo da equação 8, gerando a Equação 9, como mostrada abaixo.

$$\%AG = \frac{A_{AG} \cdot [C13:0] \cdot V \cdot MM_{AG}}{F_R \cdot A_{C13:0} \cdot m} \cdot 100 \quad (9)$$

Onde: A_{AG} é a área de cada AG em questão, $A_{C13:0}$ é a área do PI e $[C13:0]$ é a concentração do PI fixada em $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, MM_{AG} é a massa molar de cada AG, V é o volume em litros e m é a massa de amostra pesada em mg.

Após a otimização da metodologia e da obtenção dos F_R de cada AG, o próximo passo foi a aplicação em diferentes amostras reais (matrizes alimentícias e biológicas) para quantificação dos AG em questão. Alguns parâmetros de validação, tais como exatidão e precisão foram avaliados comparando os resultados obtidos por CZE com resultados da metodologia oficial (GC), recomendado pela *American Oil Chemist's Society*. Tais resultados serão apresentados nos capítulos a seguir.

6 DETERMINAÇÃO DE TRANS TOTAL EM AMOSTRAS DE REQUEIJÃO

De acordo com regulamento técnico, define-se como requeijão o produto obtido pela fusão da massa coalhada, cozida ou não, dessorada e lavada, obtida por coagulação ácida e/ou enzimática do leite opcionalmente adicionada de creme de leite e/ou manteiga e/ou gordura anidra de leite. O produto poderá estar adicionado de condimentos, especiarias e/ou outras substâncias alimentícias, caso seja necessário (Anvisa, 1996).

A denominação Requeijão está reservada ao produto no qual a base láctea não contenha gordura e/ou proteína de origem não láctea. Entretanto, tem-se usado gordura vegetal hidrogenada (GVH) na fabricação do requeijão com intuito de tornar o produto mais barato e competitivo, melhorar sua textura, além de ampliar sua utilização no meio culinário (aplicação em pizzas e salgado, por exemplo) (Cunha, Dias e Viotto, 2010). De acordo com a Instrução Normativa Nº 22/2005 da ANVISA, o produto de origem animal com adição de gordura vegetal deve indicar no painel principal do rótulo, logo abaixo do nome, em caracteres uniformes em corpo e cor, sem intercalação de desenhos ou dizeres, com letra em caixa alta e em negrito - **CONTÉM GORDURA VEGETAL** (Anvisa, 2005).

Com base na grande utilização deste produto e na variedade de marcas de requeijão com AMIDO E GORDURA VEGETAL HIDROGENADA disponível no mercado, faz-se necessário o uso de uma metodologia alternativa que seja rápida e eficiente para determinação do teor de *trans total* por CZE, expresso em ácido elaídico, já que este ácido graxo é o *trans* majoritário (80-100%) encontrado em amostras oriundas de processo de hidrogenação industrial (Silva e Ferraz, 2006).

Neste capítulo serão omitidos os cálculos de otimização da metodologia e da obtenção do F_R do ácido elaídico (C18:1 *9t*), já que estes foram discutidos em detalhes no capítulo anterior.

6.1 Preparo da amostra

6.1.1 Preparo da amostra para análise por CZE

Foram selecionadas cinco diferentes marcas de requeijão disponíveis no mercado que continham GVH em sua composição. Estas amostras foram pesadas individualmente (em torno de 200 mg) e foram diretamente saponificadas em NaOH/MeOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) por 25 minutos sob refluxo, como mostra o fluxograma apresentado na Figura 14.

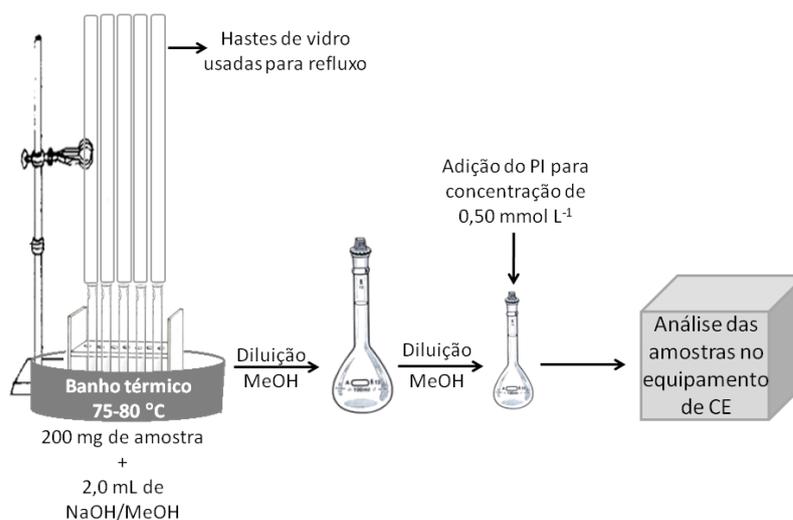


Figura 14: Fluxograma esquemático para preparo das amostras por CZE.

Fonte: o autor.

Após a etapa de saponificação, as amostras foram diluídas ($200 \mu\text{L}$ para $1,0 \text{ mL}$) e o PI (C13:0) com concentração final de $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$ foi adicionado antes da injeção no equipamento de eletroforese. É importante destacar que após a etapa de saponificação, pode haver eventuais resíduos sólidos remanescentes nos tubos, e essa massa deve ser descontada da massa inicial de amostra (após completa secagem do solvente) para os cálculos finais do teor de AG.

6.1.2 Preparo da amostra para análise por GC

As amostras das diferentes marcas de requeijão (supracitadas) foram extraídas na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) de acordo com protocolo padrão do Instituto Adolfo Lutz (Lutz, 2005). Após a etapa de extração, a fração lipídica das amostras de

requeijão foram esterificadas de acordo com Metcalfe *et al.*, 1966 e Hartman e Lago, 1973 (Metcalfe, Schmitz e Pelka, 1966; Hartman e Lago, 1973).

6.2 Instrumentação

6.2.1 Eletroforese capilar

As análises por CZE foram realizadas em um equipamento Agilent 7100, (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA, equipado com arranjo de diodos DAD), aquisição dos dados foi realizada pelo software HP ChemStation, rev B.04.03. Em todos os experimentos foram usados capilares de sílica fundida com revestimento externo de polímero de flúor (TSH - Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA), contendo 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo), 75 µm de d.i. e 375 µm de d.e. O uso do capilar TSH é mais apropriado, devido à sua resistência à abrasão, além de sua propriedade ímpar de resistência a solventes orgânicos. O capilar de TSH evita adsorção irreversível do revestimento externo à parede interna capilar. Evitando, assim, problemas no desempenho da separação dos AG, como por exemplo, falta de repetibilidade e alargamento dos picos após algumas injeções, como demonstrado por Balesteros *et al.* (Balesteros, Faria e Oliveira, 2007).

6.2.2 Cromatografia a gás

Para determinação do teor AG *trans* nas diferentes marcas de requeijão com GVH, utilizou-se a metodologia oficial recomendada pela *American Oil Chemist's Society* AOCS Ce 1f-96: “*Determination of cis- and trans- Fatty Acids in Hydrogenated and Refined Oils and Fats by Capillary GLC, Reapproved 1997 • Revised 2002*” com algumas adaptações no programa de temperatura. As análises foram executadas em um cromatógrafo a gás da marca Agilent modelo GC 710017A, com detector de ionização de chama (FID) disponível na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (AOCS, 1996).

As condições de trabalho foram: injeção com *split/spitless* operado com uma razão de *split* de 1:100 e coluna capilar HP-88 (88% Cianopropylaryl 60 m x 0,250 mm d.i x 0.20 µm de filme), hélio como gás de arraste na vazão de 1mL/min, temperatura do injetor de 260°C, temperatura do forno em 140°C por 5 min, programa de temperatura em 4°C/min até 240°C,

onde foi mantido por 10min. A identificação dos picos cromatográficos dos ésteres metílicos das amostras foi obtida por comparação do tempo de retenção dos padrões de ésteres metílicos (AOCS, 1996).

6.3 Quantificação do teor de trans total por CZE e comparação com método oficial

A determinação do teor de *trans* total, expresso em ácido elaídico (C18:1 *9t*), foi realizada após etapa de saponificação das amostras de requeijão e por meio da integração das áreas dos picos de C18:1 *9t* e C13:0 através dos eletroferogramas mostrados na Figura 15.

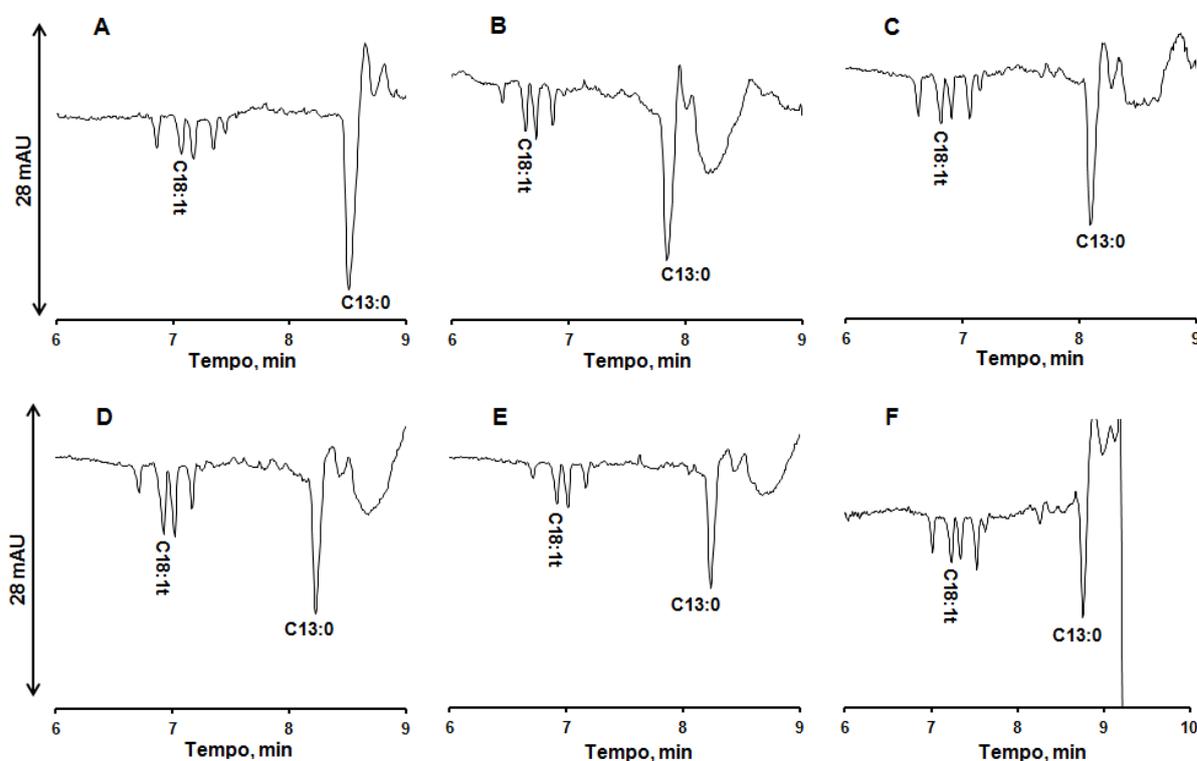


Figura 15: Eletroferograma das 6 diferentes marcas de requeijão. Eletrólito: 15,0 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH 6,86); 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS, 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v de 1-octanol.

Condições de análise: injeção 5 s x 12,5 mbar, +19 kV, 25°C, detecção indireta em 224 (±2) nm, capilar de TSH com 40 cm de comprimento efetivo, 75 µm d.i e 375 µm d.e. e 48,5 cm de comprimento total.

Fonte: o autor.

A quantificação foi realizada utilizando o fator de resposta para C18:1 *9t* ($F_R=0,506$ – cálculos mostrados no capítulo 5) e de acordo com a Equação 9.

$$\%C_{18:1\ 9t} = \frac{A_{C_{18:1\ 9t}} \cdot [C_{13:0}] \cdot V \cdot MM_{C_{18:1\ 9t}}}{F_R \cdot A_{C_{13:0}} \cdot m} \cdot 100 \quad (9)$$

Onde: $A_{C_{18:1\ 9t}}$ é a área da ácido eláídico, $A_{C_{13:0}}$ é a area do PI, e $[C_{13:0}]$ é a concentração do PI fixada em $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, $MM_{C_{18:1\ 9t}}$ é a massa molar do ácido eláídico, V é o volume em litros e m é a massa de amostra pesada em mg.

Para checar a confiabilidade da metodologia otimizada por CZE, os resultados obtidos foram comparados com o metodologia oficial por GC, descrito pela AOCS Official Method Ce 1f-96, Reapproved 1997 • “Revised 2002” (AOCS, 1996). A Tabela 6 mostra os resultados estatísticos encontrados para CE e GC (Teste de normalidade de Shapiro-Wilk e teste *t-student* pareado), onde observa-se que não foram verificadas diferenças significativas entre as duas metodologias em um intervalo de 95% de confiança (p-valor > 0,05).

Tabela 6: Resultados da análise de diferentes marcas de requeijão com GVH por CE comparadas com GC.

<i>Amostras</i>	<i>CE(g/100g)</i>	<i>GC (g/100g)</i>	<i>Média e desvio CE</i>	<i>Média e desvio GC</i>
B	2,58	3,01	2,75±0,23	2,95±0,08
B	2,91	2,90		
C	2,37	2,36	2,34±0,05	2,42±0,08
C	2,30	2,48		
D	4,40	4,26	4,24±0,22	4,34±0,11
D	4,09	4,41		
E	5,38	5,14	5,42±0,01	5,34±0,14
E	5,36	5,34		
F	3,27	3,10	3,30±0,05	3,13±0,04
F	3,34	3,16		

Teste de normalidade (Shapiro–Wilk): p-valor 0,28

Teste *t-student* pareado: p-valor 0,83.

Análise realizada em duplicata autêntica.

Os resultados encontrados sinalizam positivamente para o uso da metodologia otimizada por CZE para análise de *trans total*, expresso em ácido elaídico, em amostras de requeijão com GVH, uma vez que esta metodologia apresenta curto tempo de análise (9 minutos), ausência de etapas de extração da fração lipídica e derivatização, uso de pequenos volumes de solventes e utilização de colunas capilares não específicas.

Cabe ressaltar que os dados apresentados neste capítulo 6 foram publicados no ano de 2012 na revista *Food Control* (vol. 23, p. 456-461), com o título de **“A rapid method for monitoring total trans fatty acids (TTFA) during industrial manufacturing of Brazilian spreadable processed cheese by capillary zone electrophoresis”**.

7 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁCIDOS GRAXOS MAJORITÁRIOS EM DIVERSAS AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS

Para mostrar a aplicabilidade do método proposto por CZE, o teor de alguns AG foi determinado nas seguintes amostras alimentícias: amostras de manteiga, margarina, biscoito recheado, gordura vegetal hidrogenada e azeite de oliva. A quantificação foi baseada nos modelos matemáticos descritos detalhadamente no capítulo 5 e nos fatores de resposta calculados.

7.1 Preparo de amostra

7.1.1 Preparo das amostras para análise por CZE

Todas as amostras analisadas por CZE (manteiga, margarina, biscoito recheado, gordura vegetal hidrogenada, óleo de soja e azeite de oliva) foram preparadas pesando-se em torno de 200 mg de cada amostra, processo ilustrado de acordo com o fluxograma apresentado na Figura 16.

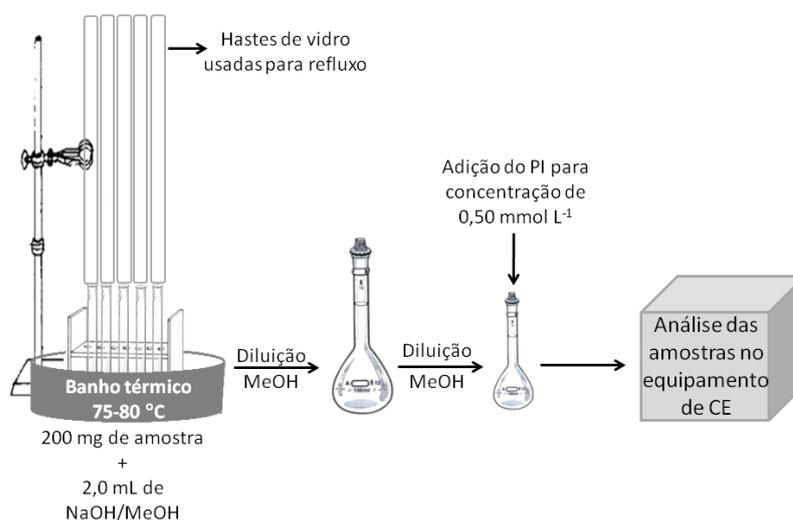


Figura 16: Fluxograma esquemático para preparo das amostras por CE.
Fonte: o autor.

Após a etapa de saponificação com NaOH/MeOH (0,5 mol L⁻¹) por 25 minutos sob refluxo, as amostras foram diluídas de acordo com cada amostra e o PI (C13:0) com concentração final de 0,50 mmol L⁻¹ foi adicionado antes da injeção no equipamento de eletroforese. A diluição de cada amostra é descrita de acordo com a Tabela 7. É importante

destacar que após a etapa de saponificação, pode haver eventuais resíduos sólidos remanescentes nos tubos, e essa massa foi descontada da massa inicial de amostra para os cálculos do teor final.

Tabela 7: Volumes usados na diluição das amostras para análise por CE.

Amostra	Diluição
Manteiga (MT)	30 µL para 1,0 mL
Margarina (MG)	50 µL para 1,0 mL
Óleo de soja (OS)	100 µL para 1,0 mL
Biscoito recheado (BR)	100 µL para 1,0 mL
Gordura vegetal hidrogenada (GVH)	40 µL para 1,0 mL
Azeite de oliva (AO)	30 µL para 1,0 mL

7.1.2 Preparo das amostras para análise por GC

As amostras de azeite de oliva, óleo de soja, gordura vegetal hidrogenada, manteiga e margarina foram diretamente metiladas de acordo com procedimento de Hartman e Lago (Hartman e Lago, 1973). Para o biscoito recheado foi necessária uma etapa de extração da fração lipídica pelo método de Soxhlet (Lutz, 2005).

Para análise do teor de AG nas amostras supracitadas utilizou-se a metodologia oficial por GC recomendada pela *American Oil Chemist's Society* AOCS Ce 1j-07 (AOCS, 2008). O preparo das amostras, bem como a análise por GC foram realizadas por meio de uma colaboração com o Instituto Adolfo Lutz em São Paulo.

7.2 Instrumentação

7.2.1 Eletroforese Capilar

As análises das amostras supracitadas foram realizadas em um equipamento Agilent 7100, (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA, equipado com arranjo de diodos DAD), aquisição dos dados foi realizada pelo software HP ChemStation, rev B.04.03. Em todos os experimentos foram usados capilares de sílica fundida com revestimento externo de polímero de flúor (TSH - Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA), contendo 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo), 75 µm de d.i e 375 µm de d.e.

7.2.2 Cromatografia à gás

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) preparados foram analisados por GC, em um equipamento da Shimadzu, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida com uma fase estacionária de ciano propil polissiloxano (CP-7420TM, 100 m x 0,25 mm d.i., 0,25 µm espessura do filme - Agilent, EUA). As condições cromatográficas foram as seguintes: uma temperatura da coluna programada: 45 °C durante 4 min; aumento de 12 °C/min até 175 °C (mantida por 27 min), então um aumento de 4 °C/min a 215 °C (mantida por 35 min). A temperatura do injetor e do detector foi estabelecida a 250 °C, o gás de arraste utilizado foi hidrogênio e a pressão da coluna foi de 175 kPa (AOCS, 2008). Os FAMES foram solubilizados em 1-heptano e injetados no equipamento de GC sob as condições descritas acima. Os AG foram determinados pela adição de FAME 13:0 como padrão interno. Os resultados foram expressos em g/100g (duplicata autêntica).

7.3 Comparação entre CZE e GC

Para mostrar a confiabilidade do método proposto por CZE para diferentes matrizes, os resultados obtidos foram comparados com a metodologia oficial por GC. Os cromatogramas obtidos para as amostras de manteiga, margarina, biscoito recheado, gordura vegetal hidrogenada, óleo de soja e azeite de oliva são apresentados na Figura 17 e os eletroferogramas destas mesmas amostras estão apresentados na Figura 18.

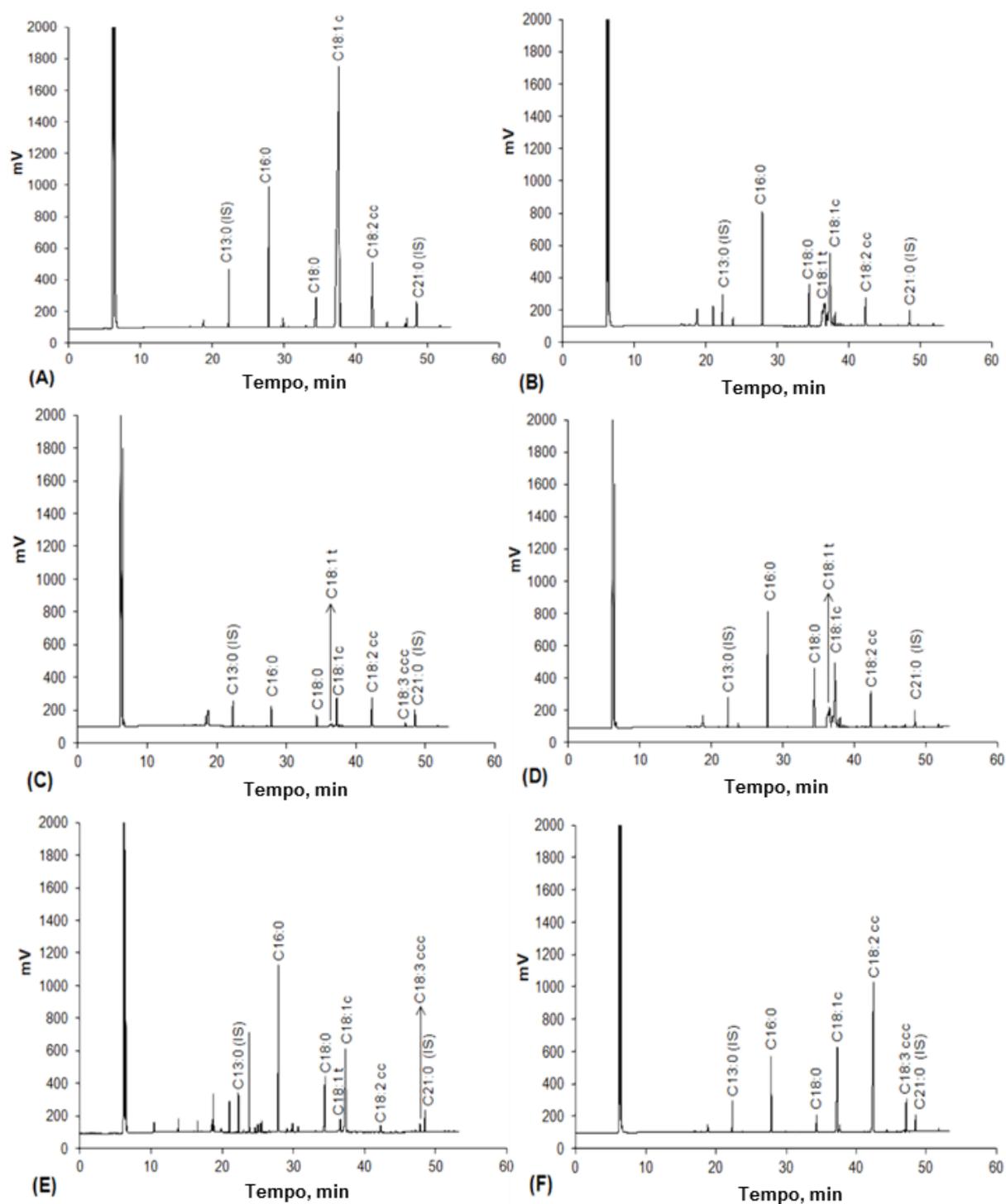


Figura 17: Cromatogramas das amostras: A- Azeite de Oliva, B- Gordura Vegetal Hidrogenada, C- Margarina, D- Biscoito Recheado, E- Manteiga, F- Óleo de Soja.

