

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Tatiane Lima Amorim**

**Metodologias para determinação de ácidos graxos em alimentos por técnicas  
cromatográficas, eletroforéticas e espectroscópicas**

Juiz de Fora  
2020

**Tatiane Lima Amorim**

**Metodologias para determinação de ácidos graxos em alimentos por técnicas cromatográficas, eletroforéticas e espectroscópicas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Coorientadora: Dra. Pilar Gómez Cortés

Juiz de Fora

2020

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

Amorim, Tatiane Lima.

Metodologias para determinação de ácidos graxos em alimentos por técnicas cromatográficas, eletroforéticas e espectroscópicas / Tatiane Lima Amorim. -- 2020.

131 p.

Orientador: Marccone Augusto Leal de Oliveira

Coorientadora: Pilar Gómez Cortés

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2020.

1. Ácidos Graxos. 2. Alimentos. 3. Cromatografia. 4. Eletroforese Capilar. 5. Espectroscopia. I. de Oliveira, Marccone Augusto Leal, orient. II. Cortés, Pilar Gómez, coorient. III. Título.

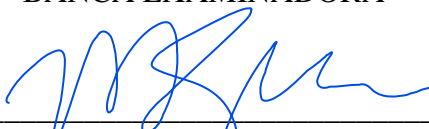
**Tatiane Lima Amorim**

**Metodologias para determinação de ácidos graxos em alimentos por técnicas cromatográficas, eletroforéticas e espectroscópicas**

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

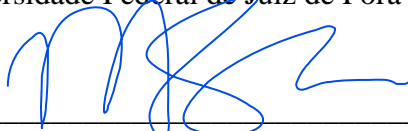
Aprovada em 16 de outubro de 2020.

**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora



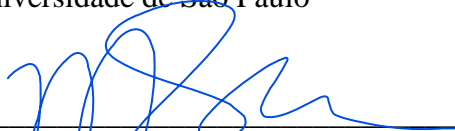
Profa. Dra. Pilar Gómez Cortés - Coorientadora

Consejo Superior de Investigaciones Científicas



Prof. Dr. Emanuel Carrilho

Universidade de São Paulo



Profa. Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa

Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Rafael Arromba de Sousa

Universidade Federal de Juiz de Fora



Profa. Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dedico esta tese à minha família, meu alicerce maior, e a todos que com ela colaboraram.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Marcone Augusto Leal de Oliveira, por me acolher em seu grupo de pesquisas, por todo suporte prestado para realização deste trabalho, pela motivação e pela amizade.

Ao Miguel Angel de la Fuente e a minha coorientadora Pilar Gómez Cortés, bem como aos colegas de laboratório do *Grupo de Lípidos*, pela recepção e aceitação em seu grupo de pesquisas durante o doutorado no exterior, por toda a orientação e colaboração com esta tese e pelos momentos de turismo e descontração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de doutorado concedida e pela oportunidade de intercâmbio em Madrid/Espanha, através do programa de doutorado sanduiche no exterior, referência 88881187078/2018-01, no *Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación*, instituto misto pertencente ao *Consejo Superior de Investigaciones Científicas e Universidad Autónoma de Madrid*.

Aos professores do departamento de química da Universidade Federal de Juiz de Fora por contribuir em minha formação, e aos que contribuíram com os artigos resultantes desta tese, bem como ao programa de pós-graduação em química da Universidade Federal de Juiz de Fora, por todo suporte prestado e pelo apoio financeiro para participação em congressos.

Aos colegas do Grupo de Química Analítica e Quimiometria e do departamento de química da Universidade Federal de Juiz de Fora pelos momentos de descontração e ensinamentos, bem como pela colaboração com esta tese e com os artigos resultantes, especialmente aos grandes amigos Lucas M. Duarte e a Leandra N. O. Neves, pela parceria e amizade.

Aos professores avaliadores de minha banca de qualificação e defesa pela disponibilidade em contribuir com este trabalho.

Às secretárias da pós-graduação do departamento de química, Maristela Meller e Mariana Marta, pela disponibilidade e eficiência no atendimento as minhas demandas.

Ao professor Keyler Borges, à discente Flávia Dutra e aos membros do Laboratório de Separações da Universidade Federal de São João Del Rei, pela hospitalidade e cooperação com esta tese.

Aos projetos do Programa Nacional de Pós Doutorado, referência 23071022702/2018-43, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, referências 303355/2017-4 e 424032/2018-0, do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de

Bioanalítica, referências 2014/50867-3 e 465389/2014-7, da FINEP-CT-INFRA, referência 01/2013-REF 0633/13 e da Rede Mineira de Química, referência CEX.RED-00010-14, pelo financiamento de todo material necessário para realização de experimentos e manutenção dos equipamentos do laboratório do Grupo de Química Analítica e Quimiometria.

Ao projeto *alternativas de empleo de suplementos ricos en ácidos grasos omega-3 y antioxidantes en raciones de ganado ovino sobre la mejora del perfil lipídico y calidad de leche y carne*, referência AGL2016-75159-C2-2-R, financiado por *Ministerio de Economía y Competitividad de España*, que contribuiu para cobrir os gastos de laboratório durante meu período de doutorado no exterior.

Enfim, agradeço a toda minha família, por ser meu bem mais precioso e meu apoio em todas as horas. Meus agradecimentos especiais a meus pais Leuma e Pedro, por terem me dado a vida, pelo suporte e ensinamentos, a meu irmão Tiago, por toda a dedicação em me ajudar sempre, e a meu companheiro Álisson, o maior presente que o doutorado me deu, por me entender, me motivar e estar comigo em todos momentos. Amo muito todos vocês!

“One, remember to look up at the stars and not down at your feet. Two, never give up work. Work gives you meaning and purpose and life is empty without it. Three, if you are lucky enough to find love, remember it is there and don't throw it away.” (STEPHEN HAWKING)



## RESUMO

A adição de gordura vegetal hidrogenada aos alimentos tem sido restrita mundialmente, devido aos malefícios que os ácidos graxos *trans* (AGT) de origem industrial podem causar a saúde humana. O desenvolvimento de novos métodos analíticos é necessário para atender aos requisitos legais e metodologias rápidas para determinação de AGT em alimentos foram o foco desta tese. Um método para quantificar AGT totais do ácido octadecenóico em alimentos foi otimizado inicialmente, empregando-se Eletroforese Capilar de zona com Detecção Direta por Absorção na Região do Ultravioleta. Estudou-se os parâmetros instrumentais ótimos para a análise utilizando um eletrólito já descrito na literatura para detecção direta, através de uma avaliação univariada do comprimento do capilar, e de um planejamento fatorial  $3^2$ , tendo como fatores tensão e temperatura. O preparo das amostras foi então investigado, e compreendeu apenas hidrólise alcalina dos triacilgliceróis. A validação do método desenvolvido consistiu na avaliação da linearidade, especificidade, precisão, exatidão, robustez, e dos limites de detecção e quantificação. Desvios-padrão relativos  $\leq 5,72\%$  foram obtidos para precisão instrumental considerando-se área do pico, altura do pico e tempo de migração, na injeção de padrões em quadruplicata. Os limites de detecção e quantificação calculados foram de 0,17 e 0,54 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Ademais, não foram evidenciadas diferenças significativas num intervalo de 95% de confiança quando os métodos por Eletroforese Capilar e Cromatografia Gasosa foram comparados para a determinação de AGT totais do ácido octadecenóico em diferentes amostras. Dentre os métodos disponíveis na literatura para quantificação de AGT totais do ácido octadecenóico empregando-se Eletroforese Capilar, este é o que fornece um resultado mais rápido até o momento, com tempo de análise menor que 4 minutos. Um novo método para a separação de AGT isoméricos posicionais do ácido octadecenóico majoritários em alimentos de ocorrência natural e industrial (ácido vacênico e ácido elaídico) também foi desenvolvido, usando Eletroforese Capilar de Zona Modificada por Ciclodextrinas e Detecção Direta por Absorção na Região do Ultravioleta. O eletrólito foi otimizado univariadamente para esta separação inédita e os parâmetros tensão e temperatura foram estudados através de um planejamento fatorial  $2^2$ . O preparo de amostras foi avaliado para requeijões, e apenas hidrólise alcalina dos triacilgliceróis foi empregada no preparo desta matriz. O tempo de corrida foi menor que 25 min e o limite de detecção estimado para os ácidos elaídico e vacênico foi de 0,02 mmol L<sup>-1</sup>. Ademais, o mecanismo desta separação foi investigado através de modelagem molecular. Esta abordagem possui potencial aplicação na discriminação de isômeros de AGT

majoritários de origem natural e industrial em alimentos, o que é exigido em legislações de vários países. Por fim, outros métodos para determinação de ácidos graxos em matrizes alimentícias foram avaliados, empregando-se técnicas cromatográficas (Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama e Espectrometria de Massas, bem como Cromatografia em Camada Delgada) e espectroscópicas (Infravermelho, Raman e Ressonância Magnética Nuclear) associadas a ferramentas quimiométricas, complementarmente a Eletroforese Capilar, e foram brevemente discutidas ao final desta tese.

Palavras-chave: Ácidos Graxos. Alimentos. Cromatografia. Eletroforese Capilar. Espectroscopia.

## ABSTRACT

The addition of hydrogenated vegetable oils to food has been restricted worldwide due to the harmful effects that industrial *trans* fatty acids (TFA) can cause to human health. The development of new analytical methods is needed to attend legal requirements, and fast methodologies for TFA determination in foods were the focus of this thesis. Initially, a method for the determination of total TFA of octadecenoic acid in foods was optimized through Capillary Zone Electrophoresis with Direct Absorption Detection within the Ultraviolet Region. Optimum instrumental parameters were studied by using a background electrolyte previously described in the literature to direct detection, through an univariate evaluation of capillary length and a  $3^2$  factorial design having voltage and temperature as factors. Sample preparation was then studied, and comprised only alkaline hydrolysis of triacylglycerols. The validation of the developed method comprised the evaluation of linearity, specificity, precision, accuracy, robustness, and limits of detection and quantification. Relative standard deviation  $\leq 5,72$  % were obtained for instrumental precision when considering peak area, peak height and migration time, in a quadruplicate injection of standards. The calculated detection and quantification limits were 0,17 and 0,54 mmol L<sup>-1</sup>, respectively. In addition, no significant evidence was found within the 95% confidence interval when the methods by Capillary Electrophoresis and Gas Chromatography were compared. Among all the methods available in the literature for the determination of total TFA from octadecenoic acid using Capillary Electrophoresis, this is the method that provides the fastest result so far, with an analysis time less than 4 min. A new method for the separation of major TFA positional isomers of octadecenoic acid in food from natural and industrial origin (vaccenic and elaidic acids) was then developed using Capillary Zone Electrophoresis Modified with Cyclodextrins and Direct Absorption Detection within the Ultraviolet Region. The electrolyte was optimized univariately for this novel separation, and instrumental parameters, such as voltage and temperature, were optimized by a  $2^2$  factorial design. Sample preparation was evaluated for spreadable cheese, and only the alkaline hydrolysis of triacylglycerols was effective for the preparation of this matrix. The running time was less than 25 min and the estimated detection limit for elaidic and vaccenic acids was 0,02 mmol L<sup>-1</sup>. In addition, the mechanism of this separation was studied through molecular modeling. This approach presents a potential application in the discrimination of major isomeric TFA from natural and industrial origin, which is already required in legislations of several countries. Finally, other methodologies for the determination

of fatty acids in food matrices were evaluated through chromatographic (Gas Chromatography with Flame Ionization Detector and Mass Spectrometry Detector, as well as Thin-layer Chromatography) and spectroscopic techniques (Infrared, Raman and Nuclear Magnetic Resonance) associated with chemometric tools, complementary to Capillary Electrophoresis, and were briefly discussed at the end of this thesis.

Keywords: Fatty Acids. Foods. Chromatography. Capillary Electrophoresis. Spectroscopy.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas químicas e pontos de fusão dos ácidos esteárico, oleico, elaídico e vacênico .....	25
Figura 2 - Numeração dos carbonos do ácido elaídico para nomenclaturas simplificadas .....	26
Figura 3 - Distribuição de isômeros posicionais <i>trans</i> do ácido octadecenóico em gordura vegetal hidrogenada (A) e gordura do leite bovino (B).....	28
Figura 4 - Mecanismos de bio-hidrogenação e hidrogenação industrial do ácido linoleico resultando na síntese intermediária do ácido vacênico e do ácido elaídico.....	29
Figura 5 - Instrumentação de Cromatografia Gasosa .....	37
Figura 6 - Instrumentação de Eletroforese Capilar.....	40
Figura 7 - Reação de saponificação de um triacilglicerol .....	43
Figura 8 - Migração em contra fluxo dos ácidos graxos C19:1 10 <i>c</i> , C18:1 9 <i>t</i> , C18:1 9 <i>c</i> , C18:2 9 <i>c</i> 12 <i>c</i> , C18:3 9 <i>c</i> 12 <i>c</i> 15 <i>c</i> .....	44
Figura 9 - Preparo de amostras industrializadas contendo gordura vegetal hidrogenada em sua composição .....	50
Figura 10 - Extração lipídica empregada para análise por Cromatografia Gasosa .....	51
Figura 11 - Transesterificação empregada após etapa de extração lipídica para análise por Cromatografia Gasosa .....	52
Figura 12 - Cartucho de Eletroforese Capilar com compartimento de entrada e compartimento de saída de amostra.....	57
Figura 13 - Eletroferogramas das injeções feitas pelo compartimento de saída com capilar de 50 µm de diâmetro interno nas nove condições avaliadas selecionadas pelo planejamento experimental 3 <sup>2</sup> .....	59
Figura 14 - Eletroferogramas das injeções feitas pelo compartimento de entrada com capilar de 50 µm de diâmetro interno nas nove condições avaliadas selecionadas por planejamento experimental 3 <sup>2</sup> .....	60
Figura 15 - Eletroferogramas mostrando injeções em quadruplicata da mistura de padrões nas condições A (I) e F (II) do planejamento experimental para verificação da repetibilidade das condições instrumentais .....	61
Figura 16 - Eletroferogramas das amostras de alimentos industrializados contendo gordura vegetal hidrogenada analisadas para validação do método. I: “biscoitinhos de	

goiabada”, II: “mistura para bolo”, III: “rosquinhas de coco”, IV: “palitos de wafer” .....	63
Figura 17 - Cromatogramas das amostras analisadas. I: “biscoitinhos de goiabada”, II: “mistura para bolo”, III: “rosquinhas de coco”, IV: “palitos de wafer” .....	65
Figura 18 - Eletroferogramas ilustrando as análises de amostras de leite em pó (I) e queijo (II) .....	69
Figura 19 - Razões de áreas dos ácidos graxos insaturados e o padrão interno para as diferentes amostras de leite em pó analisadas .....	71
Figura 20 - Preparo de amostras de requeijões .....	75
Figura 21 - Eletroferogramas mostrando a separação de uma mistura de padrões de ácido eláidico, ácido vacênico e ácido oleico a 1 mmol L <sup>-1</sup> com a utilização de diferentes seletores no eletrólito .....	78
Figura 22 - Eletroferogramas ilustrando os experimentos do planejamento experimental 2 <sup>2</sup> ..	80
Figura 23 - Eletroferograma ilustrando a condição 23 °C e 23 kV .....	81
Figura 24 - Eletroferogramas obtidos variando-se o percentual (volume/volume) de solvente orgânico utilizado na separação de uma mistura de padrões de ácido eláidico, ácido vacênico e ácido oleico a 1 mmol L <sup>-1</sup> .....	83
Figura 25 - Eletroferogramas obtidos quando outras concentrações de solução tamponante e ciclodextrina foram testadas .....	84
Figura 26 - Eletroferogramas obtidos após diferentes preparos de amostra: A) extração lipídica seguida de saponificação; B) apenas saponificação .....	86
Figura 27 - Eletroferogramas das amostras de requeijão analisadas .....	87
Figura 28 - Interação do ácido eláidico e ácido vacênico com a heptakis (2,3,6-tri- <i>o</i> -metil)- $\beta$ -ciclodextrina .....	89
Figura 29 - Ângulo de torção calculado para as estruturas nos últimos 50 ns da simulação. ..	90
Figura 30 - Função de distribuição radial entre o centro de massa do soluto e o oxigênio da água .....	92
Figura 31 - Migração em contra fluxo para os isômeros posicionais e geométricos do ácido octadecenóico estudados .....	93
Figura 32 - Eletroferogramas de suplementos de óleo de cártamo (I), óleo de prímula (II), óleo de linhaça (III) e óleo de abacate (IV) analisados por Eletroforese Capilar de Zona com Detecção Indireta na Região do Ultravioleta .....	95