Condições operacionais: temperatura controlada da coluna: 45°C por 4 min; aumento de 12°C min⁻¹ até 175°C (mantida por 27 min); depois um aumento de 4°C min⁻¹ até 215°C (mantida por 35 min). A temperatura do injetor e do detector foi de 250°C, o gás de arraste foi H₂ e a pressão na coluna foi de 175 kPa.

Fonte: o autor.

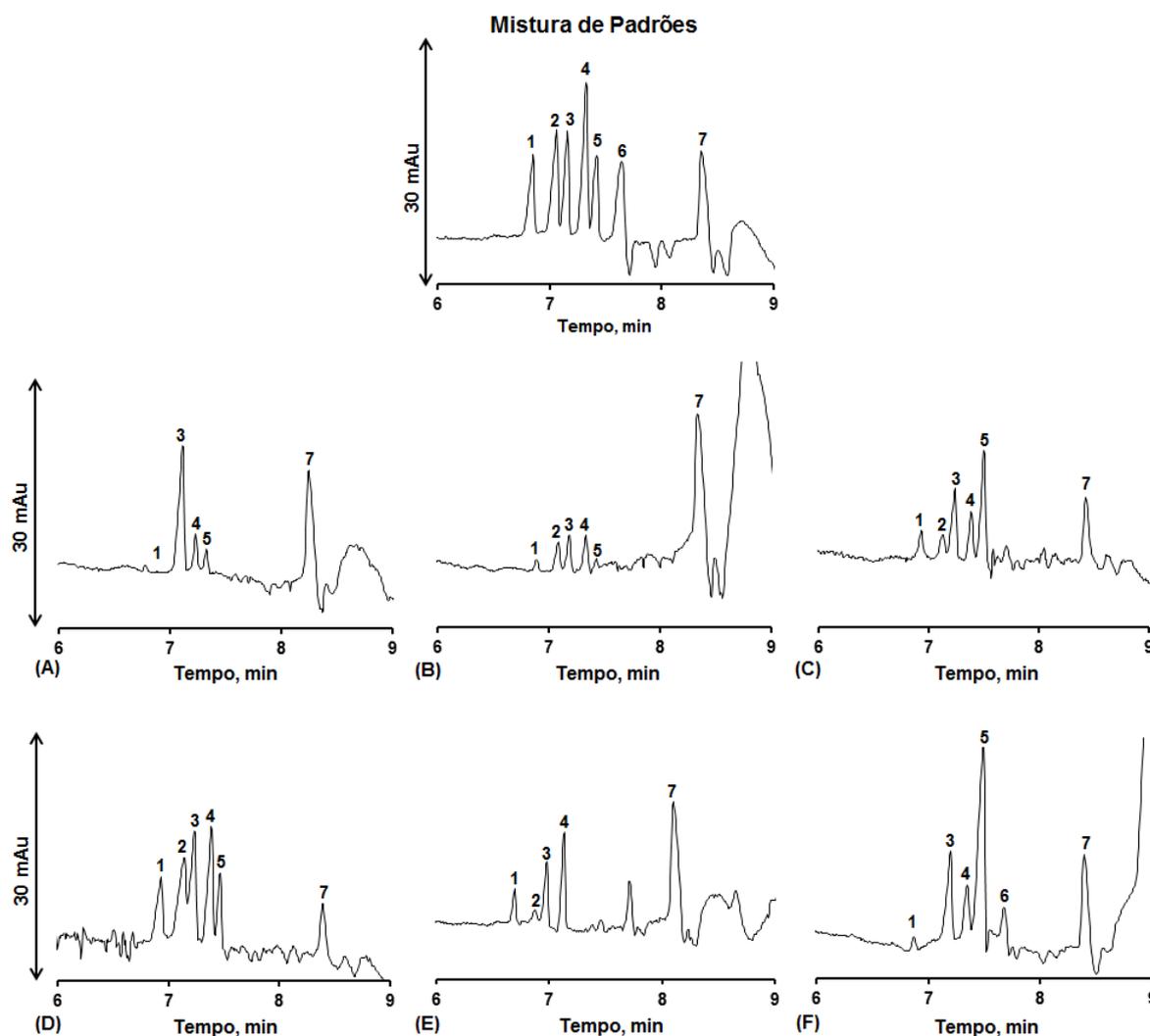


Figura 18: Eletroferogramas da mistura de padrões de AG (1) C18:0, (2) C18:1 *9t*, (3) C18:1 *9c*, (4) C16:0, (5) C18:2 *9c*, *12c*, (6) C18:3 *9c*, *12c*, *15c*, (7) C13:0 (PI), todos com concentração de 0,50 mmol L⁻¹. Amostras: A- Azeite de Oliva, B- Gordura Vegetal Hidrogenada, C- Margarina, D- Biscoito Recheado, E- Manteiga, F- Óleo de Soja.

Eletrólito: 15,0 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH 6,86); 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS, 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v de 1-octanol. **Condições de análise:** injeção 5 s x 12,5 mbar, +19 kV, 25°C, detecção indireta em 400 (±2) nm na amostra e 224 (±2) nm na referência (pico invertido), capilar de TSH com 40 cm de comprimento efetivo, 75 µm d.i e 375 µm d.e, e 48,5 cm de comprimento total.

Fonte: o autor.

A Tabela 8 apresenta os resultados estatísticos obtidos para CE e GC (Teste de normalidade de Shapiro-Wilk e teste t-student pareado). Para teste de normalidade, não foram encontradas diferenças significativas para intervalos de 95% e 99% de confiança. Em relação ao teste *t-student* pareado, não foram verificadas diferenças significativas entre as duas metodologias em um intervalo de 95% de confiança (p-valor > 0,05).

Tabela 8: Tabela com os teores dos AG majoritários determinados por CE e GC e expressos em g de AG/100g de amostra das diferentes amostras alimentícias,.

Samples	C18:0		C18:1t		C18:1c		C16:0		C18:2cc		C18:3ccc	
	CE	GC	CE	GC	CE	GC	CE	GC	CE	GC	CE	GC
OS 1	3,07	3,44	---	---	25,67	25,90	11,15	11,07	46,76	49,03	4,55	5,30
OS 2	3,19	3,19	---	---	25,92	25,30	10,93	11,15	47,19	48,20	4,89	5,26
Média	3,13	3,32	---	---	25,80	25,60	11,04	11,11	47,98	48,62	4,72	5,28
Desvio Padrão	0,09	0,18	---	---	0,18	0,46	0,16	0,06	0,31	0,59	0,25	0,03
AO 1	3,62	3,47	---	---	73,66	73,10	10,11	10,22	7,03	6,97	0,65	0,66
AO 2	3,25	3,64	---	---	73,61	72,90	10,13	10,20	6,29	6,91	0,69	0,69
Média	3,44	3,56	---	---	73,64	73,00	10,12	10,21	6,80	6,94	---	---
Desvio Padrão	0,26	0,12	---	---	0,04	0,09	0,01	0,02	0,53	0,04	---	---
MT 1	7,66	8,23	2,82	2,86	16,63	16,34	18,57	19,00	0,96	1,06	nq	0,28
MT 2	8,50	8,56	2,80	2,82	17,63	16,10	18,36	18,59	0,98	0,97	nq	0,27
Média	8,08	8,40	2,81	2,84	17,13	16,22	18,46	18,79	0,99	1,02	---	---
Desvio Padrão	0,59	0,23	0,01	0,03	0,71	0,17	0,15	0,23	0,01	0,06	---	---
MG 1	3,33	3,44	2,03	2,21	5,66	5,58	2,28	2,43	5,44	5,27	0,69	0,61
MG 2	3,83	3,54	2,71	2,22	5,97	6,18	2,12	2,28	5,32	5,85	0,65	0,63
Média	3,58	3,49	2,37	2,22	5,82	5,88	2,20	2,36	5,49	5,56	0,67	0,62
Desvio Padrão	0,36	0,07	0,49	0,01	0,22	0,42	0,11	0,11	0,09	0,41	0,03	0,01
GVH 1	9,06	8,85	26,40	26,65	25,55	26,20	17,14	16,50	5,89	5,69	nd	0,07
GVH 2	8,61	9,18	26,70	25,47	26,64	26,80	16,64	17,30	5,57	6,17	nd	0,07
Média	8,84	9,02	26,55	26,06	26,09	26,53	16,89	16,88	5,85	5,93	---	---
Desvio Padrão	0,32	0,23	0,24	0,83	0,77	0,45	0,35	0,60	0,23	0,34	---	---
BR 1	2,99	3,02	5,51	5,56	5,82	5,36	4,39	4,41	2,42	2,03	nd	0,12
BR 2	3,28	3,46	5,27	5,38	5,71	5,40	4,06	4,09	2,41	2,08	nd	0,13
Média	3,14	3,24	5,39	5,47	5,77	5,38	4,23	4,25	2,11	2,02	---	---
Desvio Padrão	0,20	0,31	0,17	0,13	0,08	0,03	0,23	0,23	0,50	0,01	---	---
Teste de Shapiro-Wilk^a	0,547		0,011		0,679		0,163		0,022		0,047	
Teste t-student^a	0,090		0,484		0,128		0,288		0,317		0,529	
Correlação de Pearson	0,995		0,999		0,999		0,998		0,999		0,999	

---: ausente na amostra

nd: abaixo do limite de detecção

^a p-valores

Os resultados apresentados sinalizam positivamente para o uso desta metodologia por CZE para análise de AG majoritários nas amostras azeite de oliva, óleo de soja, gordura vegetal hidrogenada, manteiga, margarina e recheio de biscoito recheado. O método utilizado apresentou resultados compatíveis com a metodologia oficial, curto tempo de análise (9 minutos), ausência de etapas de extração da fração lipídica e derivatização, além do uso de pequenos volumes de solventes e utilização de colunas capilares não específicas.

Destaca-se que os dados apresentados neste capítulo 7, juntamente com a otimização da metodologia apresentada no capítulo 5, foram publicados no ano de 2013 na revista *Food Research International* (vol.52, p.33-41), com o título de **“An alternative method for rapid quantitative analysis of majority cis–trans fatty acids by CZE”**.

8 ENSAIO BIOLÓGICO

8.1 Breve histórico

Inicialmente, o que se entende por “experimentação animal”? Entende-se por experimentação um “procedimento levado a efeito, visando a descobrir princípio ou efeito desconhecido, pesquisar uma hipótese ou ilustrar um princípio ou fato conhecido.” (Blakiston, s/d: 414). No caso da “experimentação animal”, refere-se a procedimentos realizados em animais.

O conhecimento acerca dos processos biológicos e suas interações para a manutenção da vida estão crescendo em proporção sem precedentes. Com enorme gama de ferramentas, tem sido possível manipular a vida e criar animais transgênicos, *knockouts* e clones, anunciando avanços muito maiores aos já vistos anteriormente para o desenvolvimento científico. Como resultado, existe uma preocupação entre cientistas e a população em geral sobre a segurança do uso dessas tecnologias e os efeitos que elas teriam sobre a dignidade de homens e animais, assim como o seu impacto sobre o meio ambiente (Purchase, 2002).

Os experimentos devem ser planejados para evitar estresse, dor ou sofrimento desnecessário aos animais. A escolha dos delineamentos experimentais deve selecionar aqueles que utilizam menor número de animais, que envolvem menor grau de sensibilidade neurofisiológica, ou seja, causam menor dor, sofrimento, estresse e prejuízos duradouros (Matthiessen, Lucaroni e Sacher, 2003).

De acordo com o Comitê de Ética em Pesquisa, um projeto eticamente adequado deve:

- a) ser gerador de conhecimento, esta é a sua justificativa básica, sua finalidade;
- b) ser exequível, para avaliar este quesito tem que se atentar para a metodologia empregada. As avaliações metodológica e ética são indissociáveis, já que projetos com erros metodológicos darão resultados pouco confiáveis, sendo condenáveis do ponto de vista ético;
- e, c) ter relevância, sendo a relevância o valor agregado, ou seja, os dados obtidos devem ser passíveis de transposição aos seres humanos (Rezende, Peluzio e Sabarense, 2008).

Baseado nos pressupostos e de acordo com o Comitê de ética em pesquisa, o presente trabalho envolveu uso justificado de experimentação animal.

8.2 Protocolo de aprovação do projeto

O presente trabalho foi realizado seguindo todos os procedimentos éticos estabelecidos pelos órgãos competentes, e teve seu protocolo de ética nº 032/2011 APROVADO pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Uma cópia deste protocolo segue em anexo nesta Tese (Anexo 1).

8.3 Animais

Os animais usados neste experimento foram fornecidos pelo Centro de Biologia e Reprodução (CBR) da UFJF e foram entregues para o início do ensaio logo após o desmame (22 dias de vida) no dia 20 de julho de 2011. Os animais, com peso médio inicial em torno de 30 g, já vieram distribuídos aleatoriamente em caixas plásticas de polipropileno com dimensões de 360 mm x 510 mm x 210 mm, como pode ser observado na Figura 19.

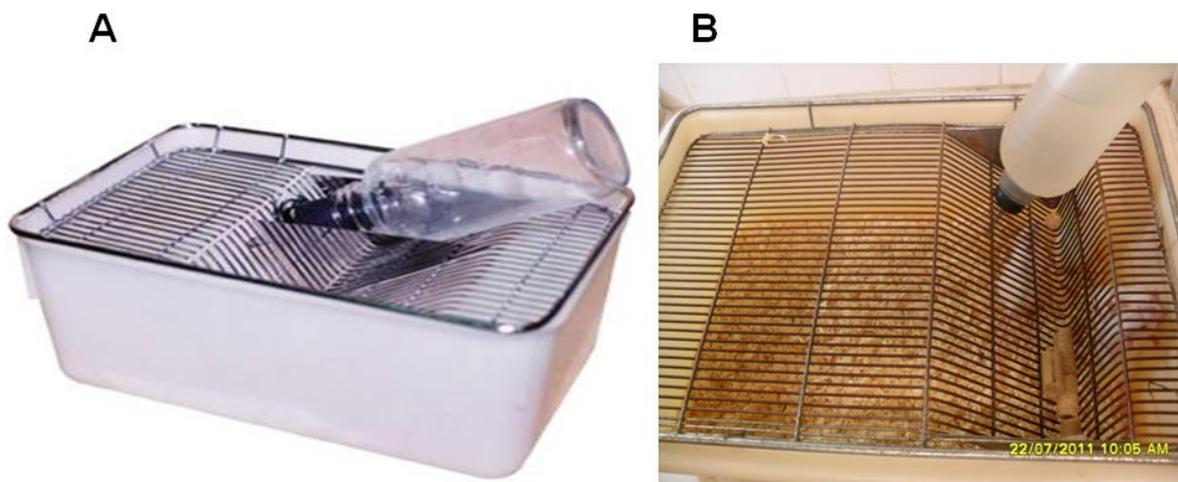


Figura 19: A - Modelo de caixa utilizada para manutenção dos animais e B- Animais alocados na gaiola utilizada no início do experimento (dia da foto 22 de julho de 2011).
Fonte: o autor.

8.3.1 Manutenção dos animais

Os animais, da linhagem *Wistar*, foram mantidos no Biotério do Instituto de Biologia na Universidade de Juiz de Fora, sendo 3 animais por gaiola, com fornecimento de água filtrada e ração diferenciada para cada grupo *ad libitum*. A temperatura foi mantida entre 22 e 26 °C. A luminosidade foi programada para ciclos de claro e escuro com duração de 12 horas cada.

8.3.2 Dietas

Os animais foram alimentados com dieta formulada com ingredientes de alto grau de pureza, seguindo rigorosamente as normas descritas pelo *American Institute of Nutrition* (Reeves, Nielsen e Fahey Jr., 1993), conforme descrito na Tabela 9. A dieta AIN-93G é recomendado para as fases de gestação, lactação e crescimento dos animais.

Tabela 9: Composição da dieta usada para os roedores em fase de crescimento (AIN-93G).

Composição	Percentual (% m/m)
Amido de milho	39,75
Caseína	20,00
Amido de milho dextrinizado	13,20
Pré-mix mineral AIN-G	3,50
Pré-mix vitamínico AIN 93-G	1,00
Cistina	0,30
Bitartarato de colina	0,25
Sacarose	10,00
Fibra	5,00
Óleo de soja	7,00

Fonte: Reeves *et al.* 1993

Bourre *et al.* (1989) sugeriu que razão (proporção) ótima entre C18:2 9c, 12c (ω -6) e C18:3 9c, 12c, 15c (ω -3) para a alimentação de roedores deve ser entre 1 e 6. O óleo de soja é a fonte lipídica que mais se aproxima desses critérios. O óleo de soja contém cerca de 14% de AG saturados, 23% de AG monoinsaturados, em torno de 51% de ácido linoleico (ω -6) e aproximadamente 7% de ácido linolênico (ω -3). Logo, a razão entre C18:2 9c, 12c (ω -6) e C18:3 9c, 12c, 15c (ω -3) é de aproximadamente 7, e razão entre AG poli-insaturados e AG saturados é de aproximadamente 4. Desse modo, o óleo de soja é a fonte de lipídios recomendada nas dietas AIN-93 (Bourre *et al.*, 1989).

Foram formados 03 grupos com 06 ratos da linhagem *Wistar* em cada, sendo que os animais do **GRUPO A** foram alimentados com a dieta AIN-93G, cuja fonte lipídica foi óleo de soja novo do mesmo lote utilizado no processo de fritura, denominado ÓLEO DE SOJA A. A dieta dos animais do **GRUPO B** também foi a dieta AIN-93G, porém a fonte lipídica da sua composição foi o óleo de soja usado no processo de fritura por tempo intermediário (1 semana de uso e 04 ciclos de fritura de alimentos diversos em dias não sequenciais), denominado ÓLEO DE SOJA B e para os animais do **GRUPO C** a dieta AIN-93G com óleo de soja usado no processo de fritura por tempo máximo antes do descarte (2ª semana de uso e mais 06 ciclos de fritura de alimentos diversos em dias não sequenciais, além dos 04 ciclos anteriormente citados – em média 15 dias de tempo total de uso), denominado ÓLEO DE SOJA C, como é apresentado pelo fluxograma da Figura 20. Cabe ressaltar, que o percentual de nenhum componente da dieta foi alterado entre os grupos, apenas a qualidade do óleo de soja utilizado.

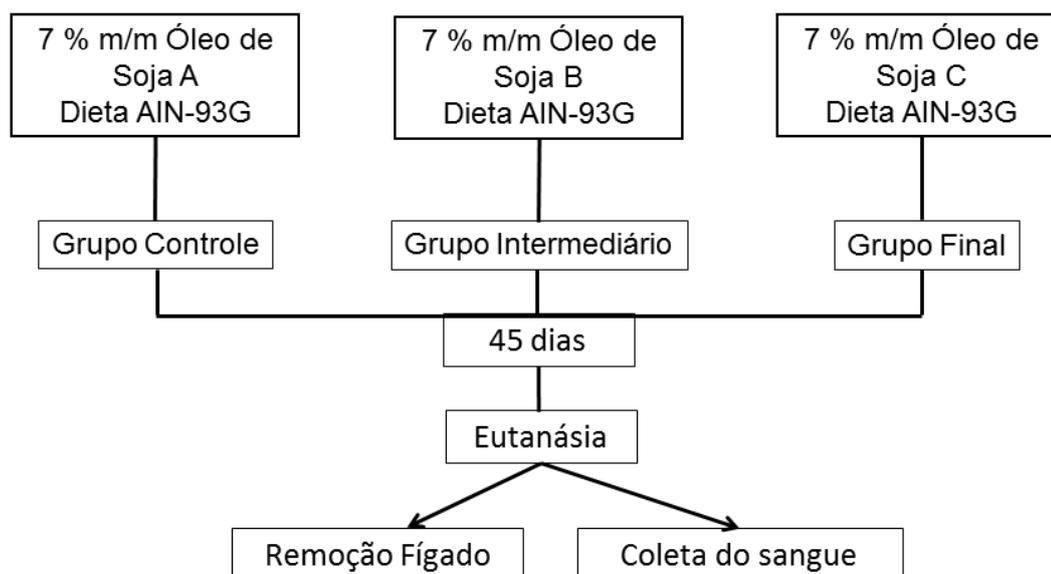


Figura 20: Fluxograma da etapa envolvendo dieta e eutanásia.

Fonte: o autor.

As amostras de óleo (inclusive a amostra de óleo novo) foram fornecidas pelo restaurante de uma empresa de metalurgia em Juiz de Fora – MG, e a sequência de alimentos utilizada no processo de fritura por imersão está listada na Tabela 10. Destaca-se que o restaurante em questão serve, em média, 1500 refeições por dia ao longo de três turnos.

Tabela 10: Ordem sequencial dos alimentos usados no processo de fritura por imersão da empresa supracitada, bem como a separação dos grupos intermediário e final.

Grupos	Alimentos
Grupo intermediário	Peixe
	Batata
	<i>Steak</i> de frango
	Filé de frango à milanesa
Grupo Final	Bife bovino à milanesa
	Batata
	Linguiça
	Batata
	Batata
	<i>Steak</i> de frango

Fonte: o autor.

A ração de cada grupo foi preparada separadamente a partir da mistura cuidadosa de cada ingrediente citado na Tabela 9, devidamente peneirado, com posterior obtenção dos *pellets* que foram imediatamente congelados. A Figura 21 mostra a foto dos óleos usados no preparo da ração, bem como a ração pronta (*pellet*) para alimentação dos animais. Foi possível observar claramente, a diferença no aspecto dos óleos, levando em consideração cor, cheiro e viscosidade dos mesmos.

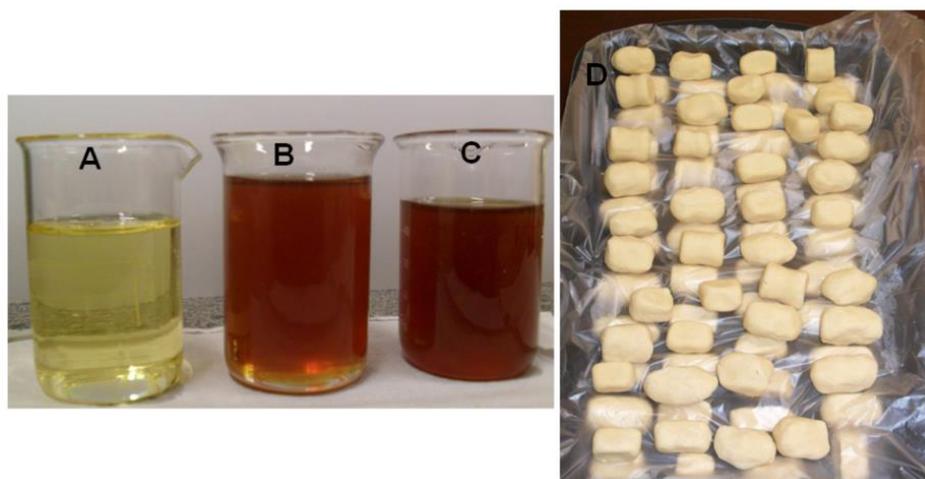


Figura 21; A. Óleo de soja novo; B. Óleo de soja usado por tempo de fritura intermediário (1 semana e 4 ciclos); C. Óleo de soja usado por tempo máximo antes do descarte (2 semanas e 10 ciclos) e D. Ração em *pellet* obtida pela adição do óleo de soja aos ingredientes restantes de acordo com AIN 93-G (para cada grupo separadamente).

Fonte: o autor.

8.3.3 Eutanásia

Após 45 dias a partir do início do experimento, todos os animais envolvidos foram eutanasiados por sobredose anestésica com *Ketamine* (100 mg/kg) e *Xylazine* (10 mg/kg) (Wolfensohn e Lloyd, 2003). A dose de anestésico e analgésico administrada deprime intensamente o sistema nervoso central, permitindo que a eutanásia seja feita sem sofrimento para o animal. Após a observação da significativa diminuição da frequência cardíaca, o coração foi exposto para etapa de exsanguinação e o sangue foi recolhido para realização posterior de testes bioquímicos. Os órgãos e tecidos (tecido adiposo visceral e retroperitoneal, fígado, rim baço e fêmur) foram obtidos por remoção excisional completa, guardados em recipientes adequados e mantidos a temperatura de -80°C até o momento da análise. As amostras de fígado destinadas à histologia foram fixadas em formol tamponado a 10% imediatamente após obtenção e, posteriormente, submetidas ao processamento histológico de rotina. O restante do material não utilizado foi destinado ao lixo hospitalar recolhido na própria UFJF.

8.3.4 Obtenção das amostras hepáticas e análise histopatológica

O fígado coletado para análise histológica foi mantido em solução de formol 10% até serem blocados em parafina para posterior microtomia com cortes de 4 a 5µm de espessura. Após a confecção da lâmina, cortes correspondentes a cada amostra foram separados para realização de coloração de rotina em hematoxilina e eosina (HE) e para realização de reação histoquímica.

Os cortes foram analisados em microscópio Zeiss (Hallbergmoos, Alemanha) em aumentos de 250X, 400X e 1000X, em toda sua extensão. A análise foi realizada por dois diferentes observadores com experiência e formação em histopatologia, em toda sua extensão. A partir desta avaliação, foram selecionadas áreas representativas para captura digital por sistema computadorizado Axion Vision (Zeiss, Berlim, Alemanha), através de câmera digital acoplada a microscópio óptico.

As amostras foram avaliadas nas zonas 1, 2 e 3, segundo os critérios: vasodilatação (capilares sinusóides e vênulas), estase (congestão de capilares sinusóides e vênulas), acúmulos intracelulares (glicogênio / lipídeo), presença de infiltrado inflamatório, necrose de hepatócitos e fibrose focal (Thung e Gerber, 1992).

8.4 Preparo de amostra

8.4.1 Preparo das amostras para análise por CZE

As amostras de fígado analisadas por CE foram preparadas de acordo com o fluxograma descrito pela Figura 22, onde cerca de 200 mg de cada amostra de fígado foi pesada e submetidas à etapa de saponificação com NaOH/MeOH (0,5 mol L⁻¹) sob refluxo por 25 minutos. Antes da análise as amostras foram diluídas (150 µL para 1,0 mL) em metanol (MeOH). Cabe ressaltar que nenhuma etapa de extração da fração lipídica e/ou derivatização foi necessária.

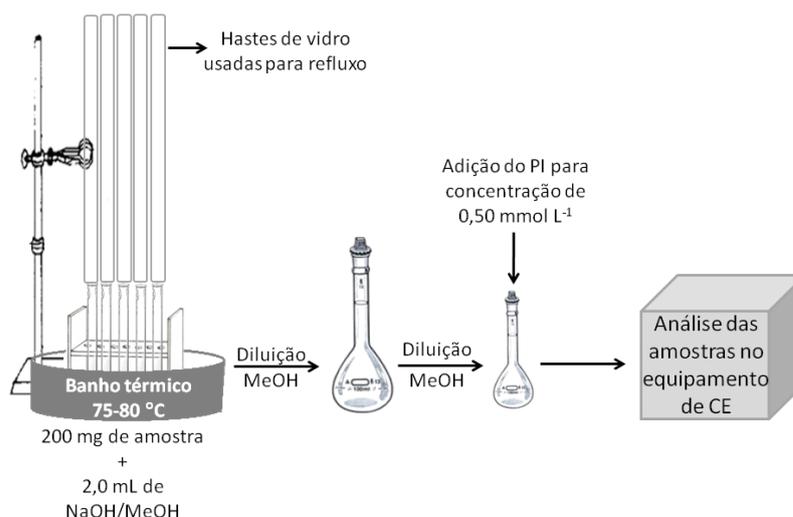


Figura 22: Fluxograma esquemático para preparo das amostras para análise por CE.
Fonte: o autor.

Após a etapa de saponificação, as amostras foram diluídas adequadamente e o PI (C13:0) com concentração final de 0,50 mmol L⁻¹ foi adicionado antes da injeção no equipamento de eletroforese. É importante destacar que após a etapa de saponificação, pode haver eventuais resíduos sólidos remanescentes nos tubos, e essa massa deve ser descontada da massa inicial de amostra para os cálculos do teor final.

8.4.2 Preparo das amostras para análise por GC

O procedimento para extração da fração lipídica do fígado de rato consistiu na pesagem de 1,0 g de amostra em tubo tipo *Falcon* de 50,0 mL com adição posterior de 8,0 mL de isopropanol PA, agitação em vórtex com velocidade máxima por 4,0 minutos. Posteriormente, 12,0 mL de hexano PA foram adicionados e a solução foi agitada em vórtex com velocidade máxima novamente por mais 4 minutos. Após repouso de 30 minutos, a solução foi filtrada para outro tubo tipo *Falcon* de 50,0 mL utilizando de papel de filtro que foi lavado por 3 vezes com solução de 3:2 de hexano/isopropanol para remover os possíveis resíduos. Em seguida, 6,0 mL de solução saturada de sulfato de sódio foram adicionados para agitação por mais 2,0 minutos no vórtex. A solução foi mantida em repouso até a separação das fases, onde a fase orgânica (superior) foi coletada (Hara e Radin, 1978). A Figura 23 apresenta o fluxograma para a etapa de extração da fração lipídica, citada acima.

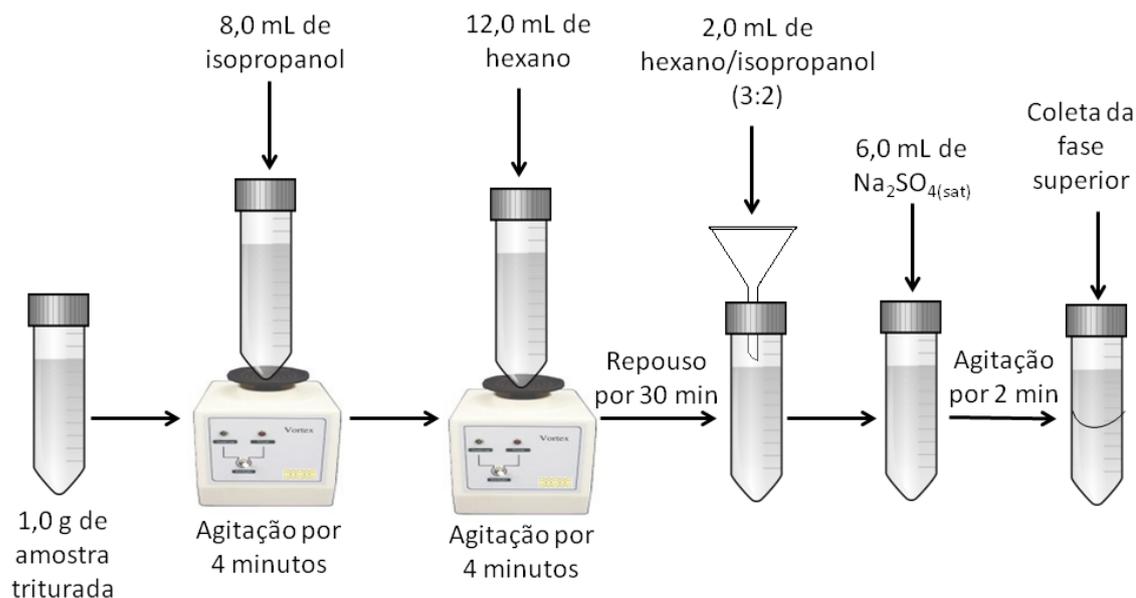


Figura 23: Fluxograma da etapa de extração da fração lipídica das amostras de fígado de ratos *Wistar*.
Fonte: o autor.

As frações lipídicas, tanto para as amostras de óleo quanto para as amostras de fígado, obtidas foram esterificadas com solução de $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (Metcalf, Schmitz e Pelka, 1966; Hartman e Lago, 1973) e os ésteres metílicos foram analisados por cromatografia à gás conforme método oficial da AOCS (AOCS, 1996).

8.5 Instrumentação

8.5.1 Eletroforese Capilar

As análises por CZE das amostras de fígado foram realizadas em um equipamento Agilent 7100, (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA, equipado com arranjo de diodos DAD), aquisição dos dados foi realizada pelo software HP ChemStation, rev B.04.03. Em todos os experimentos foram usados capilares de sílica fundida com revestimento externo de polímero de flúor (TSH - Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA), contendo 48,5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo), 75 μm de d.i e 375 μm de d.e, injeção 5 s x 12,5 mbar, +19 kV, 25°C, detecção indireta em 224 (± 2) nm na referência.

8.5.2 Cromatografia à gás

Para determinação do teor AG *cis/trans* nas amostras de fígado, utilizou-se a metodologia oficial recomendada pela *American Oil Chemist's Society* AOCS Ce 1f-96: “*Determination of cis- and trans- Fatty Acids in Hydrogenated and Refined Oils and Fats by Capillary GLC, Reapproved 1997 • Revised 2002*” com algumas adaptações no programa de temperatura. As análises foram executadas em um cromatógrafo à gás da marca Agilent modelo GC 710017A, com detector de ionização de chama (FID) disponível na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

As condições de trabalho foram: injeção com *split/spitless* operado com uma razão de *split* de 1:100 e coluna capilar HP-88 (88% Cianopropylaryl 60 m x 0,250 mm d.i x 0,20 µm de filme), hélio como gás de arraste na vazão de 1 mL/min, temperatura do injetor de 260 °C, temperatura do forno em 140 °C por 5 min, programa de temperatura em 4°C/min até 240 °C, onde foi mantido por 10 minutos. A identificação dos picos cromatográficos dos ésteres metílicos das amostras foi obtida por comparação do tempo de retenção dos padrões de ésteres metílicos (AOCS, 1996).

8.6 Determinação do perfil lipídico de amostras de óleo de soja e tecido biológico por CZE

A determinação do teor dos AG majoritários presentes nas amostras de óleo de soja (óleo novo e óleo usado na etapa de fritura por imersão) e fígado dos ratos *Wistar*, foi realizada por CZE através da integração dos picos dos AG correspondentes e usando o coeficiente angular dos modelos como fator de resposta, previamente detalhados no capítulo 5.

A análise do perfil lipídico para estas amostras por CZE foi realizada sem etapas de extração da fração lipídica e derivatização. Para isso, fez-se necessária apenas uma etapa de saponificação com solução metanólica de NaOH a 0,50 mol L⁻¹, o que oferece a esta técnica ganho de tempo de análise considerável frente à metodologia oficial por GC. Por exemplo, por CZE tem-se uma frequência analítica de 6 amostras a cada duas horas, enquanto por GC esta frequência é 6 amostras a cada 10 horas (incluindo todas as etapas de preparo da amostra e tempo de análise).

A qualidade do óleo utilizado para o processo de fritura de vários alimentos foi avaliada através da variação do conteúdo de AG. Observou-se que elevados valores de

temperatura e maior tempo de utilização do óleo foram parâmetros relevantes na avaliação da diminuição do teor de AG poli-insaturados (C18: 2 *9c*, *12c* e C18: 3 *9c*, *12c*, *15c*) e, consequentemente, no aumento do teor de AG saturados (C18: 0 e C16: 0). A Figura 23 apresenta os eletroferogramas das amostras de óleo dos grupos controle, intermediário e final.

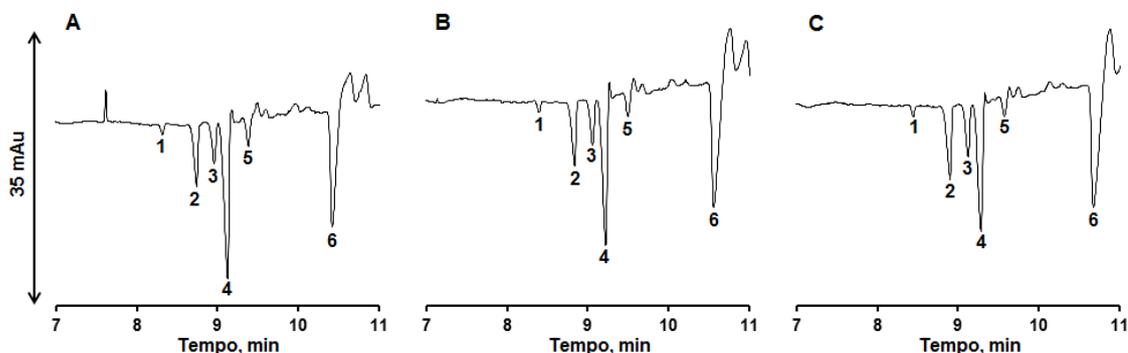


Figura 24: Eletroferogramas das amostras de óleo de soja usado na dieta dos animais. A- Óleo de soja A (óleo novo), B- Óleo de soja B (usado por tempo intermediário) e C- Óleo de soja C (usado por tempo máximo antes do descarte). 1- C18:0, 2- C18:1 *9c*, 3- C16:0, 4- C18:2 *9c*, *12c*, 5- C18:3 *9c*, *12c*, *15c* e 6- C13:0 (PI).

Eletrólito: 15,0 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH 6,86); 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS, 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v de 1-octanol. **Condições de análise:** injeção 5 s x 12,5 mbar, +19 kV, 25°C, detecção indireta em 224 (±2) nm, capilar de TSH com 40 cm de comprimento efetivo, 75 µm d.i e 375 µm d.e, e 48,5 cm de comprimento total.

Fonte: o autor.

Os resultados estatísticos obtidos para análise das amostras de óleo de soja por CZE e GC podem ser observados na Tabela 11. Para o teste de normalidade (Shapiro-Wilk), não foi encontrada nenhuma diferença significativa dentro do intervalo de 99% de confiança, uma vez que os valores de p-valor encontrados foram superiores a 0,01. De acordo com o teste t pareado, não foi observada nenhuma evidência de diferença significativa entre as duas metodologias no intervalo de 95% de confiança (p-valor > 0,05).

Tabela 11: Teor de AG nas amostras de óleo de soja por CZE e GC.

Óleo de Soja	C18:0*		C18:1 c*		C16:0*		C18:2*		C18:3*	
	CE	GC	CE	GC	CE	GC	CE	GC	CE	GC
Grupo Controle	3,66	3,55	20,15	22,96	10,82	10,95	54,14	53,31	5,93	5,98
Grupo Intermediário	3,50	3,75	23,88	24,75	12,74	12,31	47,53	50,27	5,43	5,10
Grupo Final	3,64	3,98	27,25	29,08	15,12	13,99	40,07	43,90	4,85	4,24
Teste t	0,093		0,217		0,266		0,104		0,184	

*Média (g de AG/100g de amostra – duplicata autêntica)

p-valor > 0.05 (Intervalo de 95% de confiança)

Teste de Normalidade p-valor: 0,048

A variação obtida nos teores de AG entre os grupos estudados pode ser mais claramente interpretada por meio de um gráfico de colunas que é apresentado na Figura 24. Onde é possível observar a diminuição gradativa no teor de AG poli-insaturados (C18:2 9c, 12c C18:3 9c, 12c, 15c) do grupo final em relação ao controle de aproximadamente 19%. Nota-se também que houve um aumento no teor de AG saturados (C18:0 e C16:0) do grupo final em relação ao grupo controle de aproximadamente 24%.

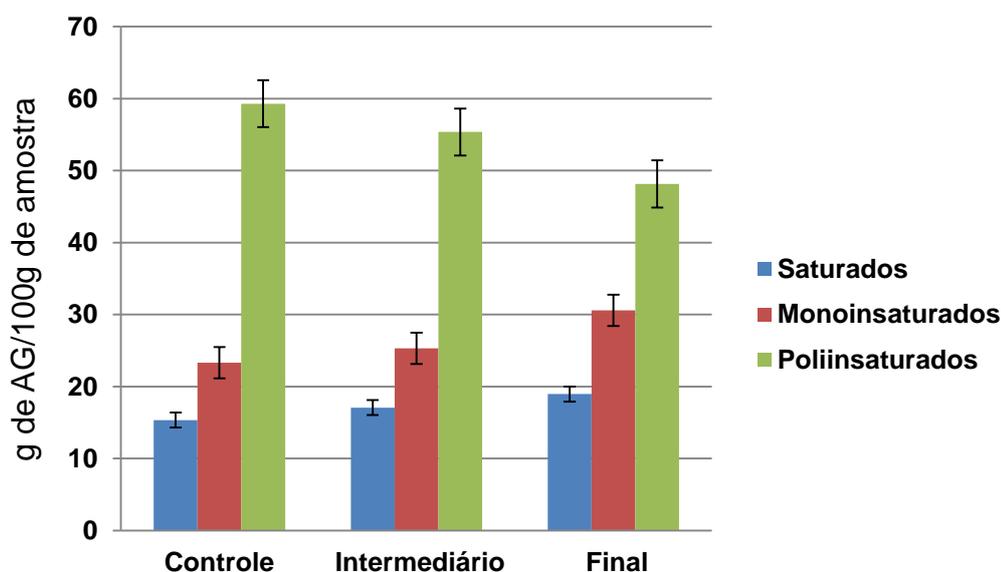


Figura 25: Gráfico do teor de AG encontrado nas amostras de óleo de soja dos grupos controle (óleo novo), grupo intermediário (óleo usado no processo de fritura por tempo intermediário) e grupo final (óleo usado por tempo máximo antes do descarte), com respectivas barras de erro padrão.

Fonte: o autor.

Durante o processo descontínuo de fritura por imersão, o óleo é exposto repetidamente a altas temperaturas (em torno de 160-200°C) na presença de ar e de vapor de água liberados a partir dos alimentos fritos. Tal processo provoca diminuição do teor de ácidos graxos poli-insaturados com consequente aumento do teor de ácidos graxos saturados, além de outras reações tais como: oxidação hidrólise entre outras (Choe e Min, 2007).

O óleo final apresentou os AG C18:2 9c, 12c e C18:3 9c, 12c, 15c, apesar da duração do processo de fritura em 15 dias intermitentes. Sabe-se que há processos oxidativos e hidrolíticos relacionados ao aquecimento. Contudo, o perfil lipídico esperado, com redução acentuada dos poli-insaturados não ocorreu provavelmente devido à adição de óleo de soja novo (novo) para completar o volume da fritadeira. Além disso, o perfil lipídico do óleo também é afetado também pela troca de AG entre os alimentos e o meio de fritura. Considerando que alimentos de origem animal (carne) foram utilizados no processo de fritura (Tabela 10), a alteração do teor de C18:2 9c, 12c pode não ter sido tão ampla.

Não foi detectado AG *trans* nas amostras de óleo de fritura, provavelmente porque o processo de fritura por imersão não tenha tido um efeito tão drástico sobre o óleo, considerando que foram utilizados alimentos diversos (origem animal e vegetal) em ciclos intermitentes. Verifica-se na literatura que a formação de AG *trans* em óleos de fritura ocorre após 10 horas de uso para um único tipo de alimento muitas vezes de origem vegetal (batata frita) (Sanibal e Filho, 2004; Bansal *et al.*, 2009).

A Figura 25 mostra os eletroferogramas das amostras de fígado dos ratos *Wistar* alimentados com a dieta AIN93-G, cuja fonte lipídica foi óleo de soja, conforme descrito anteriormente.

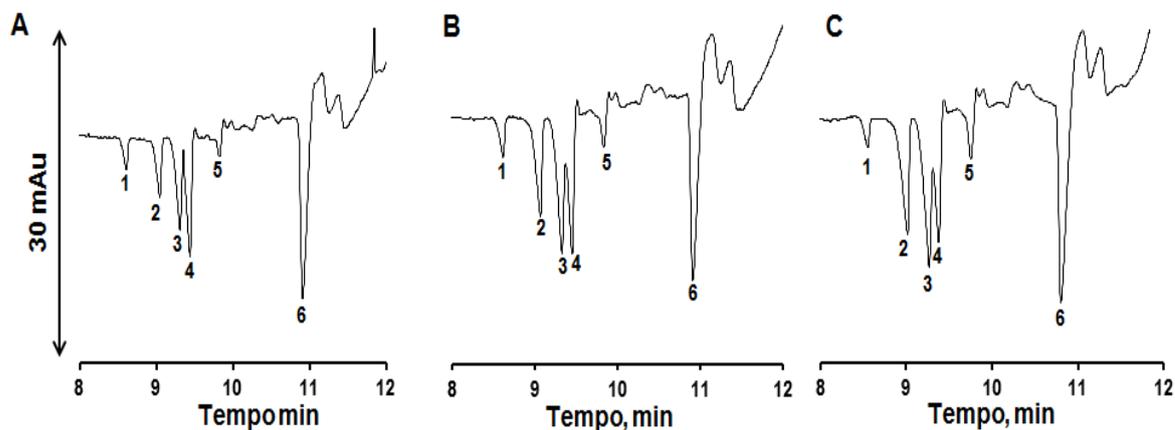


Figura 26: Eletroferogramas das amostras de fígado dos ratos *Wistar*. A- Grupo controle, B- Grupo Intermediário e C- Grupo Final. 1- C18:0, 2- C18:1 *9c*, 3- C16:0, 4- C18:2 *9c, 12c*, 5- C16:1 *9c* e 6- C13:0 (PI).

Eletrólito: 15,0 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH ≈ 6,86); 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS, 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35, 45% v/v de ACN e 2,1% v/v de 1-octanol. **Condições de análise:** injeção 5 s x 12,5 mbar, +19 kV, 25°C, detecção indireta em 224 (±2) nm, capilar de TSH com 40 cm de comprimento efetivo, 75 µm d.i e 375 µm d.e. e 48,5 cm de comprimento total.

Para demonstrar a confiabilidade da metodologia otimizada por CZE (detalhada no capítulo 5) foi realizada a comparação com o método oficial por GC AOCS Ce 1f-96 (AOCS, 1996). Os AG presentes nas amostras de fígado dos animais avaliados, foram determinados por GC após etapa de extração da fração lipídica (Hara e Radin, 1978).