Figura 33 - Eletroferogramas de amostras de óleo de semente de abóbora (I) e creme hidratante contendo o óleo (II), analisados por Eletroforese Capilar de Zona com Detecção Indireta na Região do Ultravioleta.....	96
Figura 34 - Eletroferogramas de amostras de óleo de peixe (I) e óleo de krill (II), analisados por Eletroforese Capilar de Zona com Detecção Direta na Região do Ultravioleta .....	97
Figura 35 - Cromatogramas de amostras de chocolates ao leite.....	100
Figura 36 - Análise por componentes principais das 32 amostras de chocolates e distribuição de ácidos graxos marcadores do leite (gráfico de barras) e isômeros C18:1 <i>trans</i> (gráfico de setores) em uma amostra de cada grupo.....	101
Figura 37 - Amostras de óleo de peixe natural e concentrado analisados por Cromatografia Gasosa e Cromatografia em Camada Delgada .....	103
Figura 38 - Análise por componentes principais das amostras de óleo de peixe, quando analisadas por Espectroscopia de Infravermelho, Raman, e Ressonância Magnética Nuclear (acima). Regiões utilizadas para análise multivariada (abaixo).....	113

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos ácidos graxos insaturados baseada na nomenclatura ômega .....	27
Tabela 2 - Matriz de contraste para o planejamento fatorial $3^2$ com triplicata no ponto central .....	54
Tabela 3 - Respostas do planejamento fatorial $3^2$ .....	61
Tabela 4 - Valores usados para o ajuste do modelo por regressão .....	64
Tabela 5 - Quantificação de ácidos graxos <i>trans</i> totais C18:1 nas amostras analisadas por Eletroforese Capilar de Zona com Detecção Direta na Região do Ultravioleta (CZE-UV) e Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (GC-FID) .....	66
Tabela 6 - Resolução entre os pares críticos de ácidos graxos em diferentes condições de temperatura e tensão selecionados a partir do planejamento fatorial $3^2$ .....	67
Tabela 7 - Precisão instrumental do método avaliada através dos cálculos do desvio-padrão relativo (%) na área do pico, altura do pico e tempo de migração, considerando-se injeção de padrões em quadruplicata .....	68
Tabela 8 - Informação sobre a concentração de oxigênio nas amostras de leite em pó analisadas .....	70
Tabela 9 - Matriz de contraste do planejamento fatorial $2^2$ .....	79
Tabela 10 - Energias de interação calculadas para os distintos complexos de inclusão .....	91
Tabela 11 - Modelos avaliados para a predição de isômeros posicionais C18:1 <i>trans</i> em amostras de chocolate por ressonância magnética nuclear .....	106
Tabela 12 - Modelos avaliados para a predição de isômeros posicionais C18:1 <i>trans</i> em amostras de chocolate por Espectroscopia de Infravermelho .....	109



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	ácido elaídico
AE@H- $\beta$ -CD	complexo de inclusão do ácido elaídico com a heptakis (2,3,6-tri- <i>o</i> -metil)- $\beta$ -ciclodextrina
AG	ácidos graxos
AGT	ácidos graxos <i>trans</i>
ATR-FTIR	Espectroscopia de Reflexão Total Atenuada na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (do inglês, <i>Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> )
AV	ácido vacênico
AV@H- $\beta$ -CD	complexo de inclusão do ácido vacênico com a heptakis (2,3,6-tri- <i>o</i> -metil)- $\beta$ -ciclodextrina
CE	Eletroforese Capilar (do inglês, <i>Capillary Electrophoresis</i> )
CZE	Eletroforese Capilar de Zona (do inglês, <i>Capillary Zone Electrophoresis</i> )
CZE-UV	Eletroforese Capilar de Zona com Detecção Direta por Absorção na Região do Ultravioleta (do inglês, <i>Capillary Zone Electrophoresis with Direct Absorption Detection in the Ultraviolet Region</i> )
DOI	identificador digital de objetos (do inglês, <i>digital object identifier</i> )
FEO	fluxo eletrosmótico
GC	Cromatografia Gasosa (do inglês, <i>Gas Chromatography</i> )
GC-FID	Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (do inglês, <i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detector</i> )
GC-MS	Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massas (do inglês, <i>Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detector</i> )
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
NMR	Ressonância Magnética Nuclear (do inglês, <i>Nuclear Magnetic Resonance</i> )
PI	padrão interno
REC	resolução estatística cromatográfica
RMSECV	raiz quadrada do erro médio quadrático de validação cruzada (do inglês, <i>root-mean-square error of cross-validation</i> )

RMSEP	raiz quadrada do erro médio quadrático de predição (do inglês, <i>root-mean-square error of prediction</i> )
SEIP	injeção pelo compartimento de saída da amostra (do inglês, <i>short-end injection procedure</i> )
TLC	Cromatografia em Camada Delgada (do inglês, <i>Thin-layer Chromatography</i> )
UV	ultravioleta
VL	variável latente

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\omega$	ômega
$\Delta$	delta
<i>c</i>	<i>cis</i>
<i>t</i>	<i>trans</i>
<i>m/z</i>	razão massa e carga
$\mu_{AP}$	mobilidade aparente
$\mu_{ELE}$	mobilidade eletroforética
$\mu_{OSM}$	mobilidade eletroosmótica
<i>q</i>	carga do íon
$\eta$	viscosidade da solução
<i>r</i>	raio do analito solvatado
<i>v</i>	velocidade linear do fluxo eletroosmótico
<i>U</i>	campo elétrico
$\epsilon$	constante dielétrica
$\epsilon_0$	permissividade do vácuo
$\zeta$	potencial zeta
$R_{min}$	resolução mínima
$R_{otm}$	resolução ótima
<i>n</i>	número de picos
$R_{i,i+1}$	resolução entre os pares de picos adjacentes
<i>w</i>	largura do pico
<i>t</i>	tempo de migração
$C_{tot}$	comprimento total do capilar
$C_{ef}$	comprimento efetivo do capilar
<i>s</i>	desvio-padrão residual da linha de regressão
<i>S</i>	inclinação da curva analítica
$C_{cal}$	valor calculado para o teste de Cochran
$C_{tab}$	valor tabelado para o teste de Cochran
$F_{cal}$	valor calculado para o teste F
$F_{tab}$	valor tabelado para o teste F
$D_{LB}$	desvio-padrão do sinal da linha base

$C_{AG}$	concentração do ácido graxo
$H$	altura do pico
$\text{Å}$	Angström
$r_{cv}$	coeficiente de correlação de validação cruzada
$r_p$	coeficiente de correlação de predição

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>22</b>
1.1	OS ÁCIDOS GRAXOS.....	23
<b>1.1.1</b>	<b>Nomenclatura para ácidos graxos.....</b>	<b>25</b>
1.2	OS ÁCIDOS GRAXOS <i>TRANS</i> .....	27
<b>1.2.1</b>	<b>Os ácidos graxos <i>trans</i> e seus efeitos na saúde .....</b>	<b>30</b>
1.2.1.1	<i>O Ácido elaidico</i> .....	30
1.2.1.2	<i>O ácido vacênico</i> .....	32
<b>1.2.2</b>	<b>Legislação e os ácidos graxos <i>trans</i> .....</b>	<b>34</b>
1.3	TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	36
<b>1.3.1</b>	<b>A Cromatografia Gasosa .....</b>	<b>36</b>
1.3.1.1	<i>A determinação de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa</i> .....	38
<b>1.3.2</b>	<b>A Eletroforese Capilar .....</b>	<b>39</b>
1.3.2.1	<i>A determinação de ácidos graxos por Eletroforese Capilar</i> .....	42
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>46</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	46
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
<b>3</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS <i>TRANS</i> TOTAIS DO ÁCIDO OCTADECENÓICO POR ELETROFORESE CAPILAR .....</b>	<b>47</b>
3.1	MATERIAIS E MÉTODOS .....	48
<b>3.1.1</b>	<b>Padrões, reagentes, solventes, soluções e amostras .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Preparo de amostras para Eletroforese Capilar .....</b>	<b>49</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Preparo de amostras para Cromatografia Gasosa.....</b>	<b>50</b>
<b>3.1.4</b>	<b>Instrumentação para Eletroforese Capilar .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1.5</b>	<b>Instrumentação para Cromatografia Gasosa .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1.6</b>	<b>Desenho experimental .....</b>	<b>54</b>
<b>3.1.7</b>	<b>Identificação, quantificação dos ácidos graxos e validação analítica .....</b>	<b>55</b>
3.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	56
<b>3.2.1</b>	<b>Escolha do modo de injeção e otimização das condições eletroforéticas.....</b>	<b>57</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Otimização do preparo de amostras.....</b>	<b>62</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Aplicação do método em matrizes alimentícias .....</b>	<b>63</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Quantificação dos ácidos graxos <i>trans</i> totais e validação do método.....</b>	<b>64</b>

3.2.5	Uma nova aplicação para o método desenvolvido.....	68
4	<b>SEPARAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS <i>TRANS</i> POSICIONAIS ISOMÉRICOS DO ÁCIDO OCTADECENÓICO MAJORITÁRIOS EM ALIMENTOS POR ELETROFORESE CAPILAR.....</b>	<b>73</b>
4.1	MATERIAIS E MÉTODOS .....	73
4.1.1	Padrões, reagentes, solventes, soluções e amostras .....	74
4.1.2	Preparo de amostras .....	74
4.1.3	Instrumentação para Eletroforese Capilar.....	75
4.1.4	Desenho experimental .....	76
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	77
4.2.1	Otimização do eletrólito.....	77
4.2.2	Otimização das condições instrumentais.....	79
4.2.3	Estudo da influência da concentração de solventes orgânicos, tampão e ciclodextrina no eletrólito .....	82
4.2.4	Estudo do preparo das amostras.....	85
4.2.5	Aplicação do método em amostras de requeijão .....	87
4.2.6	Detectabilidade do método .....	88
4.2.7	Estudo da ordem de migração através de modelagem molecular.....	88
5	<b>OUTRAS METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM ALIMENTOS ENVOLVENDO TÉCNICAS ELETROFORÉTICAS, CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS ASSOCIADAS A MODELOS MULTIVARIADOS.....</b>	<b>94</b>
5.1	METODOLOGIAS POR ELETROFORESE CAPILAR.....	94
5.1.1	Determinação de ácidos graxos em amostras de óleos vegetais usados como suplementação nutricional.....	94
5.1.2	Determinação de ácidos graxos em amostras de óleo de semente de abóbora e cosméticos contendo o óleo em sua composição.....	96
5.1.3	Determinação de ácidos graxos $\omega$ -3 em amostras de óleos marinhos.....	97
5.2	METODOLOGIAS EMPREGANDO TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS .....	98
5.2.1	Metodologias para análise de chocolates.....	99
5.2.2	Metodologias para análise de óleos de peixe .....	102
5.3	METODOLOGIAS EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS ASSOCIADAS A MODELOS MULTIVARIADOS .....	104

5.3.1	Metodologias para predição de ácidos graxos <i>trans</i> em amostras de chocolate	105
5.3.2	Metodologias para classificação de amostras de óleo de peixe contendo ácidos graxos como triacilgliceróis e etis ésteres .....	112
6	CONCLUSÕES .....	115
	REFERÊNCIAS .....	116
	APENDICE A – Súmula curricular .....	127

## 1 INTRODUÇÃO

Os lipídeos são uma das principais classes de compostos presentes em alimentos e tem sua importância reconhecida há décadas na nutrição e desenvolvimento humano. Entretanto, pelo fato de fornecerem mais energia do que os outros macronutrientes, estes são frequentemente apontados como os “vilões da dieta”, e são comumente relacionados à obesidade e doenças correlatas. Sabe-se, porém, que além de se gerenciar a quantidade de gordura consumida, deve-se selecionar bem o tipo de lipídeo ingerido, pois a composição da dieta é categórica para a prevenção de enfermidades. Os ácidos graxos (AG), que foram o foco desta tese, são os componentes fundamentais de lipídeos mais complexos, e representam os principais constituintes dos triacilgliceróis, estruturas majoritárias no material alimentar.

Os AG ômega-3 e ômega-6 são considerados essenciais e devem ser ingeridos pela dieta, já que não podem ser sintetizados pelo organismo. Além disso, a deficiência destes está associada a síndromes que podem ser fatais. Em contrapartida, os AG saturados podem causar efeitos deletérios a saúde humana quando consumidos em excesso e devem ser ingeridos com moderação. Já os AG *trans* (AGT) de origem industrial, encontrados principalmente em alimentos contendo gordura vegetal hidrogenada, devem ser consumidos em quantidades muito baixas, ou até mesmo banidos da dieta, já que a ingestão destes está fortemente relacionada ao desenvolvimento de doenças coronarianas. Neste contexto, a determinação de AG em alimentos é extremamente importante, e se faz necessária para fins de rotulagem nutricional, controle de qualidade e avaliação de autenticidade dos alimentos, principalmente.

Considerando as numerosas legislações que visam controlar o conteúdo de AGT em alimentos, bem como solicitam a distinção AGT de origem industrial e natural, em alguns casos, o foco desta tese foi estudar métodos para determinação de AGT em matrizes alimentícias contendo AGT naturais e/ou industriais. A técnica clássica para determinação de AG é a Cromatografia Gasosa (do inglês, *Gas Chromatography* – GC) e neste estudo, hipotetizou-se que métodos por Eletroforese Capilar (do inglês, *Capillary Electrophoresis* – CE) e técnicas espectroscópicas associadas a calibração multivariada poderiam ser utilizados para estas análises, providenciando maior frequência analítica, com um preparo de amostras mais simples.

Assim, após ser apresentado o referencial teórico e os objetivos deste estudo, um método desenvolvido para quantificação de AGT totais do ácido octadecenóico será apresentado na seção 3. Este método apresenta relevância em países onde é requerido apenas a informação do conteúdo de AGT totais nos alimentos, como na atual legislação brasileira. Na seção 4 será detalhada uma metodologia para a separação inédita por CE do ácido elaídico e ácido vacênico,



isômeros posicionais *trans* majoritários do ácido octadecenóico em alimentos de origem industrial e natural, respectivamente. Novos métodos desenvolvidos durante o doutorado para determinação de outros AG em matrizes alimentícias empregando-se CE, GC e técnicas espectroscópicas (Raman, Reflexão Total Atenuada na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier, do inglês *Attenuated Total Teflection Fourier Transform Infrared* – ATR-FTIR, e Ressonância Magnética Nuclear, do inglês, *Nuclear Magnetic Ressonance* – NMR) associadas a modelagem multivariada, não relacionados ao tema principal de pesquisa desta tese, serão apresentados brevemente na seção 5. Por fim, as conclusões deste estudo serão apresentadas.