Os cromatogramas obtidos para as amostras de fígado dos animais dos grupos controle, intermediário e final são apresentados na Figura 27. A Tabela 12 mostra os resultados estatísticos obtidos na análise das amostras de fígado de rato *Wistar* por CZE e GC. Para o teste de normalidade (Shapiro-Wilk) não foi encontrada nenhuma diferença significativa dentro dos intervalos de 95% e 99% de confiança, uma vez que os valores de *p*-valor encontrados foram superiores a 0,05 e 0,01, respectivamente. Para a comparação entre os métodos, utilizando teste t-pareado, nenhuma evidência de diferença significativa entre os dois métodos foi observada dentro dos intervalos de 95% e 99% de confiança (p-valores encontrados foram maiores que 0,05 e 0,01, respectivamente).

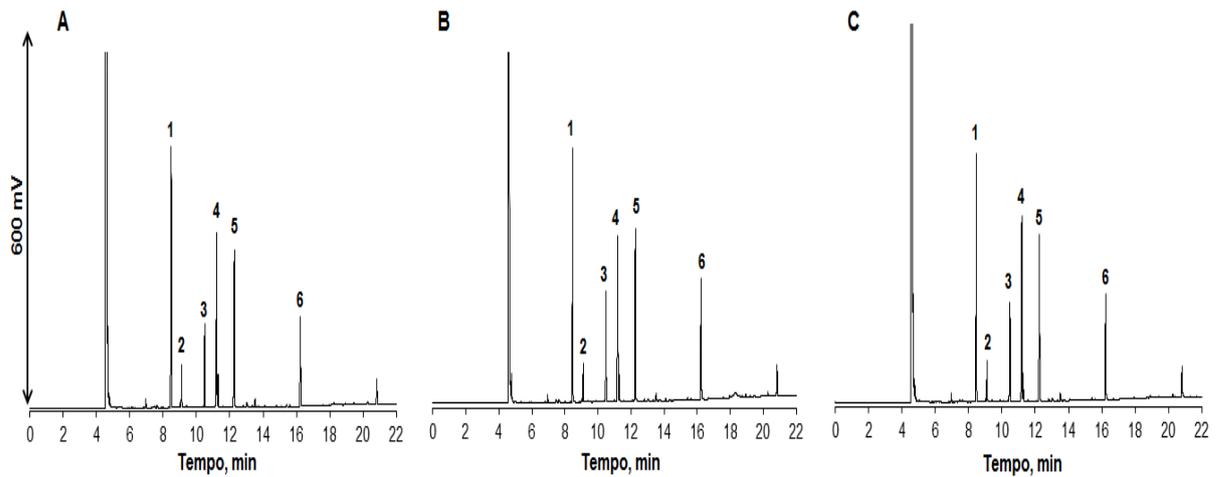


Figura 27: Cromatogramas obtidos para as amostras de fígado dos animais dos grupos controle, intermediário e final. A- Grupo Controle, B- Grupo Intermediário e C- Grupo Final. 1- C16:0, 2- C16:1 *9c*, 3- C18:0, 4- C18:1 *9c*, 5- C18:2 *9c*, 12*c* e 6- C22:1 *9c*.

Condições operacionais: injeção com *split/spitless* operado com uma razão de *split* de 1:100 e coluna capilar HP-88 (88% Cianopropylaryl 60 m x 0,250 mm d.i x 0.20 μ m de filme), hélio como gás de arraste na vazão de 1mL/min, temperatura do injetor de 260°C, temperatura do forno em 140°C por 5 min, programa de temperatura em 4°C/min até 240°C, onde foi mantido por 10 minutos.

Fonte: o autor.

Tabela 12: Teor de AG majoritários encontrados nas amostras de fígado dos ratos *Wistar* pertencentes aos grupos controle, intermediário e final expresso em grama de AG por 100g de amostra.

	Animais	C18:0 (g 100g ⁻¹)		C18:1 9c (g 100g ⁻¹)		C16:0 (g 100g ⁻¹)		C18:2 cc (g 100g ⁻¹)		C16:1 (g 100g ⁻¹)	
		CE	GC	CE	GC	CE	GC	CE	GC	CE	GC
Grupo Controle	1	0,77	0,76	1,96	1,95	2,51	2,40	1,56	1,31	0,35	0,32
	2	0,60	0,62	1,68	1,76	1,91	1,85	1,78	1,25	0,27	0,25
	3	0,61	0,64	1,59	1,70	2,19	2,12	1,36	1,11	0,37	0,39
	4	0,54	0,55	1,39	1,52	1,67	1,66	1,25	1,17	0,26	0,25
	5	0,81	0,82	0,85	0,83	1,41	1,24	1,48	1,11	0,16	0,12
	6	0,62	0,65	1,10	1,31	1,59	1,57	1,66	1,37	0,21	0,24
Média		0,66	0,67	1,43	1,51	1,88	1,81	1,52	1,22	0,27	0,26
Desvio padrão		0,11	0,10	0,40	0,40	0,41	0,41	0,20	0,11	0,08	0,09
Teste t (p-valor)		0,02^a		0,05		0,08		0,02^a		0,72	
Grupo Intermediário	7	0,60	0,61	1,61	1,95	2,02	2,07	1,20	1,20	0,36	0,38
	8	0,65	0,69	1,88	1,95	2,20	2,15	1,24	1,11	0,41	0,40
	9	0,55	0,51	1,28	1,40	1,58	1,51	1,39	1,20	0,22	0,24
	10	0,55	0,52	0,91	0,95	1,17	1,09	1,32	0,87	0,17	0,16
	11	0,54	0,58	0,78	0,75	1,14	0,99	1,03	0,81	0,13	0,10
	12	0,64	0,69	1,17	1,21	1,56	1,51	1,35	1,15	0,24	0,20
Média		0,59	0,60	1,27	1,37	1,61	1,55	1,25	1,06	0,26	0,25
Desvio padrão		0,05	0,08	0,42	0,50	0,43	0,48	0,13	0,17	0,11	0,12
Teste t (p-valor)		0,52		0,12		0,02^a		0,01^a		0,15	
Grupo Final	13	0,66	0,75	2,10	2,04	2,39	2,20	1,21	0,95	0,42	0,40
	14	0,60	0,69	1,11	1,47	1,30	1,56	1,04	0,95	0,25	0,29
	15	0,61	0,65	1,93	1,98	2,47	2,20	1,22	1,02	0,42	0,41
	16	0,65	0,62	1,23	1,46	1,43	1,44	1,23	1,13	0,21	0,24
	17	0,52	0,55	1,46	1,47	1,65	1,54	0,98	0,84	0,31	0,28
	18	0,47	0,55	1,23	1,25	1,37	1,39	1,16	0,86	0,23	0,20
Média		0,58	0,64	1,51	1,61	1,77	1,72	1,14	0,96	0,31	0,30
Desvio padrão		0,08	0,08	0,41	0,32	0,53	0,38	0,10	0,11	0,10	0,09
Teste t (p-valor)		0,11		0,13		0,85		0,01^a		0,95	
Normalidade (p-valor)		0,43		0,05		0,22		0,64		0,04^a	
^b LOD (mmol L ⁻¹)		0,0029		0,0033		0,0032		0,0017		0,0021	
^b LOQ (mmol L ⁻¹)		0,0089		0,0100		0,0096		0,0052		0,0062	
^b Faixa Linear (mmol L ⁻¹)		0,15-1,10		0,15-1,10		0,15-1,10		0,15-1,10		0,05-1,05	

^a p-valor > 0.01 (Intervalo de 99% de confiança);

^b Valores calculados para o método de CZE;

LOD: limite de detecção e LOQ: limite de quantificação;

Normalidade: Teste de Shapiro-Wilk.

A variação obtida nos teores de AG entre os grupos estudados pode ser mais claramente interpretada por meio de um gráfico de colunas que é apresentado na Figura 28.

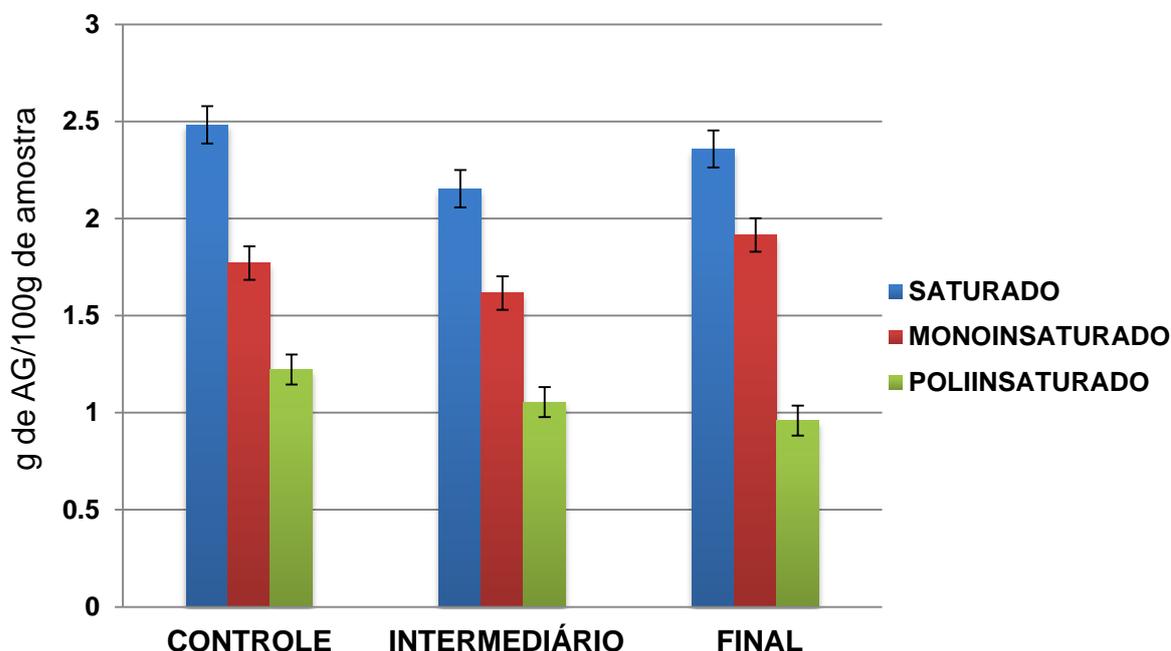


Figura 28: Gráfico do teor de AG encontrado nas amostras fígado de ratos *Wistar* dos grupos controle (óleo novo), grupo intermediário (óleo usado no processo de fritura por tempo intermediário) e grupo final (óleo usado por tempo máximo antes do descarte), com respectivas barras de erro padrão.
Fonte: o autor.

Nota-se uma diminuição no teor de AG poli-insaturados (aproximadamente 21%) no fígado dos animais do grupo final em relação aos animais do grupo controle. Esta diminuição se deve pela relação dose dependente dos AGE, tendo diminuída a oferta na dieta (menor teor de C18:2 9c, 12c e C18:3 9c, 12c, 15c), a deposição no tecido também diminuiu, de forma relativa, por causa da dinâmica metabólica própria do tecido hepático.

O aumento do teor de AGS no fígado se deve, primeiramente, à lipogênese, especialmente no que diz respeito aos AG C16:0 e AG C18:0 e, posteriormente à deposição dos AGS oriundos da dieta, que também apresentaram aumento no grupo final em relação ao grupo controle.

Observa-se um aumento no teor de AGS no fígado dos animais alimentados com óleo utilizado por tempo máximo no processo de fritura (Óleo de soja do grupo final). Sabendo-se que a presença e o teor do AG essencial C18:2 9c, 12c no fígado desses animais é uma consequência direta da ingestão de dieta, já que este não é sintetizado no organismo, pode-se destacar que a diminuição do conteúdo deste AG no fígado foi mais evidente nos animais de grupo final em comparação ao grupo de controle. Esta redução no teor de ω -6 pode prejudicar

a produção de compostos de eicosanóides e, sabe-se que os eicosanóides têm várias atividades biológicas, tais como: modulação da resposta inflamatória e de resposta imune, e desempenham um papel importante na agregação plaquetária, o crescimento e diferenciação de células (Ricciotti e Fitzgerald, 2011).

8.7 Interpretação das análises de ácidos graxos em associação com os resultados obtidos para bioquímica e histologia

A fim de avaliar alguns parâmetros da saúde dos animais, vários testes bioquímicos foram realizados com as amostras de soro e plasma e, alguns valores são apresentados na Tabela 13. Dentre os testes realizados podemos destacar: colesterol de alta densidade (HDL do inglês *high density lipoprotein*), colesterol de baixa densidade (LDL do inglês *low density lipoprotein*) e colesterol total.

Tabela 13: Valores dos testes bioquímicos de HDL, LDL e colesterol total para as amostras dos animais estudados.

Grupos	HDL^a	LDL^a	Colesterol Total^a
Controle	88,31 ± 15,53	38,66 ± 10,96	141,81 ± 25,47
Intermediário	80,46 ± 16,15	34,15 ± 5,44	127,88 ± 12,17
Final	78,99 ± 10,41	54,65 ± 18,77	148,53 ± 15,26

^a Valor médio (n=6) em mg/dL.

As lipoproteínas são responsáveis pelo transporte dos lipídeos na circulação linfática, sanguínea e no interstício. De acordo com os valores de lipoproteínas descritos na Tabela 13, nota-se aumento nos níveis de colesterol total e de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e diminuição do nível de lipoproteína de alta densidade (HDL) do grupo final em relação ao grupo controle.

Sabe-se que baixas concentrações plasmáticas de HDL representam um dos maiores fatores de risco para doença arterial coronariana (Uint *et al.*, 2003). Esta diminuição no teor de HDL encontrado para o grupo final está diretamente relacionada com a qualidade dos AG presentes na dieta dos animais e, provavelmente com a sinalização celular e pelo efluxo de colesterol. Neste caso, o aumento de AGS na dieta (principalmente C16:0) leva ao aumento da síntese de LDL, para seu transporte, ou seja, uma das explicações é que as moléculas de AGS empilham-se de maneira coesa por possuírem cadeia retilínea de carbono. Essa forma de

empacotamento aumenta a capacidade de transporte de colesterol das partículas de LDL (Lottenberg, 2009).

Estas variações podem estar relacionadas com o aumento no teor de AG saturados e a diminuição no teor de AG poli-insaturados do óleo utilizado como fonte lipídica da dieta, como foi mostrada previamente no gráfico da Figura 25. Desse modo, nota-se que a relação entre a qualidade da alimentação e o impacto sobre o estado nutricional dos animais em relação às lipoproteínas foi confirmada. Estas medidas podem ser úteis no diagnóstico de rotina de risco de doenças cardiovasculares.

A análise histológica do tecido do fígado dos animais avaliados neste estudo foi realizada com o intuito de auxiliar na interpretação dos resultados obtidos. Logo, através das avaliações das lâminas histológicas, pode-se inferir que nas amostras provenientes do grupo controle foram observadas características compatíveis com a normalidade, conforme apresentado na Figura 29, letra A. No entanto, uma das amostras do grupo controle exibiu vasodilatação discreta sem significado patológico. Por outro lado, no grupo intermediário, representado letra B, foi observada discreta vasodilatação em todas as amostras, especialmente mais destacada na zona 3, e acúmulos intracelulares na zona 1 e parte da zona 2. Enfim, no grupo final, conforme destacado pela letra C, as amostras exibiram acúmulos intracitoplasmáticos em toda a extensão do lóbulo hepático (Zonas 1, 2 e 3) e, em algumas amostras, foi observada vasodilatação discretamente mais intensa em relação ao grupo intermediário, também em todas as zonas.

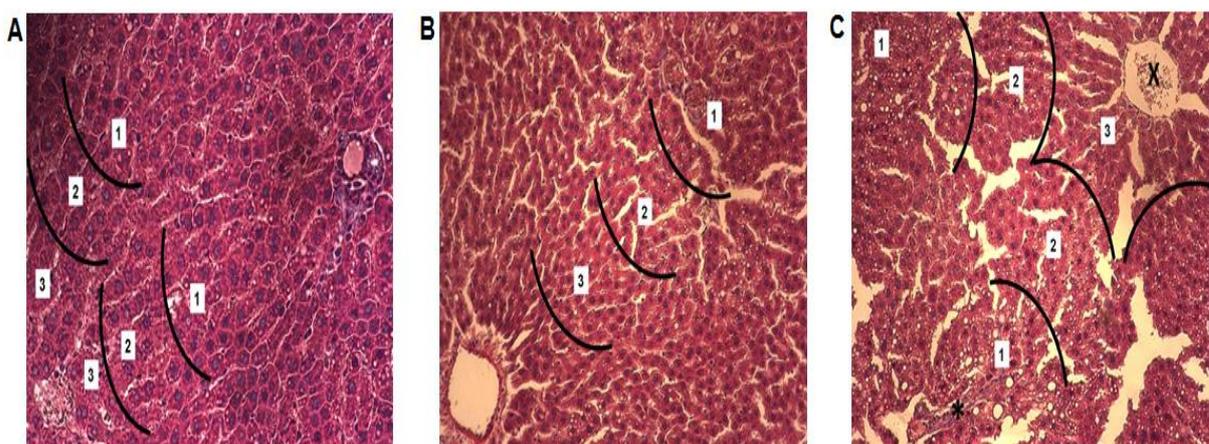


Figura 29: Lâminas histológicas para amostras de fígado dos animais avaliados (aumento de 400X). **A-** Lâmina histológica representativa do grupo controle. Marcação das zonas 1, 2 e 3. **B-** Lâmina histológica representativa do grupo intermediário. Marcação das zonas 1, 2 e 3. **C-** Lâmina histológica representativa do grupo final. Marcação das zonas 1, 2 e 3 (* marcação para tríade porta e X vênula central).

Fonte: o autor.

Desse modo, nota-se que em nenhuma amostra houve evolução para hepatite crônica inespecífica, bem como áreas de necrose e fibrose. Entretanto, indícios mostram que poderia haver desenvolvimento de processo inflamatório nos tecidos do grupo final caso a dieta continuasse a ser administrada por um período de tempo maior.

Em suma, com base nos valores expressos previamente na tabela de teor de AG por CE e GC (Tabela 12), pode-se dizer que a qualidade da dieta caracterizada pelo perfil de AG confirma a sua relação com as alterações bioquímicas, mostrada na Tabela 13, isto é, a alteração do colesterol total e de suas frações é dada pela diminuição no consumo de AG essenciais (C18:2 9c, 12c e C18:3 9c, 12c, 15c) e pelo aumento do consumo de AGS oriundos do óleo de fritura do grupo final. Tal alteração ainda pode ser relacionada aos resultados histológicos descritos na Figura 29, onde este mesmo grupo final apresentou acúmulo de gordura intracitoplasmático em toda a extensão do lóbulo hepático (Zonas 1, 2 e 3). Estes resultados corroboram com dados da literatura que mostram que a esteatose hepática, associada com níveis elevados de AGS e baixos níveis de AGI na dieta foi caracterizada por um aumento da lesão do fígado (Wang, Wei e Pagliassotti, 2006).

A fim de melhor avaliar o comportamento do modelo experimental aplicado, um estudo envolvendo a Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizado. Desse modo, os eletroferogramas das amostras de fígados dos três grupos de animais estudados foram avaliados utilizando PCA, de acordo com o gráfico de *scores* mostrado na Figura 30.

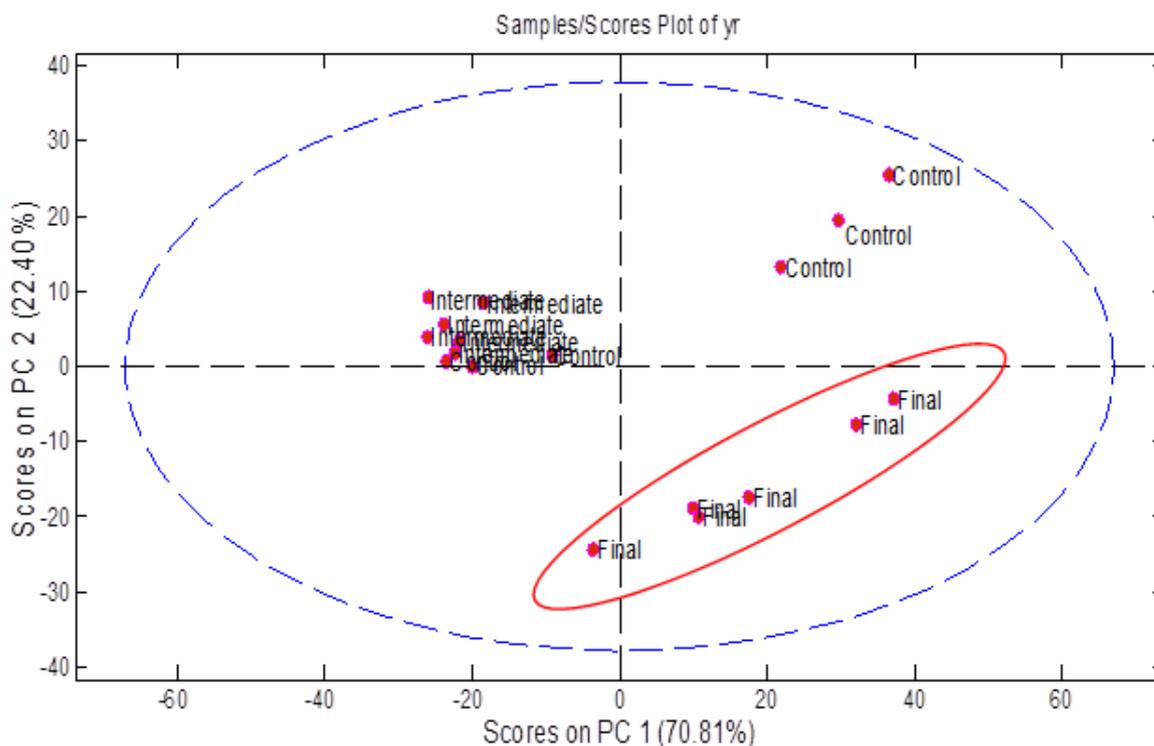


Figura 30: Gráfico de *Scores* obtidos através da análise de Componentes Principais (PCA).
Fonte: o autor.

No presente caso, foi utilizado para cálculo de PCA um total de dezoito eletroferogramas (objetos) obtidos a partir da análise do fígado dos animais usados no experimento (6 animais de cada grupo). O cálculo da PCA resultou em porcentagem total explicada de 93,21% para as duas primeiras componentes principais (PC1 e PC2). Através da análise do gráfico de *Scores*, observou-se que o grupo final (delineado) permaneceu realmente separado, em comparação com os outros grupos (grupos controle e intermediário). Em outras palavras, os resultados indicam que o último grupo pode ser considerado um grupo de risco, com mais predisposição para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e hepáticas.

Além dos resultados da PCA, um gráfico de Box Plot, apresentado na Figura 31, foi construído para os valores de lipoproteína de baixa densidade (LDL) dos animais dos grupos controle, intermediário e final.