## 1.1 OS ÁCIDOS GRAXOS

Os lipídeos compreendem uma vasta gama de substâncias que possuem em comum o fato de serem insolúveis em água. De acordo com Fahy et al. (2005), estes podem ser divididos em oito grupos: AG, glicolipídios, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, esteróis, policetídeos, sacarolipídios e prenóis. A composição dos AG em alimentos, ênfase deste estudo, pode afetar o sabor, as propriedades nutricionais e a funcionalidade dos gêneros alimentícios. Além disso, os AG são importantes fontes de energia para o organismo humano, e desempenham funções estruturais e metabólicas essenciais.

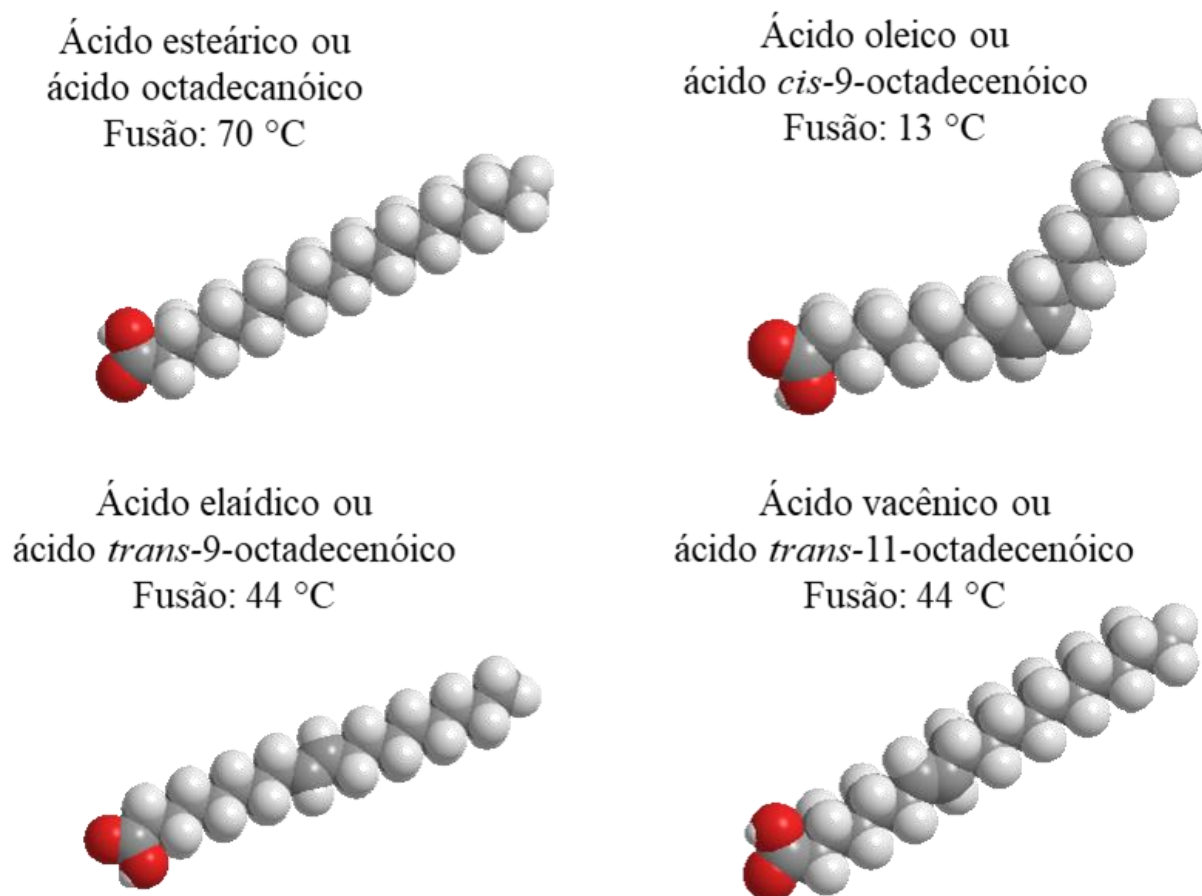
Os AG são ácidos carboxílicos majoritariamente encontrados em alimentos na forma alifática, monocarboxílica, não ramificada, com cadeia longa e número par de átomos de carbonos, onde o grupo carboxila constitui a região polar e a cadeia hidrocarbônica a região apolar da molécula. Eles podem ser classificados como AG saturados, quando não tem duplas ligações; ou como AG insaturados, quando contém uma insaturação ou mais. Neste último caso, os AG são chamados de monoinsaturados quando apresentam apenas uma insaturação e poli-insaturados quando apresentam duas ou mais insaturações. Em AG poli-insaturados, as duplas ligações normalmente ocorrem em posições não conjugadas, porém, elas também podem estar numa posição conjugada. Existe ainda uma classificação que separa os AG em AG de cadeia curta (de dois a quatro átomos de carbono); de cadeia média (de seis a dez átomos de carbono), e de cadeia longa (acima de doze átomos de carbono) (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002).

Dois tipos de isomeria podem ser observados em AG insaturados. Estes podem apresentar-se como isômeros geométricos *cis* ou *trans* devido à presença das duplas ligações restringirem a rotação da cadeia hidrocarbônica. Os AGT têm os átomos de carbono adjacentes

as duplas ligações em lados opostos, o que lhes confere uma geometria linear, que permite um maior empacotamento dos mesmos devido à proximidade e interação entre as moléculas, assim como ocorre com os AG saturados. Por isso AG saturados e AGT são sólidos a temperatura ambiente e tem pontos de fusão elevados quando comparados a outros AG insaturados. Os isômeros *cis*, ao contrário, têm os átomos de carbono adjacentes às ligações duplas do mesmo lado, apresentando-se em uma forma angular e líquidos à temperatura ambiente, devido as interações entre moléculas serem menos favoráveis. Os AG insaturados ainda podem apresentar isomeria posicional, diferenciando-se apenas pela posição da dupla ligação na cadeia hidrocarbônica (HAMILTON, 2010).

Na Figura 1 são mostradas as estruturas espaciais e pontos de fusão de alguns AG com 18 carbonos: do AG saturado correspondente, o ácido octadecanóico, e alguns monoenos isoméricos, como o ácido *cis*-9-octadecenóico, o ácido *trans*-9-octadecenóico e o ácido *trans*-11-octadecenóico, conhecidos pelos nomes comuns de ácido esteárico, ácido oleico, ácido elaídico e ácido vacênico, respectivamente. Enquanto o ácido elaídico e o ácido oleico são isômeros geométricos, por diferirem apenas na posição espacial dos hidrogênios adjacentes à dupla ligação localizada no carbono 9; os ácidos elaídico e vacênico apresentam-se como isômeros posicionais, por ambos serem AGT e diferirem apenas na posição da dupla ligação na cadeia hidrocarbônica. Observando-se a figura pode-se notar a similaridade das estruturas espaciais dos AGT e AG saturados, que se apresentam sob uma forma estendida e a diferença destes quando comparados com o AG insaturado *cis* representado, com geometria angular. Se observa também grande diferença entre os pontos de fusão dos compostos, sendo que o ácido oleico possui o menor ponto de fusão (13 °C) e o ácido esteárico o maior (70 °C). Adicionalmente, percebe-se que os AGT apresentam valores intermediários, e se fundem a aproximadamente 44 °C (COSTA et al., 2006).

Figura 1 - Estruturas químicas e pontos de fusão dos ácidos esteárico, oleico, elaídico e vacênico



Fonte: Elaborada pela autora com o ChemBioDraw Ultra 14.0 (2020).

### 1.1.1 Nomenclatura para ácidos graxos

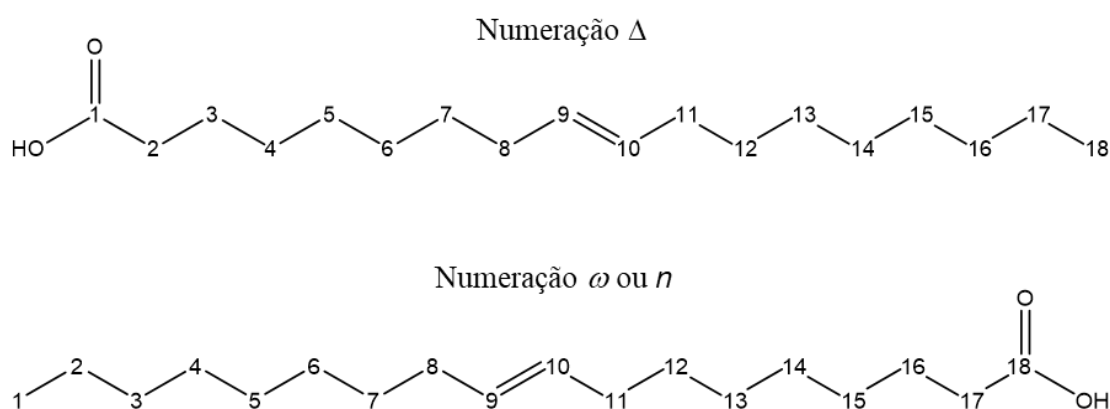
Os AG podem ser identificados inequivocamente através do uso da nomenclatura sistemática (WILKINSON, 1993), que denomina os AG com base no número de átomos de carbono e no número e posição de ligações duplas considerando como referência o grupo carboxílico. Os grupos substituídos e suas posições na cadeia hidrocarbônica também devem ser identificados, além da atividade óptica e configuração geométrica em ligações duplas. O ácido elaídico, por exemplo, é denominado ácido *trans*-9-octadecenóico, adotando-se esta nomenclatura.

As letras gregas ômega ( $\omega$ ) e delta ( $\Delta$ ) são algumas vezes usadas com significado especial na nomenclatura abreviada para AG, apesar de não identificarem um AG

inequivocamente, por geralmente não indicarem a configuração *cis/trans*. Ômega é frequentemente usado para indicar o quanto uma ligação dupla está afastada do carbono metílico terminal. Pode ser encontrada a letra *n* ao invés de  $\omega$ , algumas vezes, sendo que ambas são usadas para a mesma finalidade. Empregando-se a nomenclatura ômega, o ácido eláídico seria C18:1  $\omega$ -9 ou C18:1 *n*-9, indicando que o AG tem 18 carbonos e a dupla ligação está localizada a 9 carbonos do carbono metílico terminal.

Delta, seguido por um numeral ou numerais, é usado para designar a presença e a posição de insaturações na cadeia hidrocarbônica contando a partir da carboxila. Nas nomenclaturas abreviadas o ácido eláídico seria descrito como C18:1  $\Delta$ 9, indicando que a única dupla ligação está afastada 9 átomos de carbono contando a partir da carboxila e está localizada entre os carbonos 9 e 10 (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002). Uma nomenclatura simplificada mais completa pode também ser encontrada na literatura, baseada na nomenclatura delta, onde informa-se além da posição das insaturações, a configuração geométrica desta insaturação. Neste caso, o ácido eláídico seria descrito como C18:1  $\Delta$ 9*t* ou simplesmente C18:1 9*t*. Similarmente, o ácido oleico seria descrito como C18:1  $\Delta$ 9*c* ou simplesmente C18:1 9*c*. Para efeito de simplificação, esta última nomenclatura abreviada será empregada nesta tese. Na Figura 2 é mostrada a numeração dos carbonos do ácido eláídico, quando empregadas as nomenclaturas abreviadas  $\Delta$  e  $\omega$ .

Figura 2 - Numeração dos carbonos do ácido eláídico para nomenclaturas simplificadas



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

A nomenclatura  $\omega$  é muito usual para identificar os AG essenciais  $\omega$ -3 e 6, que não são sintetizados pelo organismo e devem ser ingeridos pela dieta. Segundo a Organização Mundial da Saúde, é recomendável a ingestão de pelo menos 0,5% de AG  $\omega$ -3 e 2,0%  $\omega$ -6. (WORLD

HEALTH ORGANIZATION, 2008). A deficiência de AG  $\omega$ -3 está relacionada a problemas dérmicos, enquanto a falta de AG  $\omega$ -6 pode gerar distúrbios neurológicos e visuais. Ademais, o consumo destes AG auxilia na diminuição do processo inflamatório no organismo e do risco de se desenvolver doenças cardiovasculares (POMPÉIA, 2002). AG  $\omega$ -9 não são essenciais porque o corpo pode sintetizá-los a partir de outros AG, mas sabe-se que uma dieta rica em AG monoinsaturados  $\omega$ -9, como o ácido oleico, pode promover alguns benefícios a saúde (LOPES; PELUZIO; HERMSDORFF, 2016).

Existe ainda uma classificação dos AG insaturados baseada na nomenclatura  $\omega$  que é muito usual, descrita na Tabela 1. Cada classe é composta por uma família de AG sendo que os membros desta família podem ser sintetizados biologicamente a partir daqueles oferecidos na dieta. O ácido araquidônico (C20:4 5*c*9*c*11*c*14*c*), por exemplo, é sintetizado a partir do AG parental da classe  $\omega$ -6, o ácido linoleico (C18:2 9*c*12*c*). Entretanto, um AG de uma determinada classe não pode ser biologicamente convertido em outra classe. Dessa forma, um AG  $\omega$ -9 não poderia ser convertido em  $\omega$ -6, por exemplo (GRAZIOLA; SOLIS; CURI, 2002).

Tabela 1 - Classificação dos ácidos graxos insaturados baseada na nomenclatura ômega

Classe	Ácido Graxo Parental	Nomenclatura
$\omega$ -7	Ácido palmitoleico	C16:1 9 <i>c</i>
$\omega$ -9	Ácido oleico	C18:1 9 <i>c</i>
$\omega$ -6	Ácido linoleico	C18:2 9 <i>c</i> 12 <i>c</i>
$\omega$ -3	Ácido $\alpha$ -linolênico	C18:3 9 <i>c</i> 12 <i>c</i> 15 <i>c</i>

Fonte: Adaptado de Graziola; Solis; Curi (2002).

## 1.2 OS ÁCIDOS GRAXOS *TRANS*

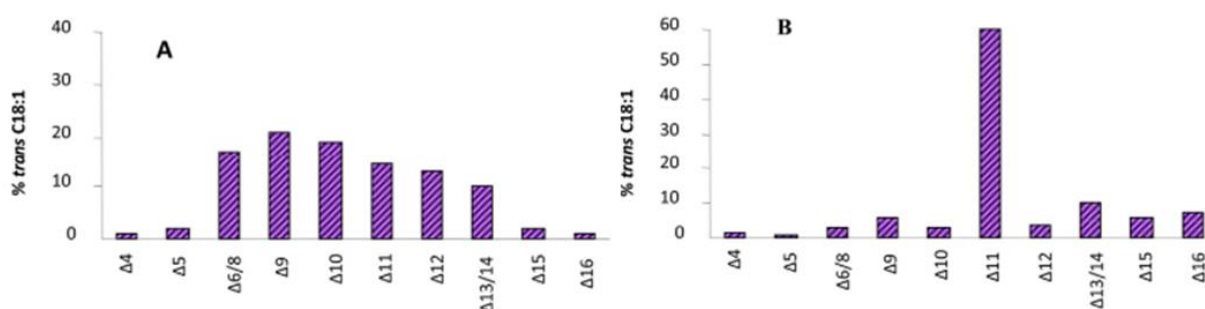
A maioria dos AG insaturados que ocorrem na natureza apresentam duplas ligações na configuração geométrica *cis*, mas AGT também podem ser encontrados naturalmente, em vegetais e na carne e leite de ruminantes. Alguns vegetais como alho porró, vagem, espinafre e alface contém o ácido C16:1 3*t* em pequenas quantidades. A semente de colza contém o ácido C22:1 13*t* e o ácido C20:1 11*t* e vários isômeros conjugados do ácido linoleico e do ácido  $\alpha$ -linolênico são encontrados em diversas plantas. (PADOVESE; FILHO, 2002).

Na carne e no leite de animais ruminantes, e também em alimentos derivados do leite, o AGT majoritário naturalmente encontrado é o ácido vacênico (C18:1 11*t*), e a concentração de AGT totais nestas matrizes é geralmente inferior a 5 % (g 100g<sup>-1</sup> AG totais). Adicionalmente,

considerando-se dietas convencionais dos ruminantes, o percentual de ácido vacênico no leite, por exemplo, pode representar ~50 % do total de AGT do ácido octadecenóico, enquanto outros isômeros estão presentes em quantidades significativamente menores.

Entretanto, os AGT também podem ser gerados industrialmente por meio de diferentes processos tecnológicos, como na produção de gordura vegetal hidrogenada. Nessa matriz é observada uma distribuição gaussiana dos isômeros *trans* do ácido octadecenóico, centrada nos isômeros majoritários C18:1 9*t* (ácido elaídico) e C18:1 10*t* (não possui um nome comum). Em termos quantitativos, o conteúdo de AGT em gordura vegetal hidrogenada corresponde a aproximadamente 50 % dos AG totais (GÓMEZ-CORTÉS; JUÁREZ; DE LA FUENTE, 2018). Na Figura 3 é ilustrada a distribuição de isômeros posicionais *trans* do ácido octadecenóico em gordura vegetal hidrogenada e gordura do leite bovino. Os valores no eixo x indicam a posição da ligação dupla na cadeia carbônica.

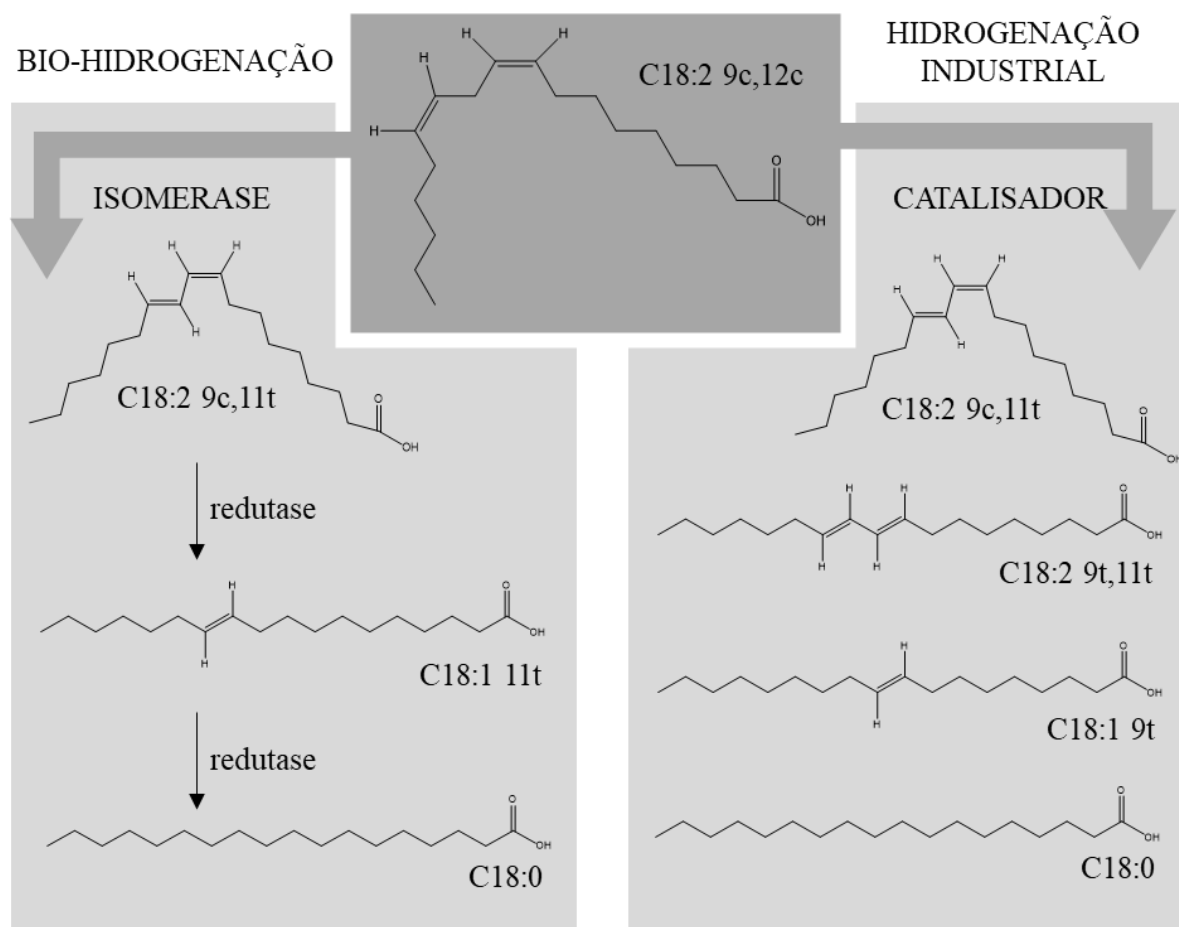
Figura 3 - Distribuição de isômeros posicionais *trans* do ácido octadecenóico em gordura vegetal hidrogenada (A) e gordura do leite bovino (B)



Fonte: Adaptado de Gómez-Cortés; Juárez; de La Fuente (2018), com permissão da Elsevier.

O processo de formação do ácido vacênico é chamado de bio-hidrogenação e ocorre pela ação de isomerases bacterianas encontradas em estômagos de animais ruminantes que convertem os AG insaturados das plantas ingeridas por eles em AGT. Já a formação dos AGT na gordura vegetal hidrogenada ocorre por uma hidrogenação catalítica, que consiste na injeção de hidrogênio gasoso a óleos vegetais poli-insaturados na presença de um catalisador, como níquel. Na Figura 4 são ilustrados os mecanismos de bio-hidrogenação e hidrogenação industrial do ácido linoleico, resultando na síntese intermediária do ácido vacênico e do ácido elaídico, isômeros *trans* majoritários em alimentos de origem natural e industrial, respectivamente.

Figura 4 - Mecanismos de bio-hidrogenação e hidrogenação industrial do ácido linoleico resultando na síntese intermediária do ácido vacênico e do ácido elaídico



Fonte: Adaptado de Padovese e Filho (2002).

A gordura vegetal hidrogenada passou a ser empregada em alimentos principalmente por ter menor custo e proporcionar maior tempo de prateleira aos produtos. Através da eliminação das ligações duplas presentes em AG insaturados, que são mais propensas à oxidação, uma maior estabilidade da molécula é obtida. Em geral, a hidrogenação parcial é preferida, pois o ponto de fusão dos AGT obtidos é maior que o ponto de fusão dos isômeros *cis* e a hidrogenação completa de óleos insaturados resulta em compostos saturados que apresentam pontos de fusão muito elevados, o que geralmente não é desejável pelas indústrias. Adicionalmente, apesar dos AGT industriais serem encontrados majoritariamente em óleos que foram hidrogenados, estes também podem ser encontrados em menores quantidades em óleos que passaram por processo de desodorização (uma das etapas do refino de óleos comestíveis) e também em óleos utilizados para fritura, que sofreram aquecimento a uma temperatura maior que 180 °C (MARTIN *et al.*, 2007).

É válido mencionar que a discussão dos AGT em alimentos contendo gordura vegetal hidrogenada geralmente é limitada aos isômeros *trans* do ácido octadecenoico, uma vez que os AGT são gerados durante a hidrogenação, desodorização ou fritura de/com óleos vegetais, que são fontes de AG poli-insaturados de mesmo comprimento de cadeia (ácido linoleico e ácido  $\alpha$ -linolênico, majoritariamente) (MOSSOBA; KRAMER, 2010).

### **1.2.1 Os ácidos graxos *trans* e seus efeitos na saúde**

Há muitas décadas pesquisadores estão interessados em investigar as consequências da ingestão de AGT no organismo. Por um lado, os danos provocados à saúde associados a dietas ricas em AGT provenientes de gordura vegetal hidrogenada estão bem documentados. Por outro lado, crescem as investigações a respeito do consumo de ácido vacênico e seus efeitos na saúde humana.

#### *1.2.1.1 O Ácido elaídico*

Muitos estudos epidemiológicos indicam que a ingestão de AGT de origem industrial se relaciona com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Através de um estudo realizado em 7 países, com base em dados de 25 anos de mortalidade de 12.763 homens de meia idade, pesquisadores sugeriram que, assim como a ingestão de AG saturados, o consumo de AGT está positivamente e efetivamente relacionado ao risco de se desenvolver doenças cardiovasculares (KROMHOUT *et al.*, 1995). Uma abordagem similar foi realizada com 78.778 mulheres nos Estados Unidos, inicialmente não diagnosticadas com doenças cardiovasculares e diabetes (OH *et al.*, 2005). Os pesquisadores documentaram 1.766 incidências de doenças coronarianas nos 20 anos de estudos, incluindo 1.241 casos de infartos do miocárdio não fatais e 525 mortes. Novamente, o consumo de AGT industriais foi fortemente relacionado com o aumento do risco de se desenvolver doenças coronarianas e neste caso, a incidência ainda foi maior em mulheres com menos de 65 anos e com sobrepeso.

Pesquisas mais recentes continuam apoiando as evidências de que existe uma associação positiva entre o consumo de AGT industriais e o aumento do risco de se desenvolver doenças cardiovasculares, como confirmado na revisão sistemática com meta-análise realizada pela Organização Mundial da Saúde, em 2016 (WORLD HEALTH ORGANIZATION; BROUWER, I. A., 2016).



Ainda é reportado na literatura que os efeitos do consumo dos AGT de origem industrial incluem a alteração da concentração de lipoproteínas plasmáticas, com um aumento na concentração da lipoproteína de baixa densidade e a diminuição das concentrações da lipoproteína de alta densidade (MOZAFFARIAN; ARO; WILLETT, 2009; MOZAFFARIAN, 2006); além de disfunção endotelial e efeitos pró inflamatórios incluindo maiores níveis plasmáticos de proteína C reativa, fator de necrose tumoral alfa e interleucina 6, importantes marcadores biológicos de processos inflamatórios no organismo (HAN *et al.*, 2002; LOPEZ-GARCIA *et al.*, 2005).

Devido à similaridade dos AGT com AG saturados e sabendo-se que uma dieta rica nestes últimos pode aumentar o risco de se desenvolver diabetes tipo II, alguns pesquisadores se propuseram a estudar se uma dieta rica em AGT industriais também estaria associada a efeitos adversos na sensibilidade à insulina. Enquanto alguns estudos evidenciaram uma associação positiva (ANGELIERI *et al.*, 2012; SALMERÓN *et al.*, 2001), outros, entretanto, não chegaram a esta mesma conclusão (LOVEJOY *et al.*, 2002; MEYER *et al.*, 2001). Tendo em vista o exposto e também as revisões feitas por Odegaard e Pereira (2006) e Risérus (2006), pode-se concluir, neste caso, que assim como foi preciso para os AG saturados, testes mais eficazes, maiores e mais controlados são necessários para comprovar se os AGT industriais tem efeito na sensibilidade à insulina.

A relação entre câncer e consumo de AGT também tem sido investigada em decorrência das preocupações crescentes sobre os efeitos adversos à saúde com a ingestão destes AG. Estudos onde foi avaliada a influência do consumo de AGT no risco de se desenvolver câncer de mama são ambíguos. Cho *et al.* (2003) e Holmes *et al.* (1999) concluíram que não houve evidência significativa entre a ingestão de AGT e o risco de se desenvolver câncer de mama. Já Bakker; van't Veer; Zock, (1997) e Kohlmeier *et al.* (1997) evidenciaram que este tipo de câncer e câncer de cólon foram associados negativamente com AG monoinsaturados *cis* e positivamente com AGT de origem industrial.

Em relação ao câncer colorretal, a evidência geral não indica uma associação positiva entre a ingestão de AGT e o risco de se desenvolver este tipo de câncer, em estudos conduzidos nos Estados Unidos e no Canadá (LIN, 2004; MCKELVEY *et al.*, 1999; NKONDJOCK *et al.*, 2003). Já quanto ao câncer de próstata, alguns autores puderam evidenciar uma associação positiva entre a ingestão de AGT e este tipo de câncer (CHAVARRO *et al.*, 2008; HODGE *et al.*, 2004; KING *et al.*, 2005), enquanto Barker *et al.* (1997) não relatou nenhuma associação significativa. Sendo assim, não é conveniente afirmar que AGT industriais apresentam efeito

carcinogênico, frente as evidências disponíveis na literatura atualmente. A falta de resultados consistentes de estudos epidemiológicos pode se justificar por diversos fatores, incluindo questões metodológicas, ferramentas de avaliação dietética usadas e erros na estimativa do conteúdo de AGT. Neste sentido, novos estudos são necessários para esclarecer a relação de AGT de origem industrial e o câncer.

#### 1.2.1.2 O ácido vacênico

O que a literatura dispõe sobre os efeitos do ácido vacênico sobre a saúde é bem limitado em comparação aos AGT industriais, mas em geral, este AG demonstra ser benéfico a saúde humana, assim como outros AGT de origem biológica, como os isômeros *trans* do ácido linoleico conjugado, encontrados na carne e no leite de animais ruminantes (GÓMEZ-CORTÉS; JUÁREZ; DE LA FUENTE, 2018). O ácido vacênico é o único precursor da síntese endógena do ácido rumênico, o C18:2 9c11t, um dos isômeros do ácido linoleico conjugado de maior ocorrência natural nos alimentos e o primeiro AGT a ser reconhecido por seus efeitos benéficos à saúde humana. A formação do ácido rumênico pode se dar tanto através da incompleta bio-hidrogenação de AG poli-insaturados em animais ruminantes, como foi ilustrado na Figura 4, ou através da síntese endógena, onde ocorre a dessaturação do ácido vacênico por ação da enzima  $\delta$ -9-dessaturase, tanto em animais quanto em humanos (GRIINARI *et al.*, 2000; PARIZA; PARK; COOK, 2001).

Apesar de alguns pesquisadores evidenciarem os benefícios do consumo de ácido vacênico após sua conversão em ácido rumênico (EFTEKHARI *et al.*, 2014; MOHAMMADZADEH *et al.*, 2013; PARIZA; PARK; COOK, 2001), um crescente número de estudos em animais vem demonstrando uma bioatividade para o ácido vacênico independente da sua conversão para ácido rumênico. Através de estudos com roedores do tipo JCR:LA-cp, foi evidenciado que uma suplementação na dieta dos roedores com ácido vacênico foi capaz de causar efeitos benéficos no perfil de lipídios e lipoproteínas nesta linhagem. Em ratos obesos alimentados com uma dieta suplementada com ácido vacênico por 3 semanas, os triglicérides diminuíram em 40 % quando comparados a ratos alimentados com uma dieta controle similar a dieta típica ocidental (WANG *et al.*, 2008). Através de outro estudo em roedores, pesquisadores demonstraram que uma dieta enriquecida com ácido vacênico foi capaz de diminuir os marcadores pró-inflamatórios inter leucina 2 e fator de necrose tumoral alfa (BLEWETT *et al.*, 2009).