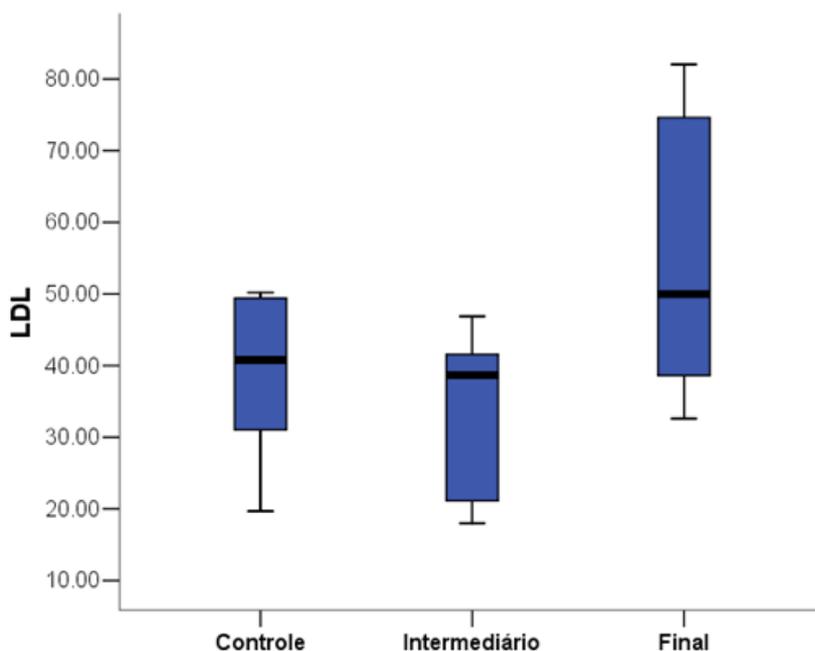


Figura 31: Gráfico de Box Plot para lipoproteína de baixa densidade (LDL).
Fonte: o autor.

O gráfico da Figura 31 mostra um valor mediano maior no teor de LDL para os animais do grupo final em relação aos grupos controle e intermediário, além de apresentar maior variabilidade nos valores dentro do grupo (fato que pode ser observado através do tamanho da caixa de cada grupo). Logo, os resultados indicam que o tempo de exposição total do óleo submetido a processos de fritura por imersão pode ser considerado relevante para a

avaliação da qualidade do óleo, ou seja, quanto maior o tempo de exposição do óleo ao processo de fritura maior será a alteração causada no tecido animal (fígado), de acordo com as informações histológicas citadas anteriormente.

Cabe ressaltar, que os hepatócitos do grupo final apresentaram acúmulo de gordura intracitoplasmático em toda a extensão do lóbulo hepático e, nesta condição, apresentam certa fragilidade que poderia culminar em apoptose, caso o período de consumo da dieta fosse prolongado, uma vez que esta relação: alimentação *versus* alterações é dose-dependente e tempo-dependente.

Em suma, a metodologia otimizada por CZE foi empregada com sucesso no monitoramento da alteração do perfil lipídico no fígado de ratos *Wistar*. Juntamente com a avaliação histológicas, parâmetros bioquímicos e por meio do uso de ferramentas estatísticas, como PCA, foi possível distinguir o grupo final do restante dos grupos (controle e intermediário). Logo, estas informações podem ser relevantes na distinção de um grupo de risco para doenças cardiovasculares.

Cabe ressaltar que os resultados obtidos neste capítulo 8 foram submetidos ao *Journal of Brazilian Chemical Society (JBACS)*, com o título **“Study of fatty acids profile in biological sample by capillary zone electrophoresis associate to chemometric approach”** e este trabalho foi aceito pela revista em dezembro de 2013 e já se encontra disponível no site do jornal.

9 DETERMINAÇÃO DE METAIS POR ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ATÔMICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO EM FÍGADO E FÊMUR DE RATOS *WISTAR*

O uso de biomarcadores pode refletir variações nos conteúdos de micronutrientes entre os compartimentos corporais e a própria interação com o meio externo, como por exemplo: os processos de absorção e excreção de nutrientes e seus metabólitos. Logo, biomarcadores tornam-se caminhos importantes para o entendimento das relações existentes entre a ingestão de micronutrientes e a determinação de seu estado nutricional, além de constituir um parâmetro para a manutenção de um organismo saudável (Henriques *et al.*, 2012).

Um biomarcador dietético ideal deveria refletir de maneira precisa os níveis de ingestão de modo a ser aplicado a qualquer população em que fosse alvo de estudo e uma aplicação previsível e relevante de biomarcadores está ligada à mensuração da biodisponibilidade dos micronutrientes. Alguns metais podem ser usados como possíveis biomarcadores, fornecendo diferentes respostas para diferentes níveis de depleção ou suplementação (Henriques *et al.*, 2012).

Com base nas informações supracitadas, pode-se dizer que não existe um biomarcador ideal e específico. Entretanto, algumas moléculas, mesmo não refletindo diretamente o consumo alimentar podem sinalizar alterações metabólicas em decorrência da dieta, como por exemplo, alguns minerais, que atuam de maneira direta ou indireta no metabolismo dos lipídios. Sabe-se da importância de alguns elementos químicos para o metabolismo celular, já que alguns atuam como cofatores para a atividade enzimática celular. A ação das enzimas antioxidantes, como por exemplo, a superóxido *dismutase*, utiliza o zinco ou manganês como cofatores. Já o selênio é utilizado como um grupo prostético para o controle da peroxidação lipídica de membrana (Michael, Harwood e Frayn, 2002).

Desse modo, alguns minerais foram avaliados em amostras de fígado e fêmur de ratos *Wistar* utilizando a técnica analítica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), com intuito de verificar os possíveis biomarcadores relacionados com o processo de metabólico dos lipídios.

9.1 Fundamentos de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

Os métodos espectroscópicos atômicos são empregados na determinação qualitativa e quantitativa de mais de 70 elementos químicos. Tais métodos são rápidos, sensíveis e geralmente de alta seletividade. A determinação de espécies atômicas somente é feita em meio gasoso no qual os átomos individuais ou íons elementares se encontram muito bem separados uns dos outros. Consequentemente, a primeira etapa de todos os procedimentos de espectroscopia atômica é a atomização, um processo no qual a amostra é volatilizada e decomposta de forma a produzir uma fase gasosa de átomos e íons.

Para os átomos e íons na fase gasosa, não há estados de energia vibracional ou rotacional. Isso significa que somente as transições eletrônicas ocorrem. Assim, os espectros de emissão atômica, de absorção e de fluorescência são constituídos por um número limitado de **linhas espectrais** estreitas. Na espectroscopia de emissão atômica, os átomos do analito são excitados por uma energia externa na forma de calor ou energia elétrica. A energia é tipicamente suprida por um plasma, uma chama, uma descarga a baixa pressão ou um laser de alta potência (Montasser e Golightly, 1992).

Descargas elétricas em gases são denominadas "plasmas", termo sugerido por Langmuir em 1929. Os plasmas são caracterizados por apresentarem ionização parcial e terem uma densidade bastante alta de elétrons livres. O plasma pode ser definido como um gás parcialmente ionizado onde coexistem elétrons livres e íons positivos em movimento, em um processo onde ocorre transferência de energia por radiação, condução e aquecimento Joule entre outros. Para transformar um gás em plasma, é necessário fornecer energia para produzir íons. O mecanismo de ionização pode ser térmico, por radiação ou por descarga elétrica (Reed, 1961).

Os atomizadores de plasma, os quais se tornaram disponíveis comercialmente em meados dos anos 1970, oferecem diversas vantagens em espectroscopia atômica analítica. No plasma de argônio utilizado para a espectroscopia atômica, os íons argônio e os elétrons são as espécies condutoras principais, embora os cátions da amostra possam também contribuir. Os íons argônio, uma vez formados no plasma, são capazes de absorver potência suficiente de uma fonte externa para manter a temperatura em um dado nível, de forma que a ionização adicional sustenta o plasma indefinidamente; temperaturas tão altas como 10.000 K são obtidas (Wendt e Fassel, 1965).

A Figura 32 exibe um desenho esquemático de uma fonte de plasma acoplado indutivamente (ICP). Esta fonte consiste, normalmente, em três tubos concêntricos de quartzo por meio dos quais fluem correntes de argônio. Na parte superior desse tubo encontra-se uma bobina de indução refrigerada a água e alimentada por um gerador de radiofrequência capaz de produzir cerca de 2 kW de energia a 27 MHz ou 40 MHz (alta frequência). A ionização da corrente de argônio é iniciada por uma centelha produzida por uma bobina de Tesla. Os íons resultantes e seus elétrons associados interagem então com o campo magnético oscilante produzido pela bobina de indução I (indicado por H na Figura 32). Essa interação leva os íons e os elétrons no interior da bobina a fluírem em caminhos anelares fechados; o aquecimento ôhmico é consequência da sua resistência a este movimento. A temperatura de um ICP é tão alta que este precisa ser isolado termicamente do cilindro de quartzo. O fluxo tangencial resfria as paredes internas do tubo central e centraliza o plasma radialmente.

A observação do plasma em ângulos retos, como pode ser visto na Figura 32B, é denominada geometria de observação radial. Os instrumentos de ICP mais modernos têm incorporado uma geometria de observação axial, exposta na Figura 32A. Nesse caso, a tocha é girada a 90°. A geometria radial fornece melhor estabilidade e precisão, enquanto a geometria axial é usada para se obter limites de detecção mais baixos.

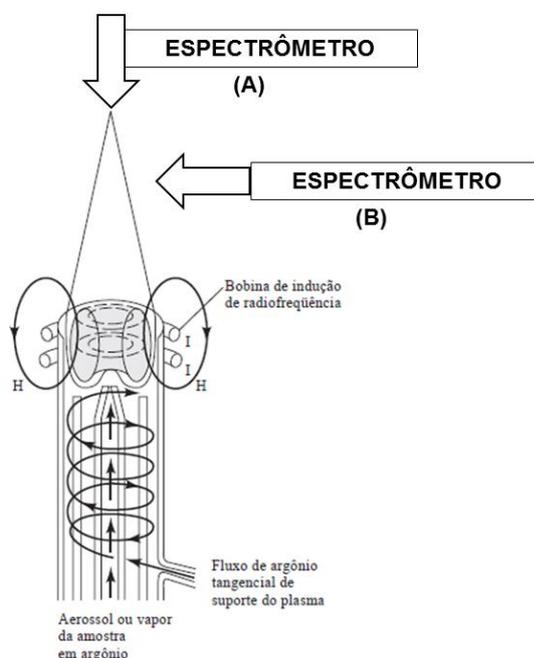


Figura 32: Desenho esquemático de uma fonte de plasma acoplado indutivamente. Geometrias de observação de fontes de ICP: (A) Geometria axial (B) geometria radial.

Fonte: Adaptado de V. A. Fassel, 1978.

A forma mais comum para introdução de amostras é através da formação de aerossol gás/líquido por meio de um nebulizador. Nebulizadores executam a função de converter amostras líquidas em aerossol, isto é, gotículas finamente divididas que são carregadas por um fluxo de gás (gás carreador). Este aerossol, representativo da composição original da amostra, é transportado pelo tubo central da tocha onde será injetado no canal central do plasma para subsequente vaporização, atomização e ionização (Montaser e Fassel, 1976).

O aerossol formado pelo processo de nebulização cria uma população de gotículas, com uma distribuição de tamanhos, cujo diâmetro médio varia de 1 a 80 μm . Quanto mais uniforme o tamanho da gotícula, mais precisos serão os resultados das determinações analíticas. Gotículas maiores necessitam de maior energia para se vaporizar e atomizar, resultando em instabilidade local no plasma. Algumas técnicas são usadas para classificar as gotículas antes de o aerossol ser transportado para o plasma. Isto resulta em uma seleção, de modo que serão introduzidas no plasma, preferencialmente, gotículas com pequeno diâmetro médio. A forma mais efetiva de monitorar esta classificação é o uso de uma câmara de nebulização, a qual fornece uma câmara de expansão e uma rota circular para as gotículas direcionarem-se ao plasma. As gotículas maiores, que apresentam maior momento, colidem com as paredes da câmara de nebulização onde são condensadas. Apenas as partículas de menores diâmetros sobrevivem a este processo e são transportadas através do sistema (Skoog, Holler e Nieman, 2009).

Já foram propostos diversos sistemas de nebulização acoplados em câmaras de nebulização de diferentes geometrias. Pode-se destacar o nebulizador concêntrico, também chamado de *Meinhard*, este é o tipo mais popular de nebulizador pneumático. Consistido de um tubo capilar envolvido concentricamente por outro de paredes mais grossas, este sistema se afunila de forma que o gás carreador, ao passar através do tubo externo, produz um gradiente negativo de pressão (efeito Venturi) ocasionando a aspiração da amostra no tubo mais interno, conforme Figura 33 (Boorn e Browner, 1987; Skoog, Holler e Nieman, 2009)

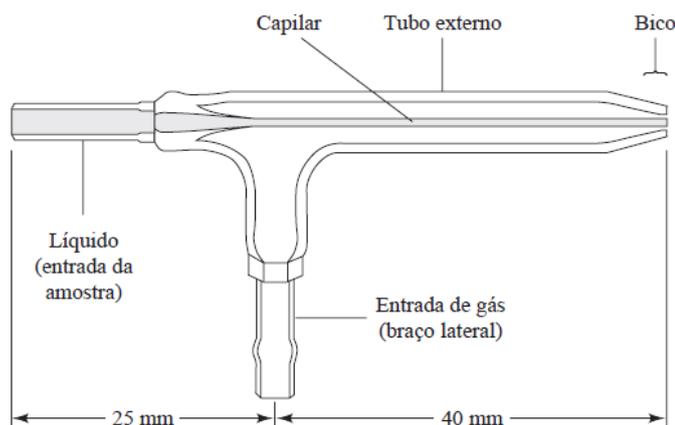


Figura 33: Desenho representando o nebulizador do tipo Meinhard.
Fonte: Adaptado de Skoog *et al.* (2009).

Os nebulizadores despejam o aerossol em câmaras de nebulização. A primeira função destas câmaras, como já foi citada, consiste em separar as gotículas de aerossol, sendo as maiores condensadas e descartadas e as gotas menores formam uma nuvem mais homogênea que é conduzida para o plasma (Skoog, Holler e Nieman, 2009).

A câmara de nebulização ciclônica, que foi utilizada neste trabalho, faz uso de um fluxo de rotação tangencial em um compartimento circular. A força centrífuga do aerossol, à medida que admite um caminho circular na câmara, força as gotículas maiores a colidirem com a parede da câmara e serem rejeitadas, enquanto as gotículas de menor diâmetro são levadas através da câmara ao plasma do equipamento (Montasser e Golightly, 1992; Skoog, Holler e Nieman, 2009).

9.2 Instrumentação

A análise dos metais (amostras fêmur e fígado de ratos *Wistar*) foi realizada em um equipamento de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (*dual view*) da Perkin Elmer (modelo *Optima 7000DV*, Norwalk, USA). As condições de análise utilizadas seguiram as condições de rotina do laboratório da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, onde as análises foram realizadas. Tais condições foram: vazão de 0,2 L/min de argônio auxiliar, 0,6 L/min de argônio para nebulização das amostras, plasma com 1300 W de potência, sistema de nebulizador concêntrico com câmara ciclônica e vazão de 15L/min.

A Tabela 14 mostra os elementos determinados, bem como o comprimento de onda escolhido para cada um e a posição da tocha no momento da análise. Cabe ressaltar que os elementos sódio (Na) e cálcio (Ca) foram determinados na posição radial por estarem em alta

concentração nas amostras, enquanto que os demais elementos foram determinados na posição axial.

Tabela 14: Metais determinados por ICP OES e seus respectivos comprimentos de onda.

Elemento	Comprimento de onda	Configuração da tocha
Sódio (Na)	588,995	radial
Cálcio (Ca)	317,933	radial
Ferro (Fe)	238,204	axial
Magnésio (Mg)	285,213	axial
Zinco (Zn)	213,857	axial
Selênio (Se)	196,026	axial
Cobre (Cu)	324,752	axial
Manganês (Mn)	257,610	axial

9.3 Preparo de amostra

9.3.1 Procedimento de digestão das amostras

As amostras de fígado e fêmur separadas para análise por ICP OES foram previamente trituradas e levadas à estufa a 70°C por três dias seguidos para secagem completa e, posterior etapa de digestão ácida (HNO₃) antes da análise (Silva, 2009). É importante destacar que todo o processo de digestão foi realizado em capela com dissipação adequada de eventuais vapores nocivos. O fluxograma apresentado na Figura 34 mostra esquematicamente o processo de digestão, sendo que a massa pesada para o fígado foi de aproximadamente 300,0 mg e diluída, após digestão, para um volume final de 25,0 mL de água deionizada, enquanto que para as amostras de fêmur, a massa pesada foi em torno de 100,0 mg e diluída, após etapa de digestão, para um volume final de 50,0 mL de água deionizada.

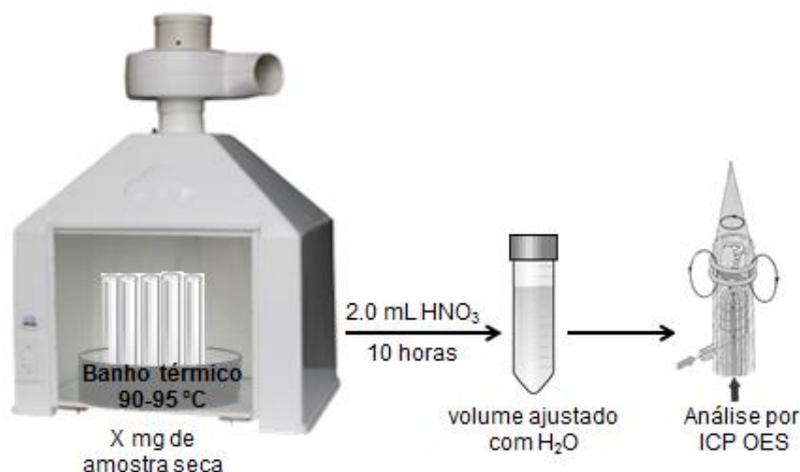


Figura 34: Fluxograma do processo de digestão das amostras de fêmur e fígado para análise por ICP OES.
Fonte: o autor.

Cabe ressaltar que o estudo foi realizado em animais em fase de crescimento, ou seja, a partir do desmame até o início da vida adulta. Neste período há calcificação dos ossos, com deposição de minerais - especialmente do cálcio. Logo, o principal metal de interesse, quantitativamente, era o cálcio, por ser a base estrutural do tecido. Entretanto, como a técnica de ICP OES é multielementar, outros elementos de importância biológica (por exemplo: zinco e magnésio) também foram avaliados.

Os valores obtidos são apresentados nos gráficos de Box Plot da Figura 35, cujos dados são expressos pela mediana - parâmetro de tendência central - para os metais zinco, magnésio e cálcio para amostras de fêmur dos animais dos grupos controle, intermediário e final.

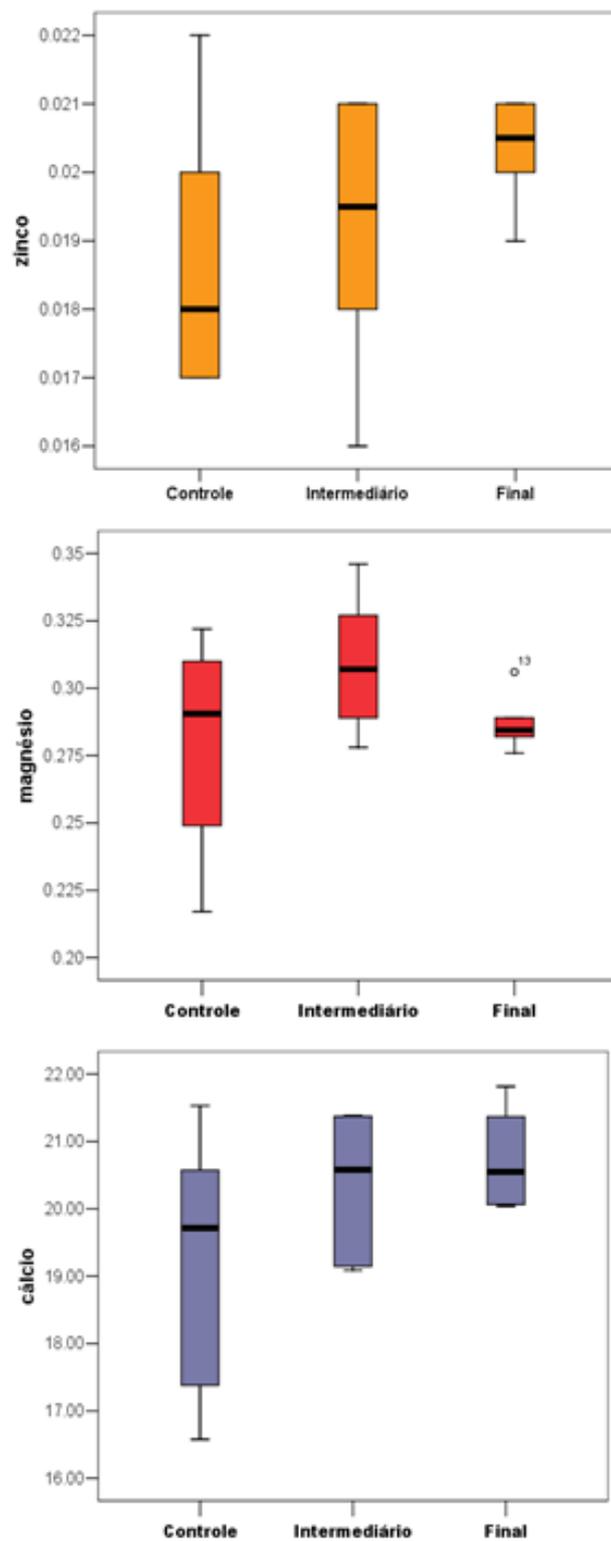


Figura 35: Gráfico de *Box Plot* dos metais zinco, magnésio e cálcio nas amostras de fêmur dos animais dos grupos controle, intermediário e final.
Fonte: o autor.

Através da avaliação dos gráficos da Figura 35, é possível observar o metal zinco apresentou um aumento no valor mediano do grupo final (aproximadamente 11%) em relação ao grupo controle, mas esse aumento não foi estatisticamente significativo. Observa-se também uma diminuição de no teor de magnésio nas amostras do grupo final em relação ao controle, além de uma menor variabilidade dos valores para o grupo final. Por fim, nota-se também que há um discreto aumento no valor mediano do teor de cálcio do grupo final em relação ao grupo controle, além de uma menor variabilidade dos valores para o grupo final.

Entretanto, para uma apreciação mais completa das variações encontradas para os metais zinco, magnésio e cálcio nas amostras de fêmur, fez-se necessário uma avaliação estatística mais detalhada. Logo, os valores encontrados para estes metais, bem como seus resultados estatísticos estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15: Teor de zinco, magnésio e cálcio nas amostras de fêmur dos animais dos grupos controle, intermediário e final.