Wang e colaboradores evidenciaram ainda que a suplementação na dieta com ácido vacênico por 16 semanas foi capaz de diminuir triglicérides, colesterol e lipoproteína de baixa densidade em ratos do tipo JCR:LA-cp, quando comparados com ratos alimentados com uma típica dieta ocidental (WANG *et al.*, 2009). Para verificar se a associação do ácido rumênico com ácido vacênico seria positiva em relação aos mesmos parâmetros avaliados por Wang e colaboradores, Jacome-Sosa e colaboradores investigaram os efeitos de uma suplementação de 16 semanas com apenas ácido rumênico e outra com ácido rumênico e ácido vacênico, também em comparação com uma dieta típica ocidental. Propositamente, a dieta ácido vacênico + ácido rumênico foi dada aos roedores em maior quantidade. Percebeu-se que tanto a dieta de ácido rumênico quanto ácido rumênico+ácido vacênico foi capaz de diminuir triglicérides, colesterol e lipoproteína de baixa densidade dos ratos em comparação aos ratos alimentados com a dieta controle. Ademais, os ratos alimentados com ácido vacênico + ácido rumênico tiveram menor peso corporal que o grupo alimentado apenas com ácido rumênico, mesmo com a dieta sendo oferecida em maior quantidade (JACOME-SOSA *et al.*, 2010).

Em estudos mais recentes Jacome-Sosa e colaboradores demonstraram que uma suplementação na dieta com ácido vacênico fez com que fosse reduzida a gordura total de ratos obesos, além de ter ocorrido uma redistribuição do tecido adiposo (redução da gordura mesentérica e aumento da massa gorda inguinal) e diminuição do tamanho dos adipócitos em relação aos ratos controle. Também foi descrito um aumento da taxa metabólica, concomitantemente com uma maior preferência pela utilização da glicose pelo corpo inteiro para oxidação e aumento da sensibilidade à insulina. Foi relatado que o ácido vacênico diminuiu os escores de atividade da doença hepática gordurosa não alcoólica e reduziu os níveis hepáticos e secreção de triglicérides intestinais em relação a dieta controle (JACOME-SOSA *et al.*, 2014). Em relação a sensibilidade à insulina, os estudos de alguns pesquisadores (TARDY *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008) evidenciaram que o consumo de ácido vacênico não alterou a sensibilidade à insulina em roedores.

Estudos em humanos são escassos na literatura, mas dentre os disponíveis, o trabalho de Willett *et al.* (1993) foi um dos primeiros a reportar os efeitos do ácido vacênico no organismo. Foi concluído, com base na investigação dos mesmos formulários utilizados no estudo de Oh *et al.* (2005) supracitado, envolvendo 78.778 mulheres nos Estados Unidos, que AGT de ocorrência natural estão associados a uma diminuição do risco de se desenvolver doenças coronarianas, ao contrário do que ocorre com AGT industriais. O estudo de Hodgson *et al.*, (1996) avaliou a relação da ingestão de AGT medidos em plaquetas e o grau de doença

arterial coronariana em 191 pacientes não diabéticos submetidos a angioplastia (134 homens e 57 mulheres). Foi demonstrado que o ácido elaídico foi correlacionado positivamente a doença arterial coronariana, enquanto que o ácido vacênico não foi significativo. Tricon *et al.* (2006) procuraram investigar os efeitos de se consumir produtos naturalmente enriquecidos com ácido rumênico e ácido vacênico no perfil lipídico de homens de meia idade, bem como a aterogenicidade da lipoproteína de baixa densidade e marcadores de inflamação e resistência à insulina nestes indivíduos. Foi concluído que o consumo de ácido rumênico e ácido vacênico não afetou significativamente a gordura corporal, marcadores de inflamação, insulina, glicose, triacilgliceróis ou colesterol, tanto total quanto lipoproteína de baixa e alta densidade individualmente, em humanos.

Field *et al.* (2009) revisaram a literatura disponível sobre os efeitos do ácido vacênico em células cancerosas e puderam constatar que nos trabalhos avaliados, este AG diminuiu o crescimento da célula ou o metabolismo do tumor. No estudo de Awad *et al.* (1995) com células humanas cancerosas de cólon, foi observado que o ácido vacênico inibiu o crescimento das células em 23 % quando comparados com a suplementação com o AG saturado esteárico (C18:0). Miller *et al.* (2003), estudando o efeito do ácido vacênico sobre células cancerosas mamárias e de cólon, percebeu que uma suplementação com ácido vacênico em 4, 5, 10 e 15 g mL<sup>-1</sup> não teve efeito no crescimento celular. Entretanto, 20 µg mL<sup>-1</sup> de ácido vacênico providenciou significativa redução no crescimento celular em ambas linhagens celulares.

Estudos epidemiológicos que associem o consumo de ácido vacênico e risco de câncer são extremamente escassos na literatura e estudos mais precisos devem ser conduzidos pois os existentes apresentam algumas lacunas que não permitem avaliar com precisão o efeito do ácido vacênico sobre vários tipos de câncer. Uma das limitações existentes é que os isômeros de AGT naturais são lipídeos minoritários na dieta. Ainda é limitante o fato que os questionários e bases de dados dietéticos podem não retratar com precisão a composição alimentar. Portanto, embora os resultados de alguns estudos *in vitro* e *in vivo* sugiram um efeito anticarcinogênico para o ácido rumênico, não é prudente relacionar os efeitos de AG de origem natural sobre vários tipos de câncer até a data (FIELD *et al.*, 2009; GEBAUER *et al.*, 2011).

### **1.2.2 Legislação e os ácidos graxos *trans***

Na luz destas vastas evidências sobre os malefícios que o consumo de AGT industriais pode trazer ao organismo, agências regulamentadoras de muitos países determinaram a redução

ou até mesmo a eliminação de gordura vegetal hidrogenada nos alimentos. Entretanto, em muitos lugares, a utilização desta gordura em matrizes alimentícias ainda não está regulada. A Dinamarca foi o país pioneiro em estabelecer um limite de AGT industriais nos alimentos consumidos no país. Desde 2004 são permitidas 2,0 gramas de gorduras *trans* (de origem industrial) por 100 gramas de gorduras totais, sendo que a regra é válida tanto para alimentos produzidos no país quanto para aqueles importados. (MINISTRY OF FOOD, AGRICULTURE AND FISHERIES OF DENMARK, 2014).

No Brasil, desde 2003 é obrigatório informar no rótulo dos produtos o conteúdo de gorduras *trans* totais considerando-se uma porção deste (BRASIL, 2003a). Contudo, era permitido declarar no rótulo a informação “não contém *trans*” se houvesse uma quantidade menor que 0,2 g por porção (BRASIL, 2003a). Em 2012 este limite passou a ser mais restritivo, mas ainda é possível declarar que o produto não contém gordura *trans* se houver menos que 0,1 g por porção (BRASIL, 2012). Ainda está especificado que é permitida uma variação de  $\pm 20\%$  no valor nutricional informado (BRASIL, 2003b). Vale mencionar ainda que a informação de AGT totais não especifica a composição destes AGT, o que pode trazer a falsa idéia ao consumidor que o alimento contém AGT prejudiciais à saúde, enquanto o alimento pode conter apenas AGT naturais ou uma mistura de AGT naturais e industriais.

Recentemente, em dezembro de 2019, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária aprovou novas regras para controlar a presença de AGT em alimentos no Brasil, através da Resolução da Diretoria Colegiada 332/2019 (BRASIL, 2019). A medida compreende 3 fases: na primeira, os AGT industriais presentes em óleos refinados deverão ser reduzidos a 2 % das gorduras totais até 1º de julho de 2021; na segunda fase que vigorará entre 1º de julho de 2021 e 1º de janeiro de 2023, este limite será estendido aos alimentos em geral, industrializados e comercializados no varejo e atacado. Por fim, a partir de 1º de janeiro de 2023 será implementada a terceira fase da ação, e os AGT de origem industrial deverão ser completamente banidos dos alimentos brasileiros.

Alguns estados e províncias internacionais já proibiram a utilização de óleos hidrogenados em alimentos e em muitos países a preocupação com este tipo de gordura é crescente (DOWNS; THOW; LEEDER, 2013). Nos Estados Unidos, em 2015, foi determinada a eliminação de toda gordura *trans* proveniente da utilização de gordura vegetal hidrogenada em alimentos produzidos no país num prazo de 3 anos, salvo em casos de autorização para usos específicos e com certos óleos parcialmente hidrogenados (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2015). No Canadá, o governo também impôs que toda gordura *trans* de

origem industrial fosse banida dos alimentos até setembro de 2018 (HEALTH CANADA, 2017). Recentemente, a Comissão Europeia também restringiu um máximo de 2 % de AGT (expresso em  $\text{g } 100\text{g}^{-1}$  gordura) em produtos alimentícios comercializados em toda Europa, com exceção a AGT naturais de origem animal (EUROPEAN COMMISSION, 2019).

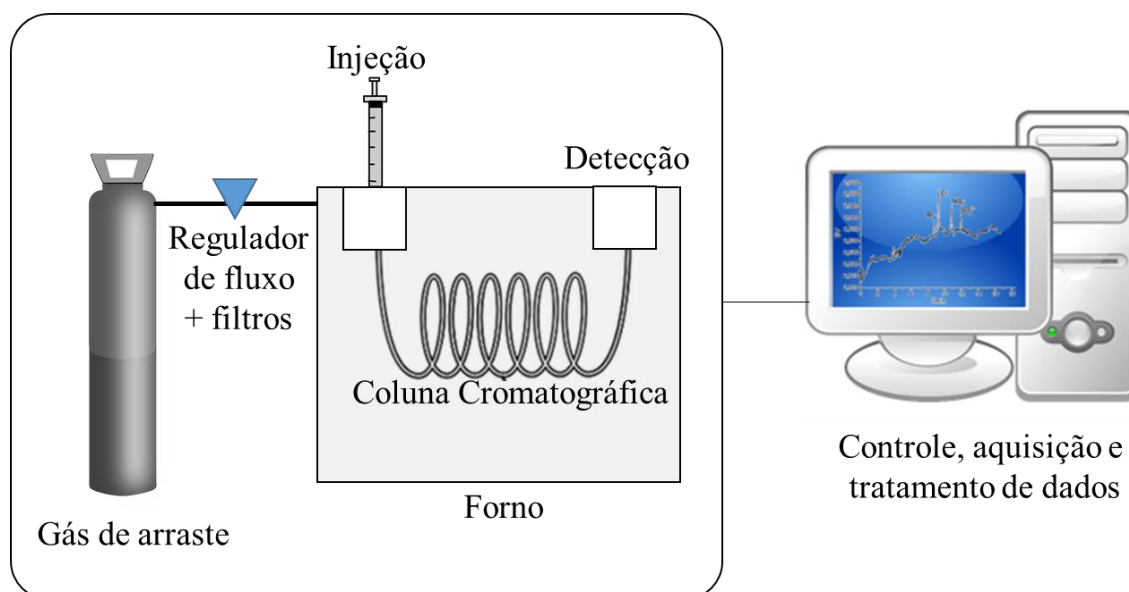
### 1.3 TÉCNICAS ANALÍTICAS

Diversas técnicas analíticas tem sido utilizadas para a determinação de AG em alimentos. Nesta subseção, será detalhada a GC, técnica clássica utilizada para esta abordagem, e a CE, principal técnica utilizada para o desenvolvimentos dos métodos analíticos para determinação de AGT.

#### 1.3.1 A Cromatografia Gasosa

GC é amplamente utilizada para determinação de AG em diversas matrizes. A técnica permite separar os componentes voláteis ou volatilizáveis de uma mistura que são transportados por uma fase móvel gasosa inerte através de uma coluna cromatográfica até o sistema de detecção. A separação dos analitos ocorre devido a dois fenômenos principais: pela interação diferenciada dos analitos pelos sítios ativos da fase estacionária contida na coluna cromatográfica e pela diferença dos pontos de ebulição dos compostos da mistura. A amostra injetada é vaporizada instantaneamente no interior do corpo do injetor, que está conectado com a entrada da coluna cromatográfica, e na saída desta, os analitos passam por um detector, onde ocorre a medição de alguma propriedade física para o registro de sinal (Figura 5) (HARVEY, 2000).

Figura 5 - Instrumentação de Cromatografia Gasosa



Fonte: Elaborado pela autora (2020).

A Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (do inglês, *Gas Chromatography with Flame Ionization Detector* – GC-FID) é a técnica empregada na maioria dos métodos de referência utilizados para análise de AG (AOAC, 2001; AOCS, 2017). Neste sistema de detecção, o efluente da coluna é dirigido para a chama formada por uma mistura de ar/hidrogênio e os compostos de carbono inseridos na chama são pirolisados. No momento da pirólise, a maioria dos compostos orgânicos produz íons e elétrons capazes de conduzir eletricidade. Um eletrodo localizado acima da chama, que aplica uma baixa tensão, serve para coletar íons e elétrons. A detecção consiste no monitoramento da corrente produzida pela coleta desses portadores de carga, que é medida por um pico-amperímetro. As medidas coletadas dão origem a um gráfico de intensidade do sinal versus tempo de retenção, chamado cromatograma (SKOOG *et al.*, 2005). Neste tipo de detecção, a identificação dos picos acontece por meio da comparação com padrões analíticos conhecidos.

Na Cromatografia Gasosa com Detecção por Espectrometria de Massas (do inglês, *Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detector* – GC-MS), a identificação dos compostos separados na coluna cromatográfica se dá por meio de suas razões massa e carga ( $m/z$ ), e também por meio dos fragmentos de ionização da molécula. Essa técnica é especialmente útil para identificação dos picos sem a necessidade de padrões analíticos, mas também pode ser utilizada para o estudo quantitativo (LA NASA *et al.*, 2018).

### 1.3.1.1 A determinação de ácidos graxos por Cromatografia Gasosa

Os AG são encontrados em alimentos majoritariamente na forma de triacilgliceróis, apesar de também ser encontrados em sua forma livre em pequenas quantidades. Entretanto, não é muito comum analisar triacilgliceróis por GC devido as suas altas massas moleculares, já que esta análise requer colunas especiais que suportam temperaturas muito elevadas e com curto tempo de vida. Neste caso, o preparo da amostra envolve apenas diluição em solvente orgânico apropriado, mas a precisão da análise não é tão alta quanto na determinação de AG livres e esta abordagem é inapropriada para amostras complexas e altamente insaturadas. Por outro lado, a análise de AG livres é possível através de uma coluna especial que não permita a adsorção dos grupos carboxila ativos dos AG na fase estacionária. Altas temperaturas também devem ser suportadas. Nesta abordagem, pode-se empregar uma diluição da amostra em solvente orgânico apropriado para quantificação dos AG livres na amostra ou determinar os AG livres totais após a hidrólise dos triacilgliceróis (SEMINÁRIO AGILENT, 2019)

O método mais comum para se determinar AG por GC envolve hidrólise dos triacilgliceróis e metilação dos AG, para se formar metil ésteres de AG. Entretanto, a formação de outros ésteres homólogos, *e.g.*, etil ou propil, pode ser realizada. Essa derivatização é geralmente empregada para se obter compostos de menor polaridade, com menor ponto de ebulição, e pode ser realizada empregando-se catálise ácida ou básica, dependendo do tipo de amostra (CHRISTIE, 1993).

Existem basicamente dois mecanismos para esta reação: o primeiro envolve a hidrólise alcalina dos AG dos lipídios complexos, como triacilgliceróis, através de saponificação, onde a ligação éster entre o AG e a fração glicerol é clivada sob condições de temperatura elevada e na presença de um forte reagente alcalino. Na sequência, é realizada uma etapa de metilação tipicamente realizada na presença de um catalisador ácido em metanol. O segundo mecanismo envolve a transesterificação direta através de catalisadores alcalinos ou ácidos em um processo em que o álcool nativo (glicerol) é deslocado do lipídeo por outro álcool em grande excesso molar sob condições anidras (ALDAI *et al.*, 2005).

Muito cuidado deve ser tomado na escolha do processo de derivatização a ser usado e na realização do mesmo, pois problemas comuns são relatados e podem afetar a precisão e exatidão da análise. Dentre eles, a perda de ésteres de AG de cadeia curta muito voláteis ou de AG insaturados que podem sofrer oxidação; a incompleta conversão de AG em ésteres (geralmente devido à presença de água); a alteração do perfil original de AG, devido a reações



intermediárias que interferem na proporção de diferentes isômeros posicionais ou geométricos; a formação de artefatos que podem ser erroneamente identificados como AG ou ainda a contaminação e dano da coluna por amostras que não sofreram uma purificação adequada (ALDAI *et al.*, 2005).

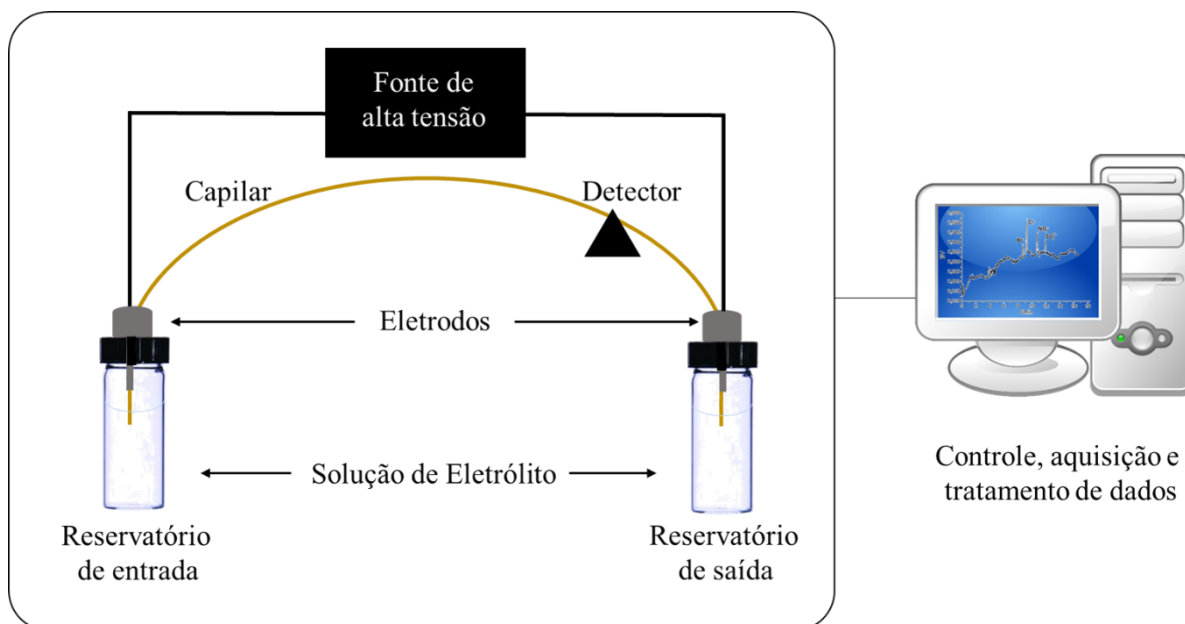
Além disso, é importante mencionar que o preparo de amostras para análise em GC geralmente requer uma etapa prévia de extração lipídica da amostra, quando esta não se encontra na forma de óleo ou gordura. Alguns métodos tradicionais na literatura para extração lipídica com solventes são: Folch, Lee e Stanley, que emprega como solução extratora uma solução de clorofórmio e metanol, na proporção de 2:1; Bligh e Dyer, que utiliza clorofórmio e metanol na proporção de 1:1, e Hara e Radin, que emprega hexano e isopropanol na proporção de 3:2 (BLIGH; DYER, 1959; FOLCH; LEE; STANLEY, 1957; HARA; RADIN, 1978).

Quanto as colunas para separação de ésteres de AG, as mais empregadas para a separação dos isômeros *cis* e *trans*, incluindo a separação de isômeros posicionais, são as de ciano-polissiloxano altamente polares. Estas são as colunas recomendadas por métodos referências de análises, como AOAC 996.06 e AOCS Ce 1j-07 (AOAC, 2001; AOCS, 2017).

### 1.3.2 A Eletroforese Capilar

CE é uma técnica de separação que opera em capilares e meio líquido. Pode ser utilizada para separação de compostos neutros, ionizáveis e íons solvatados, mediante aplicação de um potencial elétrico em eletrodos localizados nas extremidades do capilar, como ilustrado na Figura 6. A detecção é geralmente realizada na própria coluna. Quando os compostos alcançam a janela do detector, este registra o sinal na forma de picos e um gráfico de sinal em função do tempo de migração, chamado de eletroferograma, é obtido. Vários detectores são compatíveis com a técnica como: Amperométrico, Condutométrico, Fluorimétrico, por Espectroscopia na Região do Ultravioleta (UV) ou Visível e Espectrometria de Massas (VAZ; OLIVEIRA; DE OLIVEIRA, 2015).

Figura 6 - Instrumentação de Eletroforese Capilar



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Vários modos de separação são possíveis utilizando-se o mesmo equipamento, como Eletroforese Capilar de Zona (do inglês, *capillary zone electrophoresis* – CZE); Isotacoforese Capilar; Cromatografia Eletrocínética; Eletroforese Capilar de Afinidade; Eletroforese Capilar de Peneiramento; Eletroforese Capilar em Gel; Focalização Isoelétrica Capilar; Cromatografia Eletrocínética Micelar; Cromatografia Eletrocínética em Microemulsão e Eletrocromatografia Capilar, o que mostra a versatilidade da técnica para diversas aplicações. Separações por CE podem acontecer devido a uma diferença na mobilidade dos analitos, aos diferentes tamanhos ou geometria das moléculas, as diferentes cargas, por diferença de hidrofobicidade, dentre outros mecanismos (ALBERTO *et al.*, 2007).

Em CZE, o modo de CE abordado neste estudo, a migração dos compostos carregados acontece ao aplicar um potencial nas extremidades do capilar, preenchido com uma solução de eletrólito adequada, geralmente constituída por um tampão (podendo conter também solventes orgânicos e outros aditivos). Os solutos são separados de acordo com as diferentes mobilidades aparentes ( $\mu_{AP}$ ) resultantes da diferença entre as mobilidades dos íons, *i.e.* mobilidades eletroforéticas ( $\mu_{ELE}$ ) e a mobilidade do fluxo, *i.e.* mobilidade eletroosmótica ( $\mu_{OSM}$ ). A  $\mu_{ELE}$  é característica para cada composto e é definida pela Equação 1, onde  $q$  é a carga iônica do analito,  $\eta$  é a viscosidade da solução e  $r$  é o raio do analito solvatado (SPUDEIT; DOLZAN;

MICKE, 2012). Observa-se que quanto maior a carga e menor o raio do analito solvatado, bem como a viscosidade da solução, maior a  $\mu_{ELE}$ .

Equação 1

$$\mu_{ELE} = \frac{q}{6\pi\eta r}$$

A  $\mu_{OSM}$  é definida pela Equação 2 e é a razão da velocidade linear do fluxo eletroosmótico ( $v$ ) pelo campo elétrico aplicado ( $U$ ), ou ainda a razão do produto da constante dielétrica ( $\epsilon$ ), da permissividade do vácuo ( $\epsilon_0$ ) e do potencial zeta ( $\zeta$ ) por  $\eta$  (TAVARES, 1996).

Equação 2

$$\mu_{OSM} = \frac{v}{U} = \frac{\epsilon \cdot \epsilon_0 \zeta}{\eta}$$

O fluxo eletroosmótico induzido pelo campo elétrico é consequência da interação entre o eletrólito e a superfície interna do capilar, que contém grupos silanóis passíveis de ionização em  $\text{pH} > 2$ . À medida que os grupos silanóis vão sendo ionizados, a superfície interna do capilar torna-se negativamente carregada, e ao se aplicar uma tensão nas extremidades do capilar, forças elétricas causam um movimento unilateral de íons em direção ao catodo (polo negativo). O fluxo eletroosmótico é caracterizado por um perfil radial constante no interior do capilar devido ao fluxo ser induzido por tensão, o que contribui para separações de alta eficiência com a menor difusão dos analitos. Diferentemente, técnicas cromatográficas em meio líquido apresentam uma variação parabólica para o perfil radial da velocidade dentro da coluna cromatográfica devido ao fluxo ser induzido por pressão, o que geralmente causa um alargamento da banda e contribui para separações menos eficientes (TAVARES, 1997).

Ainda é válido mencionar que apesar do modo de CZE ter sido abordado nesta tese para separação de AG, o potencial de vários outros modos de eletroforese já foram demonstrados, como por exemplo, da Cromatografia Eletrocínética Micelar (SOLIMAN *et al.*, 2013) e da Eletrocromatografia Capilar (DERMAUX *et al.*, 1998).

No que diz respeito a detecção baseada na absorvância por luz na região do UV ou visível, esta é muito utilizada quando:

a) os compostos possuem absorvância molar suficiente para detecção direta;

- b) os analitos podem ser derivatizados para que absorvam em algum comprimento de onda específico e sejam detectados diretamente;
- c) se pode empregar um eletrólito com algum agente cromóforo e os analitos possam ser detectados indiretamente.

Na detecção direta, quando um íon passa pelo detector, parte da luz emitida por este é absorvida pela amostra e a outra parte é detectada por um fotodetector, geralmente, um fotodiodo. Um eletroferograma com picos positivos é então observado. Na detecção indireta, analitos com baixa absorvidade são analisados por CE mediante o uso de um tampão cromóforo ou a adição de um agente cromóforo ao eletrólito. Um sinal intenso e constante é observado no detector devido a este cromóforo presente no eletrólito e a absorvidade molar deste ânion cromóforo é deslocada, negativamente, quando o analito cruza a janela de detecção, sendo visualizados picos negativos no eletroferograma (GROSCHE, 2000).

A desvantagem em se utilizar a detecção indireta é que a sensibilidade é geralmente reduzida quando comparada com a detecção direta. Entretanto, métodos para quantificação de AG foram desenvolvidos para muitas aplicações com este sistema de detecção. Ademais, vale mencionar que a detecção por absorção na região do UV/visível é um dos sistemas de detecção mais utilizados em CE, devido ao fato de a maioria dos equipamentos comerciais estarem disponíveis com este sistema de detecção (AMORIM; DE OLIVEIRA, 2020).

A detecção por espectrometria de massas é uma técnica em potencial para identificação de compostos separados por CE, entretanto, seu uso para determinação de AG ainda é bastante restrito na literatura, principalmente devido as limitações de eletrólitos, que devem ser altamente voláteis, o que restringe o uso de certos tampões, surfactantes e ciclodextrina não voláteis, por exemplo, comumente utilizados para detecção por UV. Entretanto, alguns trabalhos podem ser mencionados nesta área, como os de Azab e colaboradores (AZAB; RITCHIE; BRITZ-MCKIBBIN, 2019; AZAB, *et al.*, 2020), que abordaram a quantificação de AG saturados e insaturados em matrizes biológicas, e o estudo de Lee e colaboradores (LEE *et al.*, 2017), que abordaram a quantificação de AG saturados de 2 a 22 carbonos em amostras de queijo e café.

### 1.3.2.1 A determinação de ácidos graxos por Eletroforese Capilar

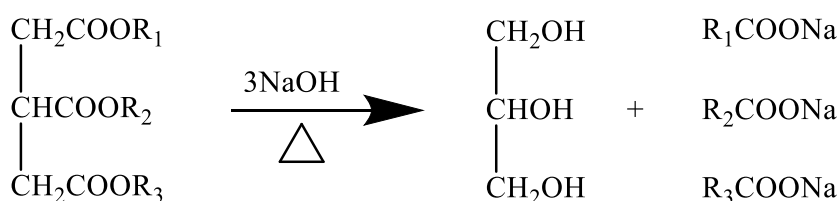
A determinação de AG por CE geralmente é realizada utilizando-se um eletrólito contendo uma solução tampão com pH acima dos pKas dos AG, que são de aproximadamente

5, para análise dos analitos como ânions. Adicionalmente, solventes orgânicos são adicionados ao eletrólito, para que os analitos se solubilizem no tampão aquoso, já que são compostos altamente hidrofóbicos; e algum seletor como ciclodextrinas e/ou surfactantes também é usualmente considerado.

Os AG saturados que possuem baixa absorvidade molar podem ser analisados com detecção indireta, a partir de adição de algum agente cromóforo no eletrólito, ou com detecção direta após derivatização. Já os AG insaturados, que possuem suficiente absorvidade molar devido à presença de ao menos uma ligação dupla, podem ser analisados por detecção direta no UV no intervalo de comprimento de onda entre aproximadamente 200 e 250 nm (DE OLIVEIRA, *et al.*, 2016). Este último modo de detecção foi utilizado nesta tese para a determinação de AGT e AG  $\omega$ -3, já que estes são insaturados.

No que diz respeito a etapa de preparo da amostra, uma reação de saponificação é geralmente empregada. Uma base forte como NaOH dissolvida em metanol é utilizada para hidrólise alcalina dos triacilgliceróis utilizando-se aquecimento (70-80 °C) e refluxo, resultando na formação de glicerol e sais de AG, como mostrado na Figura 7. Essa reação pode ser catalisada por ácido, base ou enzimas, mas também ocorre como uma reação não catalisada entre gordura e água dissolvida em temperaturas (~250 °C) e pressões (2–6 MPa) adequadas (SCRIMGEOUR, 2005).

Figura 7 - Reação de saponificação de um triacilglicerol



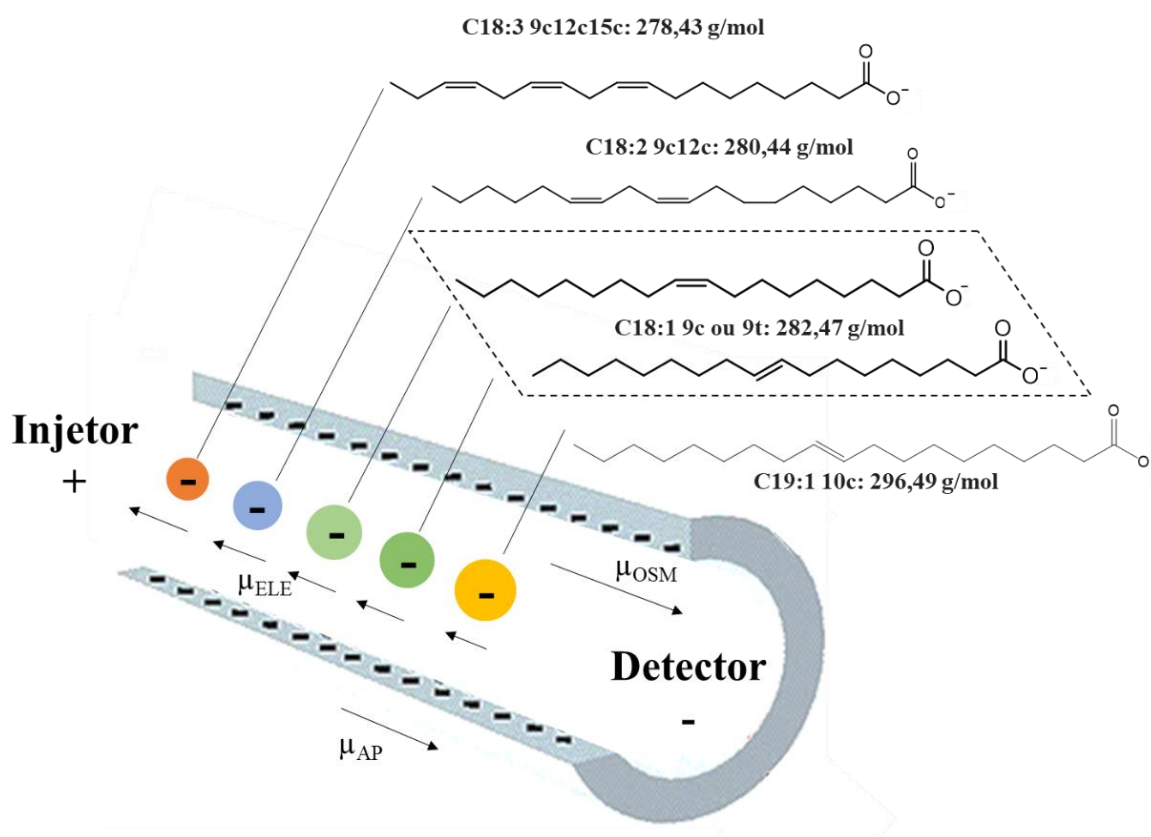
Fonte: Elaborada pela autora (2020).