Grupos	Animal	Zinco (g 100g⁻¹)	Magnésio (g 100g⁻¹)	Cálcio (g 100g⁻¹)
Controle	1	0,022	0,249	17,381
	2	0,018	0,310	20,573
	3	0,020	0,322	20,467
	4	0,017	0,217	16,577
	5	0,018	0,296	21,530
	6	0,017	0,285	18,954
	Mediana	0,018	0,290	19,710
Intermediário	7	0,018	0,327	21,385
	8	0,019	0,308	19,088
	9	0,020	0,346	21,372
	10	0,016	0,289	19,147
	11	0,021	0,278	20,380
	12	0,021	0,306	20,776
	Mediana	0,019	0,307	20,578
Final	13	0,021	0,289	20,039
	14	0,020	0,282	21,366
	15	0,021	0,285	21,816
	16	0,020	0,284	20,318
	17	0,019	0,276	20,063
	18	0,015	0,266	19,067
	Mediana	0,020	0,280	20,190
	Normalidade (p-valor)	0,000	0,584	0,765
	Homocedasticidade (p-valor)	0,162	0,040	0,026
	Anova (p-valor)	0,245	0,197	0,174

Observa-se que o metal zinco não apresenta comportamento que segue distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk – p -valor $< 0,05$), sendo necessário, portanto, o uso de estatística não paramétrica (Anova de Kruskal-Wallis). Desse modo, o p -valor encontrado para comparação entre os grupos avaliados (controle, intermediário e final) foi de 0.245, ou seja, não há diferença significativa nos teores de zinco entre os grupos dentro do intervalo de 95% de confiança.

Já os metais magnésio e cálcio seguem uma distribuição normal (Teste de Shapiro-Wilk – p -valor $> 0,05$) e, neste caso, a estatística paramétrica deve ser aplicada. Sendo assim, o p -valores para magnésio e cálcio encontrados foram, respectivamente, 0,197 e 0,174. Desse modo, conclui-se que também não há diferença significativa nos teores destes metais entre os grupos avaliados dentro do intervalo de 95% de confiança. Em suma, estes resultados retratam que a deposição dos minerais, especialmente cálcio, no tecido ósseo seguiu o padrão fisiológico, não havendo nenhuma mobilização para outros processos metabólicos.

Já o fígado, este é um órgão de intensa atividade metabólica e alterações podem ocorrer por diversos fatores, dentre eles a qualidade da dieta. A quantidade e a composição dos lipídios da dieta afetam o metabolismo hepático desta classe de nutrientes. Considerando que os processos metabólicos são mediados por alguns minerais, foi realizada também a análise por ICP OES das amostras de fígado dos animais avaliados neste trabalho. Os metais avaliados nesta amostra foram: sódio, cálcio, ferro, magnésio, zinco, selênio, cobre e manganês. A Figura 36 apresenta os gráficos de Box Plot dos metais ferro, manganês, zinco, cobre selênio e sódio.

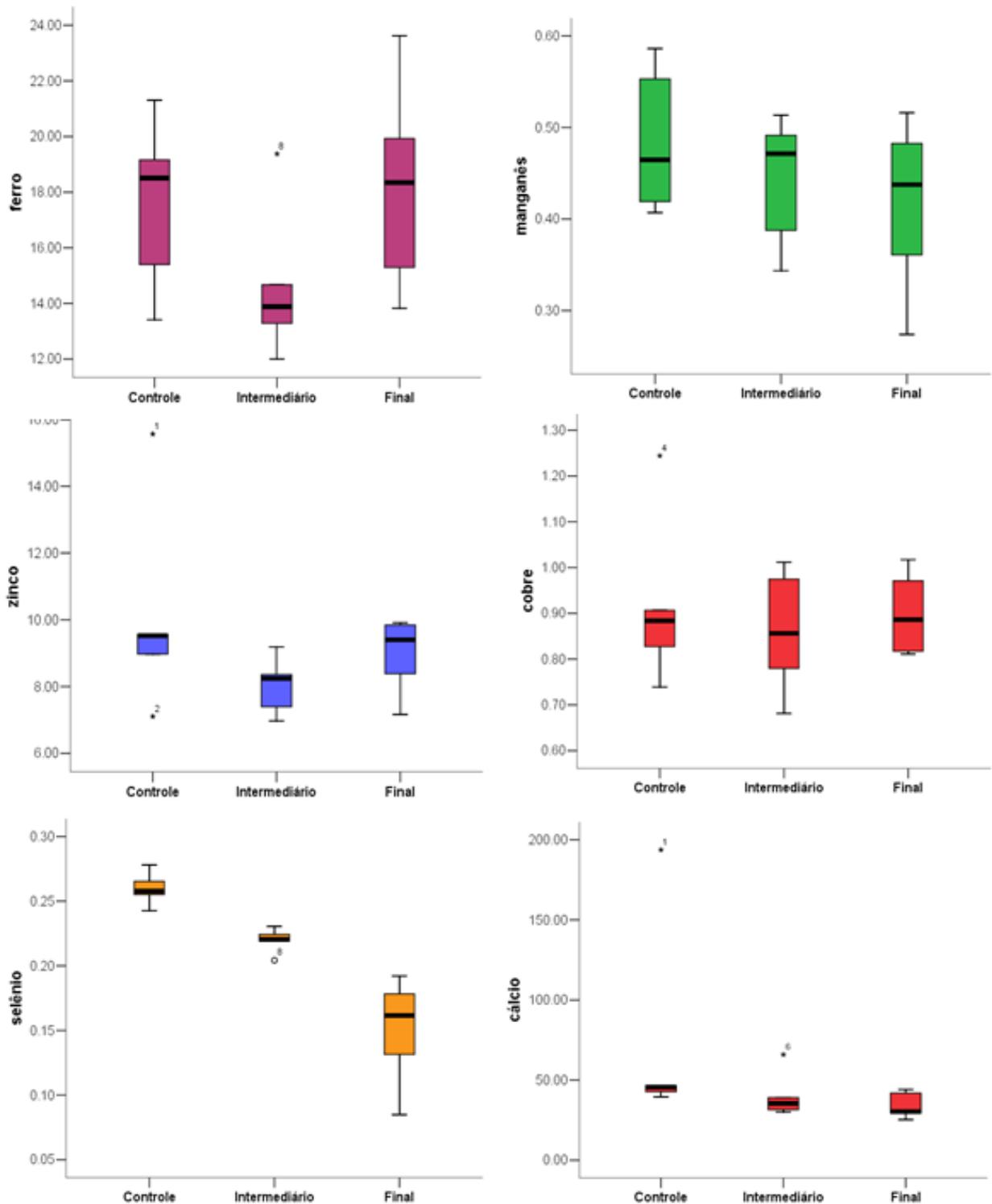


Figura 36: Gráfico de *Box Plot* dos metais ferro, manganês, zinco, cobre selênio e sódio nas amostras de fígado dos animais dos grupos controle, intermediário e final.
Fonte: o autor.

Com base na avaliação dos gráficos da Figura 36, nota-se que para o metal ferro, não se observa diferença nos valores medianos entre os grupos controle e final, mas pode ser observada uma diminuição no teor do grupo intermediário, além da presença de um ponto *outlier* neste grupo.

Para o manganês, observa-se que valor da mediana entre os três grupos não apresentou uma variação significativa nem a dispersão dos valores dentro de cada grupo.

Para o zinco, é possível notar que o valor da mediana do grupo intermediário foi menor quando comparado aos grupos controle e final, que apresentaram valores de mediana muito próximos. Além disso, houve um discreto aumento na dispersão dos dados dos grupos intermediário e final em relação ao grupo controle.

Para o cobre, observa-se que o valor da mediana entre os três grupos também não apresentou uma variação muito significativa. Porém, houve um aumento na dispersão dos valores dos grupos intermediário e final em relação ao grupo controle.

Para o cálcio, nota-se que uma diminuição no valor da mediana do grupo final em relação aos grupos intermediário e controle. Além disso, houve um aumento gradativo na dispersão dos valores dos grupos intermediário e final em relação ao grupo controle. Destaca-se também a presença de um ponto *outlier* no grupo controle e um no grupo intermediário.

Por fim, para o metal selênio, observa-se uma diminuição considerável no valor da mediana dos grupos intermediário e final quando comparados ao grupo controle, além da evidente dispersão de valores do grupo final. Há de se destacar também a presença de um ponto *outlier* no grupo intermediário.

Entretanto, para uma análise mais completa das variações encontradas para os metais ferro, magnésio, sódio, zinco, cálcio, cobre, selênio e manganês nas amostras de fígado, fez-se necessário uma avaliação estatística mais minuciosa. Assim, os valores encontrados para estes metais, bem como seus resultados estatísticos são apresentados na Tabela 16. É importante ressaltar que para os metais zinco, cálcio e selênio, fez-se necessário a implementação de estatística não paramétrica, uma vez que para zinco e cálcio o pressuposto de normalidade foi violado e, para selênio, o pressuposto de homogeneidade foi violado.

Tabela 16: Resultados estatísticos e teores expressos em mg 100g⁻¹ de ferro, magnésio, sódio, zinco, cálcio, cobre, selênio e manganês nas amostras de fígado dos animais dos grupos controle, intermediário e final.

	Animal	Fe	Mg	Na	Zn	Ca	Cu	Se	Mn
Controle	1	13,412	110,454	68,539	15,568	193,709	0,907	0,265	0,586
	2	19,161	54,454	127,109	7,105	46,483	0,739	0,243	0,465
	3	21,303	55,006	131,136	8,974	45,714	0,884	0,278	0,407
	4	18,514	63,081	72,226	9,528	42,770	1,244	0,255	0,553
	5	15,398	60,508	97,795	9,553	39,597	0,827	0,258	0,419
Mediana		18,514	60,508	97,795	9,528	45,714	0,884	0,258	0,465
Intermediário	6	13,899	69,846	76,619	6,971	65,941	0,783	0,221	0,452
	7	12,006	49,691	97,956	7,397	39,025	0,681	0,230	0,388
	8	19,377	50,211	112,437	8,356	37,213	0,780	0,204	0,344
	9	14,673	61,146	104,778	8,322	33,770	0,975	0,220	0,514
	10	13,866	61,383	90,931	8,162	31,557	0,929	0,224	0,491
	11	13,282	58,763	86,820	9,182	30,112	1,012	0,219	0,490
Mediana		13,882	59,955	94,444	8,242	35,491	0,856	0,220	0,471
Final	12	13,830	52,036	70,907	9,273	30,533	0,884	0,168	0,400
	13	15,294	58,261	77,216	9,913	25,249	1,018	0,178	0,483
	14	17,210	46,665	97,617	8,386	29,806	0,811	0,132	0,274
	15	19,928	66,571	107,024	9,843	41,899	0,971	0,192	0,516
	16	19,472	57,962	93,870	9,535	44,203	0,888	0,155	0,475
	17	23,625	50,987	124,495	7,164	29,951	0,817	0,085	0,361
	Mediana		18,341	54,999	95,743	9,404	30,242	0,886	0,162
Normalidade p-valor		0,687	0,002	0,553	0,009	0,000	0,229	0,059	0,255
Homogeneidade p-valor		0,506	0,080	0,123	0,100	0,015	0,363	0,030	0,644
Anova p-valor		0,124	0,303	0,929	0,107	0,037	0,767	0,001	0,399

Todos os teores são expressos em mg 100g⁻¹

Os teores encontrados para os metais cálcio e selênio apresentaram diferenças significativas entre os grupos controle, intermediário e final dentro do intervalo de 95% de confiança, uma vez que o p-valor para ambos foi menor que 0,05.

Observou-se uma redução estatisticamente significativa de 33% para o teor de cálcio dos animais do grupo final em relação ao grupo controle. Entretanto, ainda não foi possível fazer uma correlação dessa diminuição com os processos metabólicos dos lipídios.

Dentre os metais analisados, o Se é destacado, uma vez que o teor encontrado para este metal menor em torno de 41% no grupo final que o valor encontrado para os animais do grupo controle.

A maior parte do selênio ingerido é metabolizada no fígado e, depois de metabolizado, os compostos orgânicos de selênio seguem pela veia porta para o sangue ou são removidos no próprio fígado pela transulfuração do selênio. O novo selênio será utilizado para síntese de várias selenoproteínas ou será degradado e excretado por diversas vias (Thomson, 2006).

O selênio é incorporado a 25 selenoproteínas com atividades biológicas como proteção contra peroxidação lipídica, sequestro de espécies reativas de oxigênio, metabolismo de hormônios tireoidianos e modulação da resposta inflamatória. Propõe-se que sua ingestão reduza o risco de doenças crônicas resultantes do estado oxidativo e inflamatório alterado e associado à síndrome metabólica (SM) (Kasche *et al.*, 2005; Sanmartin *et al.*, 2011).

A biodisponibilidade é entendida como a quantidade do nutriente absorvida a ser utilizada pelo organismo humano. Os fatores que influenciam a disponibilidade do selênio são: quantidade de selênio consumida, origem alimentar do selênio, interação de outros componentes da dieta, eficiência de digestão, formação de compostos absorvíveis de selênio, tempo de transição intestinal, estado nutricional do organismo em relação ao selênio e doenças do trato intestinal (Fairweather-Tait, 1997).

Sabe-se que todos os animais envolvidos neste estudo receberam a mesma quantidade de selênio e de mesma origem (mix mineral). Logo, pode-se dizer que a interação do selênio com outros componentes da dieta (AG) foi alterada, uma vez que os animais deste trabalho foram afetados distintamente pela dieta, apresentando uma grande dispersão nos valores de selênio no grupo final. A diminuição no teor de selênio do grupo final pode estar relacionada com a diminuição da função antioxidante, já que os processos de oxidação geram também compostos altamente reativos (espécies reativas de oxigênio ou radicais livres), que em excesso aumentam o estresse oxidativo de estruturas celulares. Entretanto, ainda há um longo caminho a ser percorrido, que passa necessariamente pelo conhecimento detalhado da

biodisponibilidade de certos minerais e de suas interfaces, além da variabilidade de interações e respostas apresentadas pelos diversos tipos celulares, que compõem sistemas de interação com os minerais. Em suma, a dieta do grupo final rica em AGS e reduzida em AGEs, pode estar relacionada com a diminuição do teor de selênio deste grupo e, com os consequentes danos encontrados nos hepatócitos deste mesmo grupo, isto é, maior deposição de lipídios em relação aos demais grupos.

10 SEPARAÇÃO DOS HOMÓLOGOS DE POSIÇÃO VACÊNICO E ELAÍDICO POR CZE

10.1 “Complexação” dos ácidos graxos com nitrato de prata (AgNO_3)

Fundamentado nos estudos de Damyanova *et al.* (Damyanova *et al.*, 2002) e em cálculos teóricos (realizados pelo grupo do professor Hélio Dos Santos - UFJF), foi proposto uma reação de complexação entre ácido elaídico e prata (I) e entre ácido vacênico e prata (I) como intuito de formar complexos com volumes distintos para que pudessem ser separados por eletroforese capilar de zona. A estratégia para execução este trabalho foi fundamentada na reação entre solução de prata (I), com os ácidos graxos em questão.

A primeira opção foi reagir diretamente cada ácido graxo com a solução saturada de prata (AgNO_3) e, após 24 horas a análise do possível complexo foi verificada por meio de espectroscopia de infravermelho. O espectro obtido para análise do cristal formado entre ácido elaídico e prata pode ser observado na Figura 37. Pode ser observada uma mudança de intensidade na região de frequência de 1440 cm^{-1} , o que sugere uma possível formação do complexo da prata com ácido elaídico. Entretanto, as bandas não foram caracterizadas.

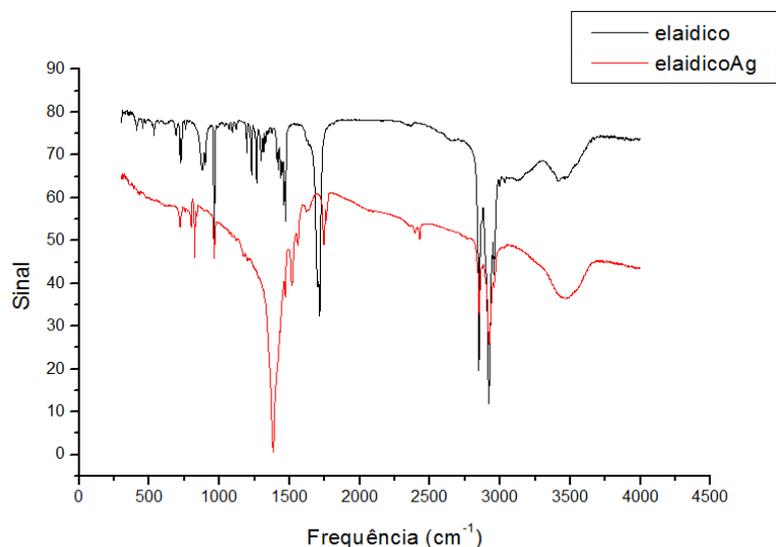


Figura 37: Espectro de infravermelho do padrão de ácido elaídico (linha preta) e padrão de ácido elaídico após reação com solução de AgNO_3 (linha vermelha).

Fonte: o autor.

Entretanto, esta mudança de comportamento observada não foi suficiente para apresentar resultados positivos para separação dos homólogos na análise da solução por CZE. A análise por CZE foi realizada por detecção direta utilizando eletrólito composto por: 10,0 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio, 10,0 mmol L⁻¹ de Brij 35 (Polioxietileno lauril éter), 25% acetonitrila e 25% metanol (Porto, Souza e Oliveira, 2011). Os eletroferogramas obtidos nesta análise estão representados na Figura 38.

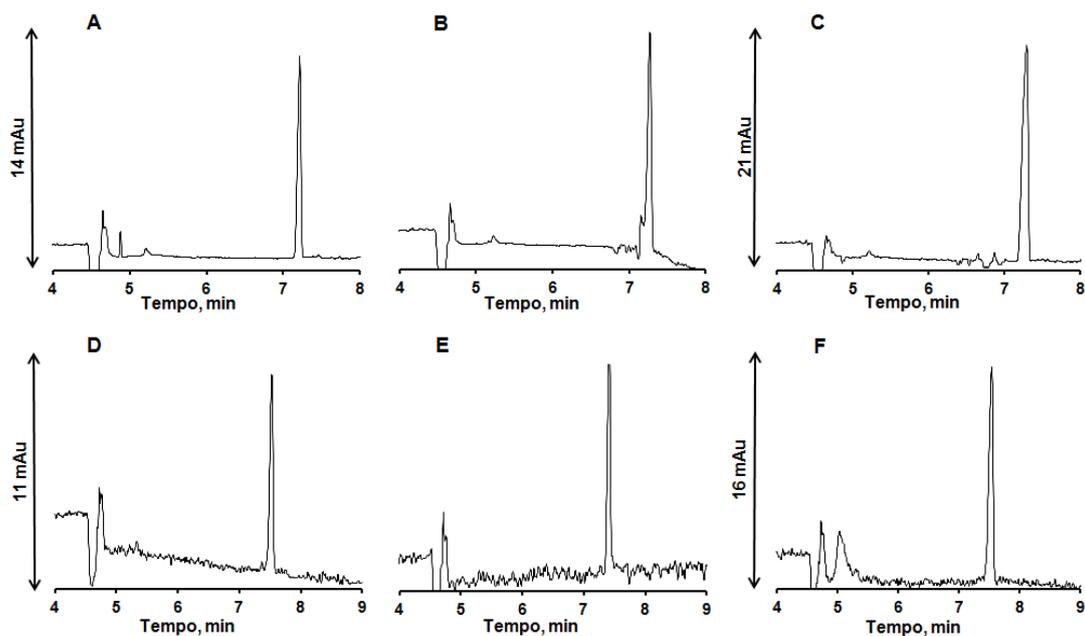


Figura 38: Eletroferogramas de padrões de ácidos graxos. A- Ácido elaídico 0,50 mmol L⁻¹, B- Ácido Vacênico 0,50 mmol L⁻¹, C- Mistura dos ácidos elaídico e vacênico 0,50 mmol L⁻¹, D- Ácido elaídico 0,50 mmol L⁻¹ após reação com AgNO₃, E- Ácido vacênico 0,50 mmol L⁻¹ após reação com AgNO₃, F- Mistura dos ácidos elaídico e vacênico 0,50 mmol L⁻¹ após reação com AgNO₃.

Eletrólito: 10,0 mmol L⁻¹ de tampão tetraborato de sódio, 10,0 mmol L⁻¹ de Brij 35, 25% acetonitrila e 25% metanol. Condições de análise: Detecção em 200 nm, injeção a 25 mbar por 5 segundos, +27 kV, e temperatura no interior do cartucho a 27°C.

Fonte: o autor.

Como pôde ser observado nos eletroferogramas apresentados acima, não foi possível a separação dos homólogos em questão. Logo, a estratégia envolvendo a reação de complexação dos ácidos graxos elaídico e vacênico com prata foi descartada e uma segunda estratégia envolvendo ciclodextrinas foi iniciada.

10.2 Testes com ciclodextrinas

Estudos teóricos realizados pelo grupo do Professor Hélio dos Santos (UFJF) sinalizaram positivamente para formação de complexos de inclusão com volumes diferentes entre β -ciclodextrina (β -CD) e os ácidos elaídico e vacênico. Esta informação foi importante para nortear os estudos iniciais.

O primeiro passo foi testar alguns tipos de ciclodextrinas, além da β -CD. Utilizou-se como base para os estudos, o eletrólito otimizado previamente por Barra *et. al* (Barra *et al.*, 2012). Entretanto, após alguns testes, observou-se que a presença do 1-octanol impossibilitava a completa solubilização do eletrólito na presença de ciclodextrinas na concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Desse modo, retirou-se o 1-octanol do eletrólito e, posteriormente, diferentes tipos de ciclodextrinas (CD) foram adicionadas na também na concentração de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, sendo estas: metil- β -ciclodextrina (m- β -CD), β -ciclodextrina sulfatada (s- β -CD) e β -ciclodextrina (β -CD).

Sabe-se que Brij 35 é um tensoativo neutro e que auxilia na separação de AG *cis/trans* mediante a formação de agregados e que, em um primeiro momento, poderia haver uma interação positiva com ciclodextrina. De acordo com os eletroferogramas apresentados na Figura 39, foi possível observar que não houve nenhuma evidência de separação entre os homólogos elaídico e vacênico e, pode-se concluir que a interação Brij 35 e ciclodextrina apresentou efeito antagônico para o sistema.

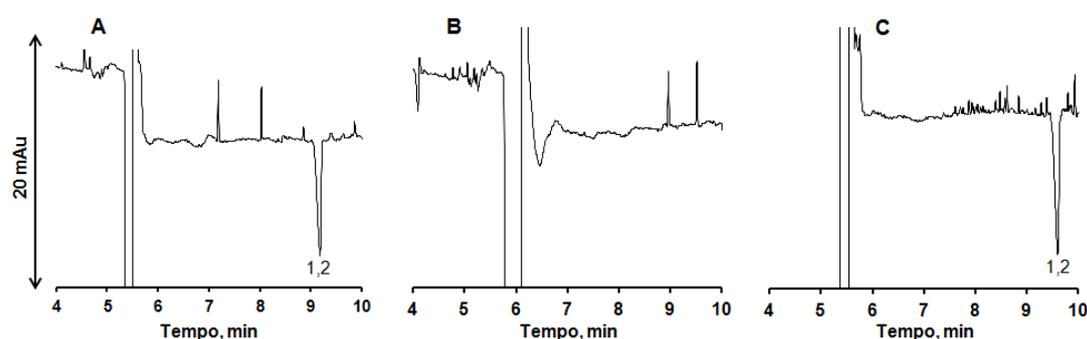


Figura 39: Eletroferograma de padrões de ácidos graxos. **1-** Elaídico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, **2-** Vacênico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$. **A- Eletrólito:** $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Brij; 45% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $4,7 \text{ mmol L}^{-1}$ de metil- β -ciclodextrina. **B- Eletrólito:** $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Brij; 45% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $5,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de β -ciclodextrina sulfatada. **C- Eletrólito:** $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Brij; 45% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de β -ciclodextrina. **Condições de análise:** injeção $5 \text{ s} \times 12,5 \text{ mbar}$, $+19 \text{ kV}$, 25°C , detecção indireta em $224 (\pm 2) \text{ nm}$, capilar de TSH com 40 cm de comprimento efetivo, $75 \mu\text{m}$ D.I e 375 mm D.E. e $48,5 \text{ cm}$ de comprimento total.