A eficiência da saponificação para preparo de diversas matrizes alimentícias foi reportada em vários métodos analíticos na literatura, quando objetivou-se a quantificação de AGT totais. Entretanto, em alguns métodos, foi reforçada a necessidade de uma etapa prévia de extração lipídica para certas amostras (PORTO *et al.*, 2015; PORTO; SOUZA; DE OLIVEIRA, 2011). Alguns autores ainda reportaram a etapa de preparo de amostras consistindo em apenas uma diluição, quando se almejou detectar apenas os AG livres, como em alguns estudos onde

se objetivou a determinação de acidez em óleos vegetais (BALESTEROS *et al.*, 2007; SATO *et al.*, 2014).

Adicionalmente, é válido mencionar que a separação dos AG de cadeia longa, foco deste estudo, por CZE geralmente ocorre em contrafluxo. Os compostos são analisados como ânions de mesma carga (-1). Com aplicação de um potencial positivo no eletrodo de entrada da amostra, os ânions tendem a migrar para o ânodo (polo positivo). Entretanto, as  $\mu_{ELE}$  dos analitos são geralmente baixas (compostos de massa molecular alta) e menores que  $\mu_{OSM}$ , resultando num vetor de  $\mu_{AP}$  no sentido do cátodo (polo negativo). Assim, migra primeiro aquele analito que apresenta menor  $\mu_{ELE}$  e portanto, resiste menos ao fluxo (VAZ; OLIVEIRA; DE OLIVEIRA, 2015). Na Figura 8 é ilustrado um esquema simplificado de migração em contra fluxo dos AG abordados na seção 3 desta tese (C18:1 9c, C18:1 9t, C18:2 9c12c, C18:3 9c12c15c e C19:1 10c, utilizado como padrão interno).

Figura 8 - Migração em contra fluxo dos ácidos graxos C19:1 10c, C18:1 9t, C18:1 9c, C18:2 9c12c, C18:3 9c12c15c



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Devido a versatilidade da técnica, este não é o único modo possível quando se objetiva a separação de AG. Buglione; See; Hauser (2013), por exemplo, propuseram um método onde um capilar especial foi utilizado para supressão do fluxo eletroosmótico e um potencial negativo foi aplicado ao eletrodo de entrada da amostra. Assim, os AG migraram no sentido anódico e AG com cadeias carbônicas menores foram detectados primeiro. Já no estudo de Breadmore *et al.* (2007), a migração dos AG também ocorreu em sentido anódico, pois um pH 2.2 proporcionou a supressão do fluxo. Neste caso, Cromatografia Eletrocinética Micelar foi usada para separação dos analitos neutros.

## 2 OBJETIVOS

Nesta seção serão apresentados os objetivos gerais e específicos deste estudo.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar métodos analíticos para a determinação de AGT do ácido octadecenóico em matrizes alimentícias (totais e isoméricos posicionais) empregando-se Eletroforese Capilar de Zona com Detecção Direta por Absorção na Região do UV (do inglês, *Capillary Zone Electrophoresis with Direct Absorption Detection in the Ultraviolet Region, CZE-UV*). Em adição, pretende-se avaliar métodos alternativos para determinação de outros AG em alimentos, com o emprego de técnicas eletroforéticas, cromatográficas e espectroscópicas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar um método para quantificação de AGT totais do ácido octadecenóico empregando-se CZE-UV, investigando-se a possibilidade de uma análise ultra rápida, com a finalidade de se propor um método mais rápido do que os existentes para quantificação destes AG em matrizes alimentícias;

- Desenvolver um método para separação dos isômeros posicionais *trans* do ácido octadecenóico majoritários em alimentos empregando-se CZE-UV, com a finalidade de se propor um método para detecção de AGT industriais, expressos pelo ácido elaídico, em amostras lácteas contendo naturalmente o ácido vacênico;

- Avaliar novos métodos para determinação de outros AG em alimentos envolvendo outras abordagens com CE, técnicas cromatográficas (GC-FID, GC-MS, Cromatografia em Camada Delgada, do inglês, *Thin-layer Chromatography - TLC*) e espectroscópicas (Espectroscopia Raman, ATR-FTIR e NMR).



### 3 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS *TRANS* TOTAIS DO ÁCIDO OCTADECENÓICO POR ELETROFORESE CAPILAR

A utilização de CE na determinação de AGT tem objetivado aumentar a frequência analítica, diminuir o custo operacional e a quantidade de reagentes e solventes utilizados, além de empregar um preparo de amostras mais simples que GC, a técnica clássica utilizada para determinação de AGT em várias matrizes alimentícias e geralmente indicada em métodos de referência ou oficiais. Apesar da alta capacidade de picos, sensibilidade e repetibilidade, GC apresenta alguns inconvenientes para a determinação de AG, incluindo a pouca volatilidade dos AG de cadeia longa que apresentam altos pontos de ebulição e demandam etapa reacional de derivatização para gerar metil ésteres (ou homólogos) mais voláteis; o uso de colunas cromatográficas específicas e extensas e um longo tempo de corrida, o que torna a análise mais laboriosa, demorada e onerosa.

Nenhum método oficial está disponível atualmente para a determinação de AG em alimentos com o emprego de CE. Entretanto, o potencial da técnica para análise de alimentos foi demonstrado recentemente com a inclusão de um método por CZE-UV para a determinação de nitratos e nitritos em produtos cárneos e pescados no manual de métodos oficiais para análise de alimentos de origem animal do Ministério da Agricultura e da Pecuária (2019).

Apesar da menor capacidade de picos, quando a obtenção do perfil completo dos AG não é necessária e informações específicas de AG ou grupos de AG são suficientes, como é o caso dos AGT, ou em matrizes alimentícias menos complexas, a CZE-UV pode ser empregada em substituição à GC. Na literatura são encontrados alguns métodos por CE para a quantificação de AGT totais do ácido octadecenoico envolvendo detecção indireta por absorção na região do UV (CASTRO BARRA *et al.*, 2010, 2012, 2013; DE OLIVEIRA *et al.*, 2003) detecção condutométrica sem contato (WONG; SAAD; MAKAHLEH, 2013; WU; GE; QIN, 2014) e detecção direta por absorção na região do UV (PORTO *et al.*, 2015).

Entretanto, percebe-se que ainda pode-se desenvolver métodos novos ainda mais rápidos e eficientes para atender a demanda de indústrias e agências regulamentadoras no monitoramento dos AGT. Neste contexto, inicialmente será abordada a otimização de um método por CZE-UV para quantificação rápida de AGT totais do ácido octadecenoico. Este método possui potencial aplicação para o monitoramento de AGT em matrizes alimentícias e verificação de rotulagem nutricional, onde não é necessária uma discriminação dos AGT de origem natural e industrial.

É válido mencionar que foram considerados AGT do ácido octadecenóico pois estes compreendem o grupo majoritário de AGT encontrados na dieta humana, sendo os únicos representantes dos AGT em algumas matrizes. Outros monoenois com diferentes tamanhos de cadeia carbônica (C16-C20) podem ser encontrados principalmente na gordura do leite, mas estão presentes em baixos níveis (< 0,5 %). Além disso, seus efeitos na saúde são pouco conhecidos (GÓMEZ-CORTÉS; JUÁREZ; DE LA FUENTE, 2018).

### 3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta subseção serão apresentados os materiais necessários para a realização dos experimentos, o desenho experimental utilizado, os protocolos para preparo das amostras e as condições instrumentais utilizadas para análises, bem como o procedimento de validação analítica adotado.

#### 3.1.1 Padrões, reagentes, solventes, soluções e amostras

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico. Água foi purificada por osmose reversa no sistema Quimis (São Paulo, SP, Brasil). Acetonitrila, ácido acético glacial, sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), hexano, isopropanol, metanol, hidróxido de sódio (NaOH) e tetraborato de sódio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Polyoxietileno 23 lauril éter (Brij<sup>®</sup> 35), padrões de AG para análises por CE e a mistura certificada com padrões de referência Supelco 37, contendo 37 metis ésteres de AG utilizado nas análises em GC, foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A solução de metóxido de sódio ( $\text{CH}_3\text{NaO}$ ) usada para transesterificação foi adquirida da Fluka (St. Louis, MO, EUA). Capilares de sílica fundida foram adquiridos da Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, EUA).

Soluções estoques individuais dos padrões de AG foram preparados na concentração de  $20,0 \text{ mmol L}^{-1}$  dissolvendo-se as quantidades apropriadas destes em metanol. Soluções padrões em concentrações intermediárias também foram preparadas por conveniente diluição das soluções estoque em metanol. Todas soluções de padrões foram mantidas em freezer a  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  até o momento das análises. Soluções de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  ( $100,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), Brij<sup>®</sup> 35 ( $50,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ), NaOH ( $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) e  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) foram preparadas em água deionizada.

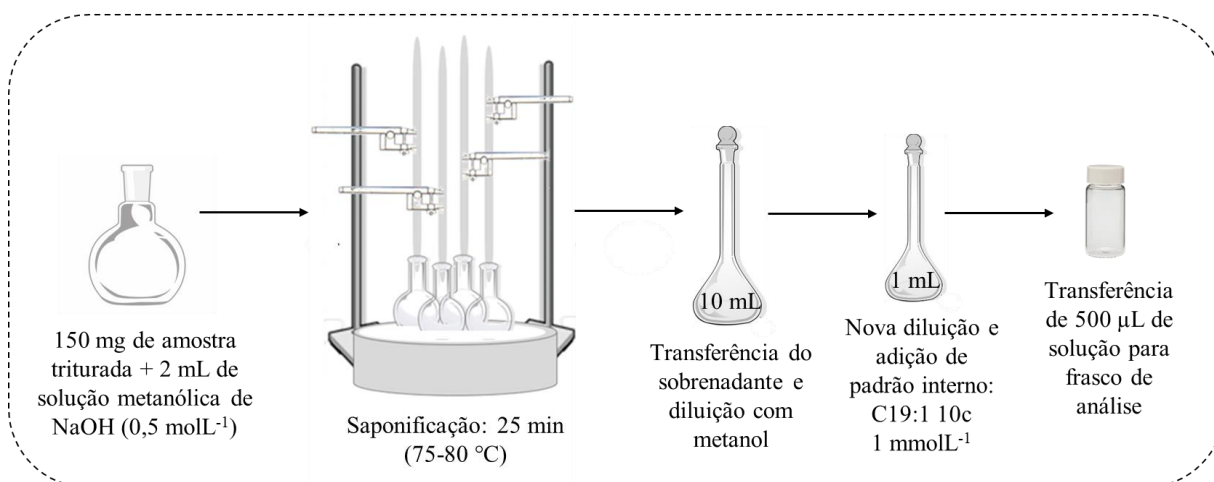
A solução extratora utilizada para extração lipídica foi preparada por adição de três partes de hexano a 2 duas partes de isopropanol numa proveta de 50 mL. Solução estoque de Brij<sup>®</sup> 35 foi guardada sob refrigeração a 4 °C para prevenir formação de mofo e foi usada por no máximo 15 dias depois de preparada. Solução de NaOH (0,5 mol L<sup>-1</sup>) utilizada para saponificação dos AG foi preparada em metanol. A solução de eletrólito foi preparada de modo a se obter 12 mmol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O, 12 mmol L<sup>-1</sup> de Brij<sup>®</sup> 35, 33 % v/v metanol e 17 % v/v acetonitrila em balão de 5,00 mL. Antes do uso, a solução foi levada ao banho ultrassônico por 10 minutos para eliminar bolhas de ar.

Amostras de alimentos industrializados contendo gordura vegetal hidrogenada (informação do rótulo) foram compradas em mercados locais (Juiz de Fora, MG, Brasil) e diferentes matrizes foram escolhidas para mostrar a aplicabilidade do método. As amostras analisadas tanto por CZE-UV quanto por GC-FID para validação do método foram: “mistura para bolo”, “palitos de wafer”, “rosquinhas de coco” e “biscoitinhos de goiabada”. Em algumas destas amostras, também foi declarada a presença de leite. Outras amostras, como queijo e leite em pó também foram analisadas, para mostrar a aplicabilidade do método para matrizes contendo AGT de origem natural, essencialmente. A amostra de queijo foi adquirida em mercado local e as amostras de leite em pó foram cedidas por uma indústria de lácteos (Piracanjuba, Brasil).

### 3.1.2 Preparo de amostras para Eletroforese Capilar

150 mg de cada amostra triturada (quando sólida) foi saponificada separadamente em balões de fundo chato com 2,0 mL de uma solução metanólica de NaOH (0,5 mol L<sup>-1</sup>) em banho térmico com refluxo (75–80 °C) por 25 min. Então, o conteúdo contido nos frascos de saponificação foi coletado com uma pipeta e filtrado com papel de filtro em um balão volumétrico âmbar de 10,00 mL, posteriormente avolumado com metanol. Antes da injeção, 500 µL da solução de “mistura para bolo”; 150 µL da solução de “palitos de wafer”, 500 µL da solução de “rosquinha de coco”, 500 µL da solução de “biscoitinhos de goiabada”, 300 µL da solução de leite em pó e 150 µL da solução de queijo foram diluídos separadamente em balões volumétricos de cor âmbar de 1,00 mL contendo 1,0 mmol L<sup>-1</sup> do ácido 10-*cis*-nonadecenoico (C19:1 10*c*), utilizado como padrão interno. Em seguida uma alíquota de 500 µL de cada solução foi transferida para frascos de análise âmbar e imediatamente analisados por CZE-UV (Figura 9).

Figura 9 - Preparo de amostras industrializadas contendo gordura vegetal hidrogenada em sua composição



Fonte: Adaptado de Amorim; Porto; de Oliveira (2017), com permissão da Royal Society of Chemistry.

### 3.1.3 Preparo de amostras para Cromatografia Gasosa

GC-FID foi utilizada para verificar a exatidão e especificidade do método desenvolvido por CZE-UV. As amostras foram analisadas, após extração da gordura e procedimento de transesterificação para conversão dos AG em metil ésteres. A extração lipídica foi feita de acordo com o método de Hara e Radin (HARA; RADIN, 1978) adaptado por Porto *et al.* (2015) (Figura 10) e a transesterificação dos AG foi feita de acordo com o método por catálise básica disponível na literatura (CHRISTIE, 1993), como mostrado na Figura 11.