Fonte: o autor.

Baseado nas informações supracitadas, o segundo passo foi testar o eletrólito nas mesmas condições supracitadas, retirando apenas o Brij 35 da sua composição. Os eletroferogramas obtidos com o uso desse novo eletrólito são apresentados na Figura 40.

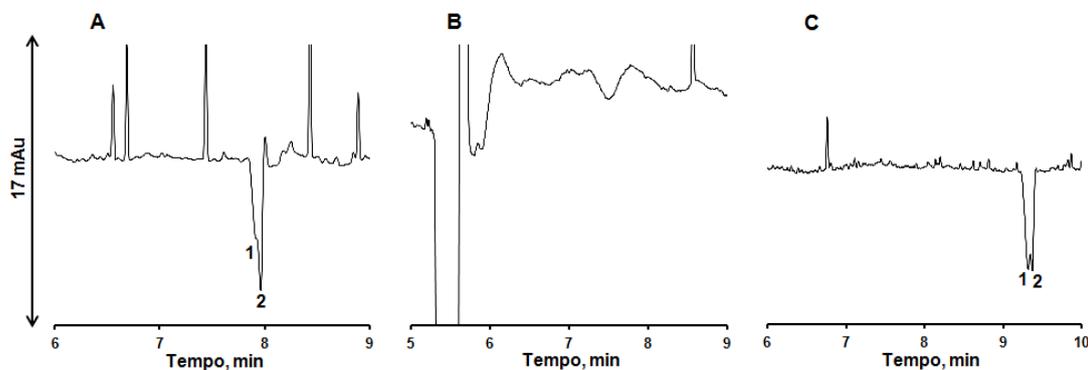


Figura 40: Eletroferograma de padrões de ácidos graxos. **1-** Elaídico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, **2-** Vacênico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$. **A- Eletrólito:** $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; 45% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $4,7 \text{ mmol L}^{-1}$ de metil- β -ciclodextrina. **B- Eletrólito:** $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; 45% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $5,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de β -ciclodextrina sulfatada. **C- Eletrólito:** $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; 45% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de β -ciclodextrina. **Condições de análise:** injeção $5 \text{ s} \times 12,5 \text{ mbar}$, $+19 \text{ kV}$, 25°C , detecção indireta em $224 (\pm 2) \text{ nm}$, capilar de TSH com 40 cm de comprimento efetivo, $75 \mu\text{m D.I}$ e 375 mm D.E. e $48,5 \text{ cm}$ de comprimento total.

Fonte: o autor.

Após avaliação do perfil de separação dos eletroferogramas apresentados na Figura 40, optou-se por trabalhar com a β -ciclodextrina como constituinte do eletrólito em questão, já que o eletroferograma C da referida figura apresentou um perfil de separação melhor quando comparados aos outros apresentados pelas letras A e B. Alguns testes envolvendo a mistura da β -ciclodextrina e metil- β -ciclodextrina foram realizados, mas não apresentaram resultados significativos.

Para melhor entendimento do sistema, fez-se necessário estudar a solubilidade das β -ciclodextrinas (β -CD), uma vez que estas apresentam um comportamento anômalo de baixa solubilidade em meio aquoso ($1,85 \text{ g}/100 \text{ mL}$). Esta propriedade é um fator limitante na investigação das propriedades de inclusão de compostos formados por este oligossacarídeo cíclico (Chatjigakis, Donzé e Coleman, 1992). A literatura descreve algumas alternativas para aumentar a solubilidade desta ciclodextrina, dentre as quais podemos destacar a adição de uréia (Pharr *et al.*, 1989), etanol (Zukowski, Sybilska e Jurczak, 1985) e acetonitrila (Chatjigakis, Donzé e Coleman, 1992). Para acetonitrila, observou-se que o máximo de solubilidade da β -CD ($3,7 \text{ g}/100\text{mL}$) foi alcançada para 8% deste solvente no meio (Chatjigakis, Donzé e Coleman, 1992).

No presente caso, observou-se que a proporção de acetonitrila de 45% que era usada no eletrólito não permitia uma completa solubilização do mesmo na presença de β -CD. Logo, baseado na literatura supracitada, optou-se por trabalhar com proporções menores de acetonitrila e proporções variadas de β -CD. Para isso, foi necessária implementação de um planejamento experimental com 3 níveis e 2 fatores (3^2) e triplicata autêntica no ponto central, onde os fatores escolhidos foram exatamente acetonitrila e β -CD e os níveis podem ser observado na Tabela 17.

Tabela 17: Matriz do planejamento experimental 3^2 contendo os níveis e os fatores escolhidos.

Ensaio	ACN (%)	β -CD (mmol L ⁻¹)
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	1
4	0	-1
5	0	0
6	0	1
7	1	-1
8	1	0
9	1	1
10	0	0
11	0	0

ACN (%): (-1) 20,0; (0) 25,0; (1) 30,0.

β -CD (mmol L⁻¹): (-1) 7,0; (0) 9,7; (1) 11,6.

Inicialmente, a mistura de padrões para o teste de separação dos homólogos era composto somente pelos ácidos graxos elaídico e vacênico. Entretanto, considerando que nas amostras reais a presença do ácido oleico seria constante, optou-se por acrescentá-lo à mistura de padrões de elaídico e vacênico. A Figura 41 apresenta o eletroferograma do ensaio 07 do planejamento de experimentos (7,0 mmol L⁻¹ de β -CD e 30% de ACN), uma vez que este ensaio apresentou o melhor perfil de separação comparado ao restante do planejamento.

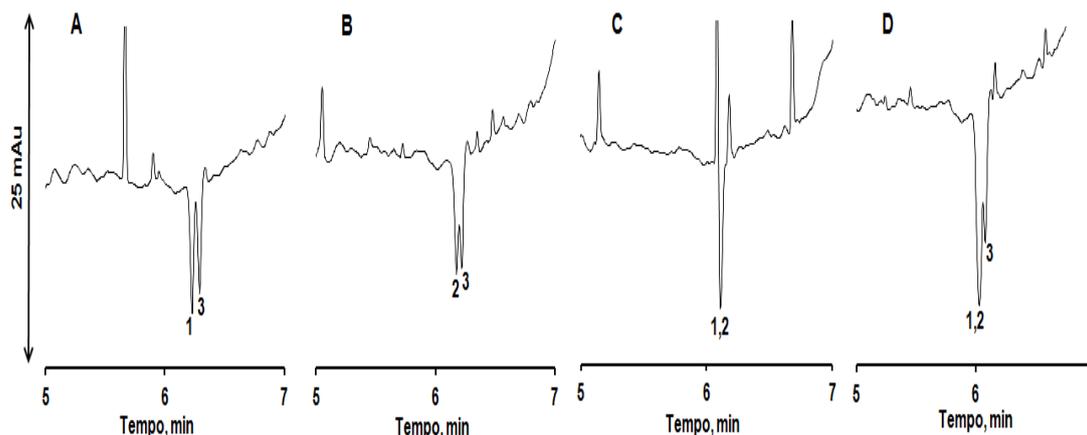


Figura 41: Eletroferogramas de padrões de ácidos graxos para o ensaio 7. 1- Oleico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, 2- Vacênico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$, 3- Elaídico $0,50 \text{ mmol L}^{-1}$. **A- Eletrólito:** $15,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; 30% de ACN; $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS e $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de β -ciclodextrina. **Condições de análise:** injeção $5 \text{ s} \times 12,5 \text{ mbar}$, $+19 \text{ kV}$, 25°C , detecção indireta em $224 (\pm 2) \text{ nm}$, capilar de TSH com 40 cm de comprimento efetivo, $75 \mu\text{m}$ d.i e $375 \mu\text{m}$ d.e. e $48,5 \text{ cm}$ de comprimento total.

Fonte: o autor.

Através dos eletroferogramas apresentados na Figura 41, observou-se que a separação do oleico e elaídico (letra A) foi obtida com resolução próxima da linha base. Entre os pares de interesse vacênico e elaídico (letra B), observou-se pela primeira vez, uma separação parcial que ainda necessita ser melhorada. Entretanto, ao observar a letra C da mesma figura, notou-se que não houve separação entre os ácidos oleico e vacênico, mostrando que os mesmos coeluem totalmente. Este fato foi evidenciado pelo eletroferograma D, onde se observou um pico intenso (oleico e vacênico coeluídos) e um terceiro pico referente ao ácido elaídico. Portanto, a separação dos homólogos de interesse, ácido vacênico e ácido elaídico, está comprometida pela presença do ácido oleico, que estará presente nas amostras reais. Logo, para obtenção da separação destes três AG, fazem-se necessárias modificações na metodologia desenvolvida até então.

Com o intuito de melhorar o perfil de separação dos ácidos oleico, vacênico e elaídico, foram realizados novos testes com diferentes eletrólitos descritos na Tabela 18.

Tabela 18: Composição dos eletrólitos usados no estudo da separação dos AG elaídico, vacênico e oleico.

Eletrólito	Composição
1	15,0 mmol L ⁻¹ de NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 9,7 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina sulfatada
2	15,0 mmol L ⁻¹ de Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 9,7 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina sulfatada
3	15,0 mmol L ⁻¹ de NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ 8,9 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina
4	15,0 mmol L ⁻¹ de Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 8,9 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina
5	15,0 mmol L ⁻¹ de Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ 10,7 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina 9,8 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina sulfatada
6	Mistura equimolar dos eletrólitos 2 e 4
7	Mistura equimolar dos eletrólitos 2 e 3

* Todos os eletrólitos são acrescidos de 30% de ACN e 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS

A Figura 42 abaixo apresenta os eletroferogramas obtidos com os eletrólitos descritos na Tabela 18. O eletroferograma do Eletrólito 1 foi omitido desta figura, uma vez que não apresentou sinal dos picos de interesse e linha base instável e com muito ruído.

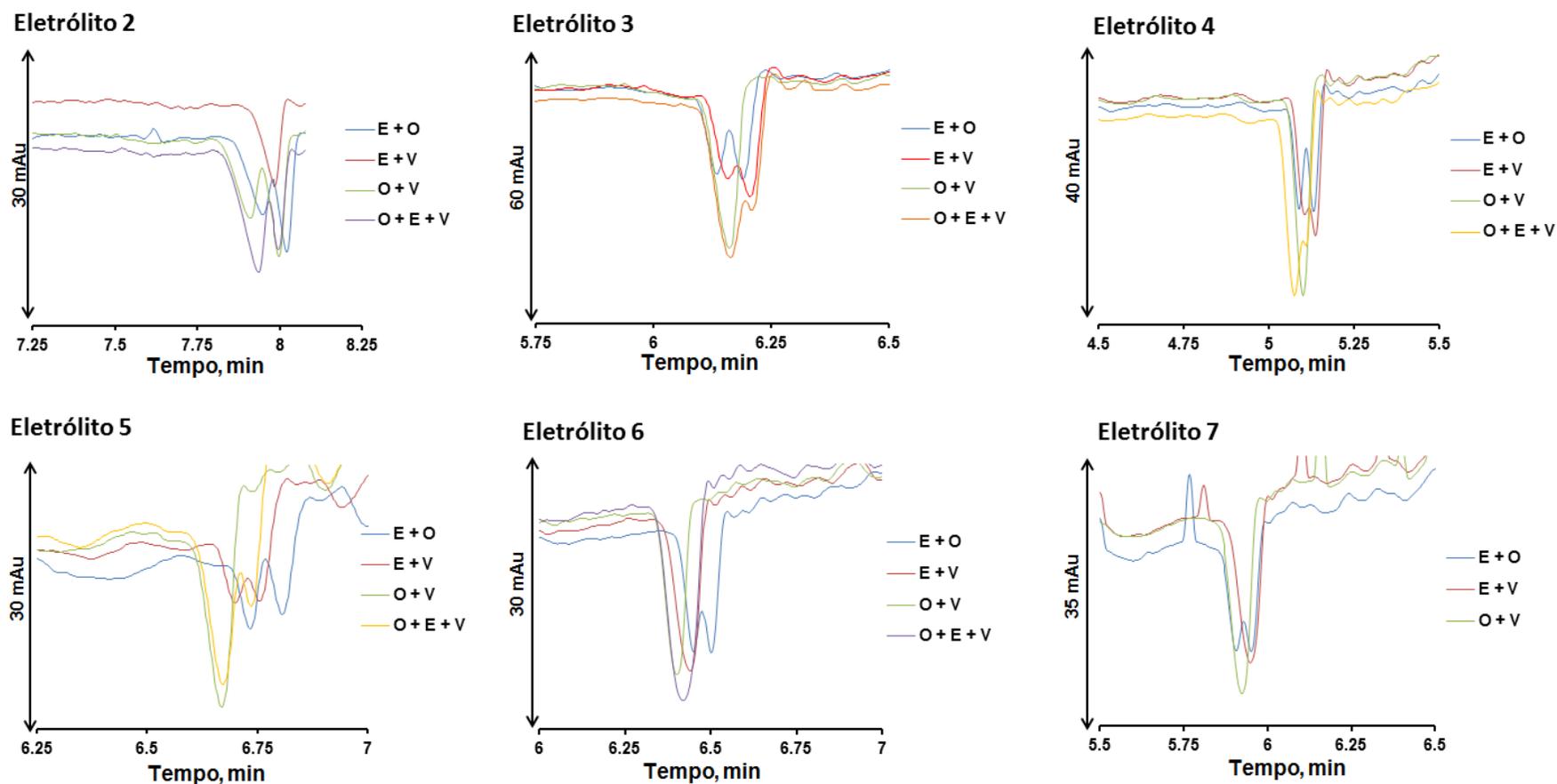


Figura 42: Electroferogramas de padrões de AG ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$) para os eletrólitos descritos na Tabela 18. **E** – Elaídico (C18:1 9t), **V** – Vacênico (C18:1 11t) e **O** – Oleico (C18:1 9c).

Condições de análise: injeção 5 s x 12,5 mbar, +19 kV, 25°C, detecção indireta em 224 (± 2) nm, capilar de TSH com 40 cm de comprimento efetivo, 75 μm d.i e 375 μm d.e. e 48,5 cm de comprimento total.

Fonte: o autor.

Com base nos eletroferogramas apresentados na Figura 42 pode-se concluir que para o Eletrólito 2 composto por **15,0 mmol L⁻¹ de Na₂CO₃/NaHCO₃; 9,7 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina sulfatada; 30% de ACN e 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS**, nota-se uma a presença de um pico (vermelho) denotando a coeluição total dos homólogos de interesse vacênico e elaídico, observa-se também que os pares vacênico/oleico (linha verde) e elaídico/oleico apresentam uma separação parcial e a mistura dos três AG apresenta apenas dois picos.

Para o Eletrólito 3 composto por **15,0 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄; 8,9 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina; 30% de ACN e 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS**, é possível observar uma separação parcial para os homólogos de interesse vacênico e elaídico (linha vermelha) e para o par de AG elaídico e oleico (linha azul). Entretanto, não houve separação para os Ag oleico e vacênico (linha verde) e, conseqüentemente, houve separação parcial para a mistura dos três AG (linha laranja).

Para o Eletrólito 4 composto por **15,0 mmol L⁻¹ de Na₂CO₃/NaHCO₃; 8,9 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina; 30% de ACN e 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS**, denota-se um perfil de separação semelhante ao encontrado para o Eletrólito 3. Entretanto, o tempo de análise dos AG para o Eletrólito 4 foi menor e os picos apresentaram um perfil mais fino.

Para o Eletrólito 5 composto por **15,0 mmol L⁻¹ de Na₂CO₃/NaHCO₃; 10,7 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina; 9,8 mmol L⁻¹ de β-ciclodextrina sulfatada; 30% de ACN e 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS**, observa-se uma separação parcial para os homólogos de interesse vacênico e elaídico (linha vermelha) e para o par de AG elaídico e oleico (linha azul). Entretanto, além dos picos apresentarem um perfil largo, não houve separação para os AG oleico e vacênico (linha verde) e, conseqüentemente, houve separação parcial para a mistura dos três AG (linha laranja).

Para o Eletrólito 6 composto por uma mistura equimolar dos eletrólitos 2 e 4, verifica-se uma separação parcial para o par de AG elaídico e oleico (linha azul) e nenhuma separação para os outros pares foi observada (um pico).

Enfim, para o eletrólito 7 composto por uma mistura equimolar do eletrólitos 2 e 3, constata-se uma separação parcial somente para o par de AG elaídico e oleico (linha azul), enquanto que para os outros pares houve apenas um pico de sinal.

Após os resultados do estudo apresentado acima, concluiu-se que não foi possível obter separação dos três AG (ácidos oleico, elaídico e vacênico) e que novos estudos deverão ser realizados com o intuito de alcançar a separação das espécies em questão.

É importante destacar a complexidade que envolve a separação destes AG, tanto por CE quanto pelo método oficial GC-FID. Cabe ressaltar que até o momento, o melhor resultado encontrado para a separação completa destes AG em amostras reais por GC-FID foi obtido por Golay *et al.* (2009), onde a separação em amostras de gordura de leite, após etapas de extração de derivatização, pôde ser obtido em uma corrida com tempo total de 245 minutos, tal tempo é excessivamente longo, fato que inviabiliza o uso da técnica para análises de rotina.

11 CONCLUSÃO

Uma investigação para a análise simultânea de AG *cis-trans* foi realizada e, através de avaliações estatística em um estudo de otimização, chegou-se a uma condição ótima para os componentes do eletrólito capaz de realizar a separação simultânea em linha base dos AG C18:0, C18:1 *9t*, C18:1 *9c*, C16:0, C18:2 *9c*, *12c*, C18:3 *9c*, *12c*, *15c* e C16:1 *9c*, consistindo de: **15,0 mmol L⁻¹ de NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ de pH 6,8; 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS; 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35; 45% v/v de ACN e 2,1% de 1-octanol.**

Após a etapa de otimização do eletrólito, a quantificação do teor de AG nos diferentes tipos de amostras foi realizada. Para isso, foi utilizado o cálculo de um fator de resposta (F_R) para cada AG utilizando C13:0 como padrão interno (PI). Após verificada a linearidade dos modelos matemáticos de quantificação propostos, a metodologia foi aplicada em amostras reais. Primeiramente, a quantificação foi realizada em amostras de requeijão, cujo intuito foi avaliar o teor de trans total, expresso em ácido elaídico - C18:1 *9t*. Posteriormente, a quantificação dos AG C18:0, C18:1 *9t*, C18:1 *9c*, C16:0, C18:2 *9c*, *12c*, C18:3 *9c*, *12c*, *15c* foi realizada em amostras de manteiga, margarina, biscoito recheado, gordura vegetal hidrogenada e azeite de oliva. Por fim, a metodologia também foi aplicada com sucesso em amostras de fígado de ratos *Wistar* após a ingestão da dieta AIN-93G, cuja fração lipídica foi composta por óleo de soja usado em processos de fritura por imersão por diferentes períodos de tempo.

A metodologia por CZE otimizada neste trabalho foi aplicada satisfatoriamente nas amostras de interesse, uma vez que os resultados obtidos foram comparados com a metodologia oficial (cromatografia à gás) recomendada pela *American Oil Chemist's Society* (AOCS) e, nenhuma evidência de diferença significativa entre as duas metodologias foi observada dentro do intervalo de 95% e/ou 99% de confiança. Além dos resultados compatíveis com a metodologia oficial, o método por CZE apresentou outras vantagens consideráveis como: rápido preparo das amostras (ausência de etapas de extração e derivatização), uso de baixo volume de solventes e amostras, uso de colunas capilares não específicas além da alta frequência analítica.

A interpretação dos resultados das análises do teor de AG majoritários nas amostras de fígado mostraram uma diminuição de aproximadamente 21% no teor de AG poli-insaturados nos animais do grupo final em relação aos animais do grupo controle. Logo, pode-se concluir que esta diminuição se deve pela relação dose dependente dos AG essenciais, ou seja, sendo diminuída a oferta na dieta, a deposição no tecido também diminui, embora não

proporcionalmente. Através da análise do gráfico de *Scores* da PCA dos eletroferogramas obtidos para as amostras de fígado, observou-se que o grupo final permaneceu realmente separado, em comparação com os outros grupos (grupos de controle e intermediários), ou seja, os resultados indicam que o grupo final pode ser considerado um grupo de risco, com mais predisposição para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares.

Além disso, foi observado também, um aumento nos níveis de colesterol total e de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e diminuição do nível de lipoproteína de alta densidade (HDL) nos animais do grupo final em relação ao grupo controle. Alterações hepáticas também foram observadas através de avaliação de lâminas histológicas, onde o grupo final apresentou acúmulos intracitoplasmáticos em toda a extensão do lóbulo hepático, enquanto que o grupo controle apresentou características compatíveis com a normalidade. Desse modo, nota-se que a relação entre a qualidade da alimentação e o impacto sobre o estado nutricional dos animais em relação às lipoproteínas foi confirmada. Em suma, pode-se dizer que a qualidade da dieta caracterizada pelo perfil de AG confirma a sua relação com as alterações bioquímicas, isto é, alteração do colesterol total e frações dada pela diminuição no consumo de AG essenciais (C18:2cc e C18:3ccc) e aumento do consumo de AGS oriundos do óleo de fritura do grupo final. Estes resultados corroboram com dados da literatura que mostram que a esteatose hepática, associada com níveis elevados de AGS e baixos níveis de AGI na dieta foi caracterizada por um aumento da lesão do fígado.

Com intuito de verificar os possíveis biomarcadores e considerando a importância destes elementos para o metabolismo celular, sendo que alguns atuam como cofatores para a atividade enzimática, alguns minerais foram determinados em amostras de fígado e fêmur de ratos *Wistar* pela técnica de ICP OES. Observou-se que o teor de selênio encontrado no fígado dos animais do grupo final foi 41% menor que o valor encontrado para o grupo controle. Tal redução pode estar relacionada com a diminuição da função antioxidante, causando um aumento do estresse oxidativo das estruturas celulares. Entretanto, ainda há um longo caminho a ser percorrido, que passa necessariamente pelo conhecimento detalhado da biodisponibilidade de certos minerais e de suas interfaces, além da variabilidade de interações e respostas apresentadas pelos diversos tipos celulares, que compõem sistemas de interação com os minerais.

Por fim, em relação aos estudos envolvendo a separação dos AG oleico, vacênico e láurico, concluiu-se que ainda não foi possível a obter a separação total destes AG e novos estudos (testes com diferentes eletrólitos) deverão ser realizados com o intuito de alcançar a separação desejada das espécies em questão.

12 REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, T. G. *et al.* Trends in the analytical methods for the determination of trans fatty acids content in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22 p. 543-560, 2011.

ANVISA. **REGULAMENTO TÉCNICO MERCOSUL DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE REQUEJÃO OU REQUESÓN**. MERCOSUR/GMC/RES. Nº 82/96 1996.

ANVISA. **RDC 359 - Regulamento técnico de porções de alimentos embalados para fins de rotulagem nutricional**. BRASIL: Diário Oficial Uniao. 2003.

ANVISA. **REGULAMENTO TÉCNICO PARA ROTULAGEM DE PRODUTO DE ORIGEM ANIMAL EMBALADO**. 22/2005 2005.

AOCS. **Determination of cis- and trans- Fatty Acids in Hydrogenated and Refined Oils and Fats by Capillary GLC. AOCS Official Method Ce 1f-96 (Reapproved 1997 and revised 2002)**. AOCS Official Methods and Recommended Practices 2002-2003. FIRESTONE, D. Champaign, IL.: AOCS Press 1996.

AOCS. **Official method Cd 14d-99**. Official methods and recommended practices. FIRESTONE, D. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society 1999.

AOCS. **Official Method Ce1j-07**. Official methods and recommended practices of the AOCS. Additions and revisions 2007-2008. Champaign, IL: AOCS Press 2008.

ARROYO, R. *et al.* High-performance size-exclusion chromatographic studies on polar components formed in sunflower oil used for frying. **Journal of American Oil Chemist Society**, v. 69, p. 557, 1992.

ASCHERIO, A. *et al.* Trans-fatty acids intake and risk of myocardial infarction. **Circulation**, v. 89, p. 94-101, 1994.

ATKINSON, A. C.; DONEV, A. N. **Optimum experimental designs**. Oxford: Clarendon Press, 1992.

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis**. New York: Wiley-Interscience, 1995.

BALESTEROS, M. R.; FARIA, A. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Determination of Losartan associated with chlorthalidone or hydrochlorothiazide in capsules by capillary zone electrophoresis. **Journal of Brazilian Chemist Society**, v. 18, n. 3, p. 554-558, 2007.

BALESTEROS, M. R. *et al.* Determination of olive oil acidity by CE. **Electrophoresis**, v. 28, p. 3731-3736, 2007.

BANSAL, G. *et al.* Analysis of trans fatty acids in deep frying oils by three different approaches. **Food Chemistry**, v. 116, p. 535-541, 2009.

BARRA, P. M. C. *et al.* A rapid method for monitoring total trans fatty acids (TTFA) during industrial manufacturing of Brazilian spreadable processed cheese by capillary zone electrophoresis. **Food Control** v. 23, p. 456-461, 2012.

BARRA, P. M. C. *et al.* An alternative method for rapid quantitative analysis of majority cis-trans fatty acids by CZE. **Food Research International** v. 52, p. 33-41, 2013.

BLIGH, E.; DYER, W. Rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BOHLIN, M. E. *et al.* Separation of conjugated trienoic fatty acid isomers by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 471-478, 2003.

BOORN, A. W.; BROWNER, R. F. Applications: organics. In: BOUMANS, P. W. J. M. (Ed.). **Inductively coupled plasma emission spectrometry. Part II. Applications and Fundamentals**. New York: Wiley Interscience, 1987.

BOURRE, J. M. *et al.* The effect of dietary α -linolenic acid on the composition of nerve membranes, enzymatic activity, amplitude of electrophysiological parameters, resistance to poisons and performance of learning tasks in rats. **Journal of Nutrition**, v. 119, p. 1880-1892, 1989.

BOX, G. E. P.; WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B** v. 13, p. 1-45, 1951.

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

CASTRO, P. M. *et al.* Total Trans Fatty Acid Analysis in Spreadable Cheese by Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 1403-1409, 2010.

CASTRO, R. J. C. *et al.* Analysis of the main conjugated linoleic acid (CLA) precursor (C18:2 n-6 and C18:3 n-3) in *Brachiaria Ruzizienses* by capillary zone electrophoresis. **Central European Journal of Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 286-296, 2013.

CHATJIGAKIS, A. K.; DONZÉ, C.; COLEMAN, A. W. Solubility Behavior of beta-Cyclodextrin In WaterKosolvent Mixtures. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 1632-1634, 1992.

CHOE, E.; MIN, D. B. Chemistry of deep-Fat Frying Oils. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 5, p. 77-85, 2007.

CHRISTIE, W. W. Silver ion chromatography using solid-phase extraction columns packed with a bonded-sulfonic acid phase. **Journal of Lipids Research**, v. 30, p. 1471-1473, 1989.

COLLET, J.; GAREIL, P. Micellar electrokinetic chromatography of long chain saturated and unsaturated free fatty acids with neutral micelles - Considerations regarding selectivity and resolution optimization **Journal of Chromatography A**, v. 792, n. 1-2, p. 165-177, 1997.

CUNHA, C. R.; DIAS, A. I.; VIOTTO, W. H. Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of spreadable processed cheese analogue made with vegetable fat. **Food Research International**, v. 43, p. 723-729, 2010.

DAMYANOVA, B. *et al.* Computational probes into the conceptual basis of silver ion chromatography: I. Silver(I) ion complexes of unsaturated fatty acids and esters. **Journal of Molecular Structure (THEOCHEM)**, v. 589-590, p. 239-249, 2002.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry Part 1: Fundamentals and Single Component Calibration **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 993-1014, 1998.

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

DELMONTE, P. *et al.* Improved identification of conjugated linoleic acid isomers using silver-ion HPLC separations **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 2, p. 563-568, 2004.

DESTAILLATS, F. *et al.* Novel Sample Extraction and Chromatographic Techniques in Environmental Analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1145, p. 222-228, 2007.

DOBSON, G.; CHRISTIE, W. W.; NIKOLOVA-DAMYANOVA, B. Silver ion chromatography of lipids and fatty acids. **Journal of Chromatography B**, v. 671 p. 197-222, 1995.

DRANGE, E.; LUNDANES, E. Determination of long-chained fatty acids using non-aqueous capillary electrophoresis and indirect UV detection. **Journal of Chromatography A**, v. 771, p. 301-309, 1997.

ERKKILA, A. *et al.* Dietary fatty acids and cardiovascular disease: an epidemiological approach. **PubMed**, v. 47, p. 172-187, 2008.

FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Bioavailability of selenium. **European Journal of Clinical Nutritional**, v. 244, n. 1, p. S20-S23, 1997.

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

GAREIL, P.; COLLET, J. Capillary zone electrophoresis separation of C14-C18 linear saturated and unsaturated free fatty acids with indirect detection. **Journal of Capillary Electrophoresis**, v. 3, p. 77-82, 1996.

GEBAUER, S. K. *et al.* Effects of Ruminant trans Fatty Acids on Cardiovascular Disease and Cancer: A Comprehensive Review of Epidemiological, Clinical, and Mechanistic Studies. **Advances in nutrition**, v. 2, p. 332-354, 2011.

GOLAY, P. A. *et al.* Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on trans fatty acid content. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1115-1120, 2006.

GOLAY, P. A. *et al.* 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**, v. 92, n. 5, p. 1301-1309, 2009.

GRAZIOLA, F.; SOLIS, V. S.; CURI, R. Estrutura Química e Classificação dos Ácidos Graxos. In: CURI, R.; POMPEIA, C., *et al.* (Ed.). **Entendendo a Gordura - Os ácidos graxos**. São Paulo: Manole, 2002. cap. 2, p.7-23.

HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid Extraction of Tissues with a Low-Toxicity Solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, p. 420-426, 1978.

HARTMAN, L.; LAGO, R. A. C. Rapid preparation of fatty methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475-497, 1973.

HENRIQUES, G. S. *et al.* Biomarcadores para micronutrientes. In: COZZOLINO, S. M. F. (Ed.). **Biodisponibilidade de Nutrientes**. Baueri: Manole, 2012.

HUANG, Z.; WANG, B.; CRENSHAW, A. A. A simple method for the analysis of trans fatty acid with GC-MS and ATTM-Silar-90 capillary column. **Food Chemistry** v. 98 p. 593-598, 2006.

IUPAC-IUB. Nomenclature of Lipids. Recommendations 1976. World Wide Web version, prepared by G.P. **Commission on Biochemical Nomenclature (CBN)**, p. Disponível: <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/lipid/>. Acesso em: 07 jan. 2009., 1976.

JAKOBSEN, M. U. *et al.* Intake of ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease. **International Journal of Epidemiology**, v. 37, p. 173-182, 2008.

JOLLIFE, I. T. **Principal Component Analysis**. 2nd. New York: Springer, 2002.

JR, D. L. G.; JOHNSON, M. E. Nonaqueous Capillary Electrophoresis of Fatty Acids Derivatized with a Near-Infrared Fluorophore. **Analytical Chemistry** v. 72, p. 2080-2086, 2000.

KASCHE, V. *et al.* Ca²⁺ is a cofactor required for membrane transport and maturation and is a yield-determining factor in high cell density penicillin amidase production **Biotechnology Progress**, v. 21, n. 2, p. 432-438, 2005.

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

KRINKE, G. J.; BULLOCK, G. R.; BUNTON, T. **The laboratory rat** Waltham, Massachusetts: Academic Press, 2000.

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

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**, v. 84, p. 138-153, 2007.

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

LOTTENBERG, A. M. P. Importance of the dietary fat on the prevention and control of metabolic disturbances and cardiovascular disease. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, p. 595-567, 2009.

LUTZ, Instituto Adolfo. **Métodos Físico-Químicos Para Análise De Alimentos**. 4th ed. Brasília,: Instituto Adolfo Lutz, 2005.

MASSART, D. L. *et al.* **Handbook of chemometrics and qualimetrics: part A**. Amsterdam: Elsevier, 1997.

MATTHIESSEN, L.; LUCARONI, B.; SACHEZ, E. Towards responsible animal research. **EMBO Journal**, v. 4, n. 2, p. 104-107, 2003.

METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 514-515, 1966.

MICHAEL, I. G.; HARWOOD, J. L.; FRAYN, K. N. **Lipid Biochemistry**. 5th. United Kingdom: Blackwell Science Ltd, a Blackwell Publishing Company, 2002.

MILLER, J. M.; MCNAIR, H. M. **Basic Gas Chromatography**. 2nd. New Jersey: Wiley-Interscience, 2009.

MONTASER, A.; FASSEL, V. A. Inductively coupled plasma as atomization cells for atomic fluorescence spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 48, p. 1490-1499, 1976.

MONTASSER, A.; GOLIGHTLY, D. **Inductively Coupled Plasma in Analytical Atomic Spectrometry**. 2 nd. New York: Wiley, 1992.

MONTEGOMERY, D. C. **Introduction to statistical quality control**. New York: Wiley, 1997.

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Organic Chemistry**. 6th Edition Upper Saddle River, New Jersey Prentice Hall, 1992.

MOSSOBA, M. M. *et al.* Determination of total trans fats and oils by infrared spectroscopy for regulatory compliance. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 87-92, 2007.

MOZAFFARIAN, D.; ARO, A.; WILLET, W. C. Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. **European Journal of Clinical Nutrional**, v. 63, p. S5-S21, 2009.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 3rd edição. Campinas: Unicamp, 2007.

NISHIDA, C. *et al.* The Joint WHO/FAO Expert Consultation on diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: process, product and policy implications. **Public Health Nutrition**, n. 7, p. 245-250, 2004.

OLIVEIRA, M. A. L. *et al.* Analysis of fatty acids by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Química Nova**, v. 26, n. 6, p. 821-824, 2003 (a).

OLIVEIRA, M. A. L. *et al.* Factorial design of electrolyte systems for the separation of fatty acids by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 924, p. 533-539, 2001.

OLIVEIRA, M. A. L. *et al.* Method development for the analysis of trans fatty acids in hydrogenated oils by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, p. 1641-1647, 2003 (b).

PHARR, D. Y. *et al.* Solubilization of cyclodextrins for analytical applications. **Analytical Chemistry**, v. 61, p. 275-279, 1989.

PORTO, B. S. L.; SOUZA, M. V. N.; OLIVEIRA, M. A. L. Analysis of omega 3 fatty acid in natural and enriched chicken eggs by capillary zone electrophoresis. **Analytical Sciences**, v. 27, p. 541-546, 2011.

PROENÇA, R. P. D. C.; SILVEIRA, B. M. Intake recommendations and labeling of trans fat in processed foods in Brazil: analysis of official documents. **Revista de Saúde Pública**, v. 46, n. 5, p. 923-928, 2012.

PURCHASE, I. F. H. Ethical issues for bioscientists in the new millenium. **Toxicol Letters**, v. 127, n. 3, p. 307-313, 2002.

RATNAYAKE, W. M. N. *et al.* Temperature-sensitive resolution of cis- and trans-fatty acid isomers of partially hydrogenated vegetable oils on SP-2560 and CP-Sil 88 capillary columns. **Journal of AOAC international**, v. 85, p. 1112-1118, 2002.

REED, T. Induction-coupled plasma Torch. . **Journal of Applied Physics**, v. 32, p. 821-824, 1961.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR., G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents; final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee and the reformulation of the AIN-76 rodent diet. **Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

REZENDE, A. H.; PELUZIO, M. D. C. G.; SABARENSE, C. M. Animal experimentation: ethics and the Brazilian legislation **Revista de Nutrição**, v. 21, n. 2, p. 237-242, 2008.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 31, p. 986-1000, 2011.

RICHTER, E. K. *et al.* Trans fatty acid content of selected Swiss foods: the TransSwissPilot study. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 479-484, 2009.

SABARENSE, C. M.; FILHO, J. M. Effect of the partially hydrogenated vegetable fat on the incorporation of trans fatty acids in rat tissues. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 16, n. 4, p. 399-407, 2003.

SANIBAL, A. A. E.; FILHO, J. M. Perfil de ácidos graxos trans de óleo e gordura hidrogenada de soja no processo de fritura. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 24, p. 27-31, 2004.

SANMARTIN, C. *et al.* Selenium and Clinical Trials: New Therapeutic Evidence for Multiple Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 30, p. 4635-4650, 2011.

BRASIL, Ministério das Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável (Série A. Normas e Manuais Técnicos). BÁSICA., D. D. A.:** Ministério da Saúde 2005.

SEBEDIO, J. L.; RATNAYAKE, W. M. **Analysis of trans mono- and polyunsaturated fatty acids. In Trans Fatty Acids.** Oxford: Blackwell Publishing, 2008. 102-131.

SHEPPARD, A. J. Suitability of lipid extraction procedures for gas-liquid chromatography **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 40, p. 545-548, 1963.

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**, v. 68, p. 643-645, 2006.

SILVA, H. **Complexos de Platina com Diaminas N-alkiladas de Cadeia Longa: Síntese, Inclusão em Lipossomas, Atividade Citotóxica, Antitumoral e Estudos Farmacocinéticos.** 2009. doutorado (Doutor). Departamento de Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. L.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental.** Porto Alegre: Bookman Companhia 2009.

STENDER, S.; ASTRUP, A.; DYERBERG, J. Ruminant and industrially produced trans fatty acids: health aspects. **Food & Nutrition Research**, v. 52, 2008.

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**, v. 86, p. 929-937, 2008.

SUROWIEC, I.; KAMLA, 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**, v. 1024, p. 245-254, 2004.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

THOMSON, C. D. Selenium: Its role in health and disease. **Asian Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 25-30, 2006.

THUNG, S. N.; GERBER, M. A. **Histology for Patologist**. New York: Raven Press, 1992. 625-637.

UINT, L. *et al.* Avaliação do Efluxo de Colesterol Mediado pela HDL Isolada de Pacientes com Baixos Níveis Plasmáticos de HDL e Doença Arterial Coronariana. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 8, n. 1, p. 35-38, 2003.

ULBRICHT, T. L. V.; SOUTHGATE, D. A. T. Coronary heart disease: seven dietary factors,. **Lancet** v. 338, p. 985-992, 1991.

WANG, D.; WEI, Y. R.; PAGLIASSOTTI, M. J. saturated fatty acids promote endoplasmic reticulum stress and liver injury in rats with hepatic steatosis. **Endocrinology**, v. 147, p. 943-951, 2006.

WANG, T.; WEI, H.; LIZ, S. F. Y. Nonaqueous capillary zone electrophoresis for separation of free fatty acids with indirect fluorescence detection. **Electrophoresis** v. 19, p. 2181-2192, 1998.

WENDT, R. H.; FASSEL, V. A. Induction-coupled plasma spectrometric excitation source. **Analytical Chemistry**, v. 37, p. 920-922, 1965.

WHO, W. H. O. WHO and FAO Joint Consultation: fats and oils in human nutrition. **Nutrition Reviews**, v. 53, n. 7, p. 202-205, 1995.

WOLFENSOHN, S.; LLOYD, S. Anesthesia of Laboratory Animal. In: (Ed.). **Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare**. Oxford: Blackwell Publisher, 2003.

ZUKOWSKI, J.; SYBILSKA, D.; JURCZAK, J. Resolution of ortho, meta, and para isomers of some disubstituted benzene derivatives via alpha and beta cyclodextrin inclusion complexes, using reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 57, p. 2215-2219, 1985.

Apêndice - Produção Científica

1. Artigo publicado na *Food Control*

Barra, M. M., Azevedo, M. S., Fett, R., Micke, G. A., Costa, A. C. O., Oliveira, M A. L. *A rapid method for monitoring total trans fatty acids (TTFA) during industrial manufacturing of Brazilian spreadable processed cheese by capillary zone electrophoresis*. 23 (2012) 456-461.

2. Capítulo de livro a convite da King's College London

Barra, P. M. C., De Oliveira, Marcone Augusto Leal ; Barra, M . *Total trans fatty acid in spreadable cheese*. p. 453-466. **Handbook of Cheese in Health: Production, Nutrition and Medical Sciences**. In: Victor R. Preedy; Ronald Ross Watson and Vinood B. Patel. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2013.

3. Artigo publicado na *Food Research International*

Barra, P. M. C., Castro, R. J. C., Oliveira, P. L., Aued-Pimentel, S., Silva, S.A., Oliveira, M A. L. *A rapid method for quantitative analysis of usual cis-trans long fatty acids by capillary zone electrophoresis*. 52 (2013) 33–41.

4. Artigo publicado na *Química Nova*

Barra, P. M. C., Nery-Enes, B., Cardoso, L. M., Cesário, C. C., Moreira, A. V. B., Pinheiro-Sant'Ana, H. M., Peluzio, M. C. G., Oliveira, M A. L. *Simultaneous analysis of saturated and unsaturated fatty acids in pequi by capillary electrophoresis*. 36, 9, (2013) 1430-1433.

5. Capítulo de livro a convite da Nova Science Publishers, Inc.

Barra P.M. C., Castro, R. J. C., Oliveira, M. A. L., Pereira, J. P. F., Silva, P. H. F. *Analysis of Fatty Acids in Cheese by Capillary Electrophoresis*. In: Henrique Castelli; Luiz du Vale. (Org.). **Handbook on Cheese: Production, Chemistry and Sensory Properties**. New York: Nova Science Publishers, 2013.

6. Artigo publicado no *Journal of the Brazilian Chemical Society*.

Barra, P. M. C., Oliveira, P. L., Aragão, D. M. O., Sabarense, C. M., Aarestrup, B. J. V., Azevedo, M. S., Costa, A. C., Micke, G. A., Oliveira, M. A. L. *Study of fatty acids profile in biological sample by capillary zone electrophoresis associate to chemometric approach*. (2013).

7. Artigo em confecção para ser submetido à *Journal of Food Research*

Lopes, P., Barra, P. M. C., Stephani, R., Oliveira, M. A. L. *Rapid cis-trans fatty acids analysis in "manteiga de garrafa" by capillary electrophoresis*.

8. Artigo em confecção para ser submetido à *Clinica Chimica Acta*

Barra, P. M. C., Sabarense, C. M., Oliveira, M. A. L Sousa, R. A. *Possible correlations between the contents of fatty acids and metals in Wistar tissues*.

9. Artigo de revisão em ácidos graxos submetido à revista *Molecules*

Oliveira, M. A. L., Porto, B. L. S., Faria, I. D. L., Oliveira, P. L., Barra, P. M. C., Castro, R. J. C. and Sato, R. T. *Review: Fatty acids analysis by capillary electrophoresis.*

10. Colaboração no trabalho publicado na *Central European Journal of Chemistry (Print)*

Castro, R. J. C., Souza Sobrinho, F., Gama, M. A. S., Barra, P. M. C., Antoniassi, R., Oliveira, M. A. L. *Analysis of the main conjugated linoleic acid (CLA) precursors (C18:2 n-6 and C18:3 n-3) in Brachiaria ruzizienses by capillary zone electrophoresis.* 11 (2013) 1286-1296.

11. Colaboração no trabalho publicado pela *Phytochemical Analysis*

Sato, R. T., Castro, R. J. C., Barra, P. M. C., Oliveira, M. A. L. *Rapid separation of free fatty acids (FFA) in vegetable oils by capillary zone electrophoresis (CZE).* (2014).

12. Colaboração no trabalho publicado pela *Analytical Methods*

Costa, F. F., Brito, M. A. V. P., Furtado, M. A. M., Martins, M. F., Oliveira, M. A. L., Barra, P. M. C., Amigo, L., Santos, A. S. O. *Microfluidic chip electrophoresis investigation of major milk proteins: study of buffers effects and quantitative approaching.* (2014).

Anexo - Protocolo Comitê de Ética em Experimentação Animal – UFJF



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

Protocolo nº: 032/2011

Coordenador (a): Marcone Augusto Leal de Oliveira e Céphora Maria Sabarense

Seu protocolo nº 032/2011, intitulado "**Determinação de ácidos graxos em óleos de fritura por imersão e em tecidos biológicos de roedores, com ênfase na separação dos homólogos eláidico e vacênico, utilizando eletroforese capilar**" recebido em 23/05/2011, foi avaliado na reunião de 07/06/2011, Recebendo o seguinte parecer:

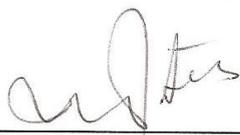
Com pendências Reprovado

O presente protocolo se encontra com pendências, favor:

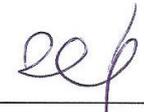
- Adequar a espécie do animal e a linhagem descrita.
- Citar a dose do anestésico que está sendo referenciada.

Comitê de Ética em Experimentação Animal

Juiz de Fora, 08 de junho de 2011.



Presidente/CEEA



Secretário/CEEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Nutrição
depto.nutricao@ufjf.edu.br

Em 15 de junho de 2011.

Da: Prof^a. Dr^a. Céphora Maria Sabarense
Professora Departamento de Nutrição/ICB

Assunto:
Protocolo n^o 032/2011 – pendências

Para:
Presidente da
Comissão de Ética na Experimentação Animal

Prezada Senhora,

Em resposta ao parecer desta Comissão referente ao protocolo 032/2011, projeto intitulado "Determinação de ácidos graxos em óleos de fritura por imersão e em tecidos biológicos de roedores, com ênfase na separação dos homólogos elaidico e vacênico, utilizando eletroforese capilar" apresentamos as pendências e suas respectivas justificativas:

1 – Adequar a espécie do animal e a linhagem descrita –
Serão utilizados ratos machos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus* L. Berkenhout, 1769).

2 – Citar a dose do anestésico que está sendo referenciada –

O protocolo anestésico utilizado será a associação de xilazina na dose de 10mg/kg e quetamina na dose de 90mg/kg, aplicados por via intraperitoneal de acordo com Wolfensohn; Lloyd (2003).

Referência: Wolfensohn S, Lloyd M. Anesthesia of laboratory animals. In: Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare. 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2003. p. 107-37.

Atenciosamente,


Prof^a. Dr^a. Céphora Maria Sabarense

*Recebido
5/6/2011*