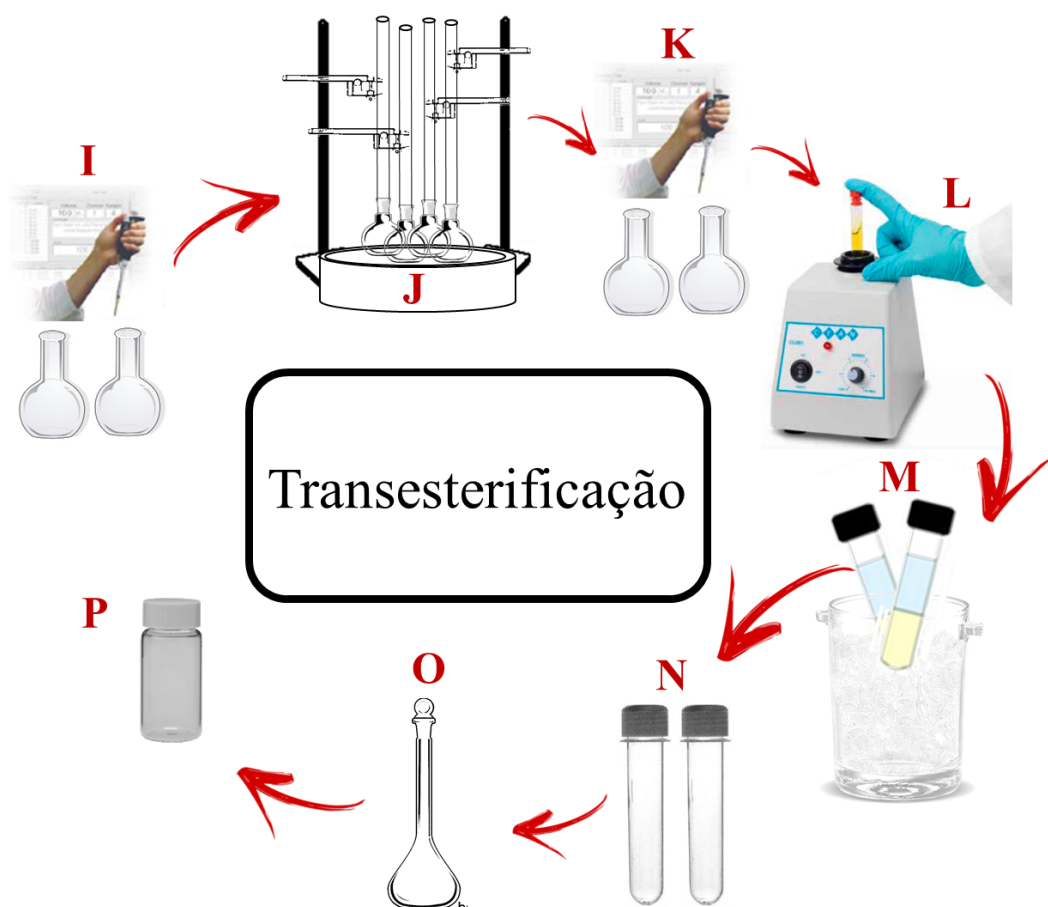
Figura 10 - Extração lipídica empregada para análise por Cromatografia Gasosa



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

A) pesou-se cerca de 0,5 g de cada amostra em um tubo de vidro e adicionou-se 3,75 mL de solução extratora (solução de hexano e isopropanol na proporção de 3:2) e 2,5 mL de solução de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ( $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ); B) após agitação manual, levou-se o tubo ao ultrassom por 10 minutos; C) agitou-se em vórtex por 1 minuto; D) deixou-se o tubo em repouso em banho de gelo até a separação das fases; E) transferiu-se o sobrenadante para uma proveta e lavou-se a mistura anterior mais duas vezes com 2,5 mL de solução extratora em cada etapa; F) acertou-se o volume para 10,00 mL com hexano; G) dividiu-se o extrato resultante em dois balões de fundo chato previamente pesados; H) evaporou-se o solvente em evaporador rotativo a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  e pesou-se novamente o balão para verificar a quantidade de gordura extraída.

Figura 11 - Transesterificação empregada após etapa de extração lipídica para análise por Cromatografia Gasosa



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

I) adicionou-se 2,0 mL de solução metanólica de  $\text{CH}_3\text{NaO}$  ( $0.5 \text{ mol L}^{-1}$ ) nos balões contendo a fração lipídica; J) aqueceu-se os balões sob refluxo em banho térmico por 10 minutos a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ ; K) desligou-se o banho, esperou-se esfriar a solução e então adicionou-se  $100 \text{ }\mu\text{L}$  de ácido acético glacial a fim de neutralizar a solução, seguidos de 5,0 mL de água deionizada e 3,0 mL de hexano; L) transferiu-se o conteúdo para um novo tubo com tampa e agitou-se em vórtex; M) deixou-se o tubo em repouso em banho de gelo até a separação das fases; N) transferiu-se a fase superior para outro tubo e a mistura anterior foi lavada mais uma vez com 3 mL de hexano. Adicionou-se então 1,0 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro para secar qualquer resíduo de água da solução de ésteres de AG; O) Filtrou-se o conteúdo para um balão volumétrico de 10,00 mL e aferiu-se o menisco com hexano. P) Antes da injeção no equipamento de Cromatografia Gasosa, transferiu-se o conteúdo para um frasco de análise e o mesmo foi analisado sem diluição.

### 3.1.4 Instrumentação para Eletroforese Capilar

Os experimentos foram conduzidos em um equipamento de CE da Agilent Technologies modelo CE7100 (Palo Alto, CA, EUA), disponível nas dependências do departamento de química da Universidade Federal de Juiz de Fora, equipado com detector UV por arranjo de diodos. O controle do sistema, a aquisição e o tratamento de dados foram realizados através do HP Chem Station (Rev.06.01). Nas condições otimizadas, os experimentos foram realizados à temperatura controlada no interior do cartucho em 30 °C, injeção hidrodinâmica (25,0 mbar por 5 s), polaridade positiva na extremidade de injeção de 27 kV, capilar de sílica fundida com revestimento transparente modelo TSU com 33,5 cm de comprimento total (25 cm de comprimento efetivo), 50 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. A detecção foi feita no comprimento de onda de 200 nm, com frequência de aquisição de dados de 5 Hz. A solução de eletrólito foi composta por 12 mmol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O, 12 mmol L<sup>-1</sup> de Brij<sup>®</sup> 35, 33 % v/v metanol e 17 % v/v acetonitrila. O condicionamento do capilar em seu primeiro uso foi feito mediante lavagem com pressão de 25 mbar com solução de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> por 40 min, seguido por água deionizada por 20 min e solução de eletrólito por 30 min. Capilares já pré-condicionados eram lavados com NaOH, água e eletrólito por 15 min cada. Entre corridas foi feito um condicionamento breve pela injeção de solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> (3 min), água deionizada (2 min) e eletrólito (3 min). No final das análises, o capilar foi lavado com solução de NaOH e água por 10 min cada, seguido de uma injeção de ar por 5 min.

### 3.1.5 Instrumentação para Cromatografia Gasosa

As análises foram realizadas em um GC-FID Ciola Gregori Ltda modelo CG1000 (São Paulo, SP, Brasil) com integrador DANI DS 1000 da Dani Strumentazione Analitica (Monza, LOM, Itália) e sistema de aquisição de dados IQ3, localizado no departamento de farmácia da Universidade Federal de Alfenas. A coluna de sílica fundida utilizada foi a CP-SIL 88 da Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EUA) com dimensões: 100 m x 0,25 mm x 0,2 µm, contendo fase estacionária 88 % cianopropil 12 % arilpolisiloxano. As condições cromatográficas utilizadas foram: volume de injeção de 1,0 µL com razão de injeção 1:100; injetor e detector à 240 °C; fluxo do gás de arraste (H<sub>2</sub>) de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, temperatura programada iniciando em 100 °C por 5,0 minutos e razão de aquecimento de 4 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, mantendo por 20 minutos.

### 3.1.6 Desenho experimental

O estudo das condições instrumentais foi realizado através de um planejamento experimental do tipo fatorial completo  $3^2$  com triplicata no ponto central, tendo como fatores os parâmetros temperatura e tensão, nos níveis indicados na matriz de contraste (Tabela 2).

Tabela 2 - Matriz de contraste para o planejamento fatorial  $3^2$  com triplicata no ponto central

Experimentos	Temperatura	Tensão
A	-1	-1
B	0	-1
C	1	-1
D	-1	0
E*	0	0
F	1	0
G	-1	1
H	0	1
I	1	1

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Temperatura: (-1) 24 °C, (0) 27 °C, (1) 30 °C;

Tensão: (-1) +24 kV, (0) +27 kV, (1) +30 kV

\*Experimento correspondente ao ponto central, realizado em triplicata

A injeção foi considerada com comprimentos efetivos de capilar de 8,5 e 25,5 cm. Outros parâmetros foram mantidos fixos, como detalhado na subseção 3.1.4 (página 53). Selecionou-se como resposta para os experimentos o cálculo da resolução estatística cromatográfica (REC, Equação 3), que considera a resolução de todos os picos simultaneamente e de forma ponderada com o tempo de migração e número de picos. Adotou-se como resolução mínima  $R_{min} = 1,5$  e como resolução ótima  $R_{otm} = 2,0$ . Na expressão,  $n$  indica o número de picos,  $t$  o tempo de migração do último AG, e  $R_{i, i+1}$ , é a resolução entre os pares de picos adjacentes.

Equação 3

$$REC = \left\{ \sum_{i=1}^{n-1} \left[ \frac{(R_{i,i+1} - R_{otm})^2}{(R_{i,i+1} - R_{2,i,i+1,min})} \right] + \sum_{i=1}^{n-1} \frac{R_{i,i+1}^2}{(n-1) R_{av}^2} \right\} \frac{t}{n}$$

A resolução entre os pares de AG foi calculada através da Equação 4, onde  $t$  é o tempo de migração de cada um dos AG e  $w$  é largura do pico medido na linha de base.



Equação 4

$$R = \frac{2(t_{AGi} - t_{AGi+1})}{w_{AGi} - w_{AGi+1}}$$

O estudo do preparo de amostras compreendeu o procedimento de hidrólise alcalina dos triacilgliceróis, descrito no item 3.1.2, com massas variáveis de 150 a 1000 mg.

### 3.1.7 Identificação, quantificação dos ácidos graxos e validação analítica

Os AG foram identificados por CZE-UV através de comparação do tempo de migração nas amostras com o tempo de migração de padrões analíticos de AG. A quantificação do teor de AGT totais do ácido octadecenóico (expressos em g 100g<sup>-1</sup> amostra) foi feita através de curva analítica, construída usando o padrão C18:1 9t em concentrações de 0,3, 0,6, 0,9, 1,2, e 1,5 mmol L<sup>-1</sup> e concentração fixa do padrão interno, C19:1 10c, de 1 mmol L<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados aleatoriamente e em triplicatas genuínas. A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner (similar ao teste de Shapiro-Wilk) e a homocedasticidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Cochran. Para o teste de normalidade, utilizou-se o Minitab versão 14.

A identificação das amostras por GC foi mediada pela comparação com o tempo de retenção de uma mistura de 37 metis ésteres de AG (FAME 37, Supelco) e a quantificação foi realizada por normalização de área.

O teste de exatidão compreendeu a comparação dos resultados das análises feitas em duplicatas autênticas por CE e GC através de test-t pareado paramétrico (realizada no Minitab versão 14). A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner.

A especificidade do método foi avaliada comparando-se os perfis eletroforéticos e cromatográficos das amostras, de modo a verificar se o método era capaz de distinguir os AGT totais do ácido octadecenóico de outros AG presentes nas matrizes alimentícias avaliadas.

A precisão instrumental foi verificada através da injeção de uma mistura de padrões em quadruplicata nas condições otimizadas. Foram calculados os desvios-padrão relativos considerando-se tempo de migração, área e altura do pico.

A robustez foi avaliada medindo-se a resolução dos pares de AG quando os parâmetros temperatura e tensão foram variados, através do planejamento fatorial completo do tipo 3<sup>2</sup> (Tabela 2).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados considerando os parâmetros da curva analítica a partir da Equação 5 e da Equação 6, onde  $s$  é o o desvio-padrão residual da linha de regressão e  $S$  é a inclinação da curva (BRASIL, 2017).

Equação 5

$$LD = \frac{3,3 s}{S}$$

Equação 6

$$LQ = \frac{10 s}{S}$$

### 3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro método para determinação de AGT por CZE-UV em amostras de alimentos processados foi reportado por Porto et al (2015). Empregava-se um eletrólito previamente otimizado para detecção direta de AG (PORTO; SOUZA; DE OLIVEIRA, 2011) contendo uma solução tampão de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (pH = 9,2), uma mistura de solventes (metanol e acetonitrila) e um surfactante não-iônico (Brij<sup>®</sup> 35). O preparo de amostras compreendia as etapas de extração lipídica e saponificação dos AG. As análises eram realizadas em um tempo de corrida de 12 minutos.

Com o objetivo de otimizar este método existente para quantificação de AGT totais do ácido octadecenóico (PORTO et al., 2015), avaliou-se no presente estudo a possibilidade de um preparo de amostras mais simples e uma análise em menor tempo, utilizando o eletrólito já otimizado anteriormente para detecção direta na região do UV (PORTO; SOUZA; DE OLIVEIRA, 2011).

Para diminuir o tempo de análise em CE, várias estratégias podem ser investigadas como aumentar a tensão aplicada no capilar, modificar a superfície interna do capilar para separações coeletrosmóticas; diminuir o tamanho do capilar e fazer a injeção da amostra pelo compartimento de saída do cartucho, *i.e.*, a extremidade do capilar mais próxima ao detector (do inglês, *short-end injection procedure* – SEIP) (OPEKAR; COUFAL; ŠTULÍK, 2009).

Esses procedimentos podem ser entendidos a partir da Equação 7, que define o tempo de migração ( $t$ ) em CE. Na equação  $C_{tot}$  e  $C_{ef}$ , são os comprimentos total e efetivo do capilar respectivamente.  $U$ ,  $\mu_{ELE}$  e  $\mu_{OSM}$  já foram definidos anteriormente (subseção 1.3.2, página 41).

Percebe-se que o tempo de migração é proporcional ao tamanho do capilar e inversamente proporcional a tensão aplicada e  $\mu_{ELE}$  e  $\mu_{OSM}$ .

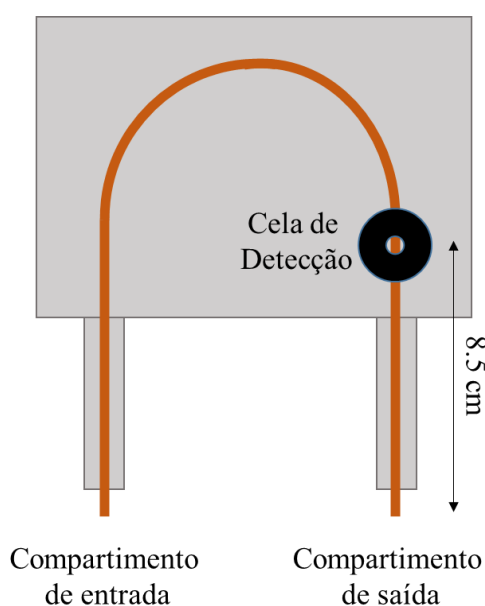
Equação 7

$$t = \frac{C_{tot} C_{ef}}{U (\mu_{ELE} + \mu_{OSM})}$$

### 3.2.1 Escolha do modo de injeção e otimização das condições eletroforéticas

No intuito de se obter um tempo curto de análise e avaliar a possibilidade de uma corrida ultra rápida, inicialmente, decidiu-se empregar a técnica SEIP supramencionada, onde  $C_{tot}$  e  $C_{ef}$  seriam os menores possíveis. Como ilustrado na Figura 12, a técnica consiste na injeção da amostra pelo compartimento de saída, onde geralmente ocorre o descarte da amostra (extremidade do capilar mais próxima ao detector). Nesta abordagem, o  $C_{ef}$  do capilar, ou a distância percorrida pela amostra da injeção até a janela de detecção, é de apenas 8,5 cm. No caso ilustrado, que emprega um capilar de 33,5 cm (a menor extensão possível de capilares para os cartuchos utilizados neste estudo) o  $C_{ef}$  seria de 25 cm para injeções feitas pelo compartimento de entrada e de 8,5 cm para injeções feitas pelo compartimento de saída.

Figura 12 - Cartucho de Eletroforese Capilar com compartimento de entrada e compartimento de saída de amostra



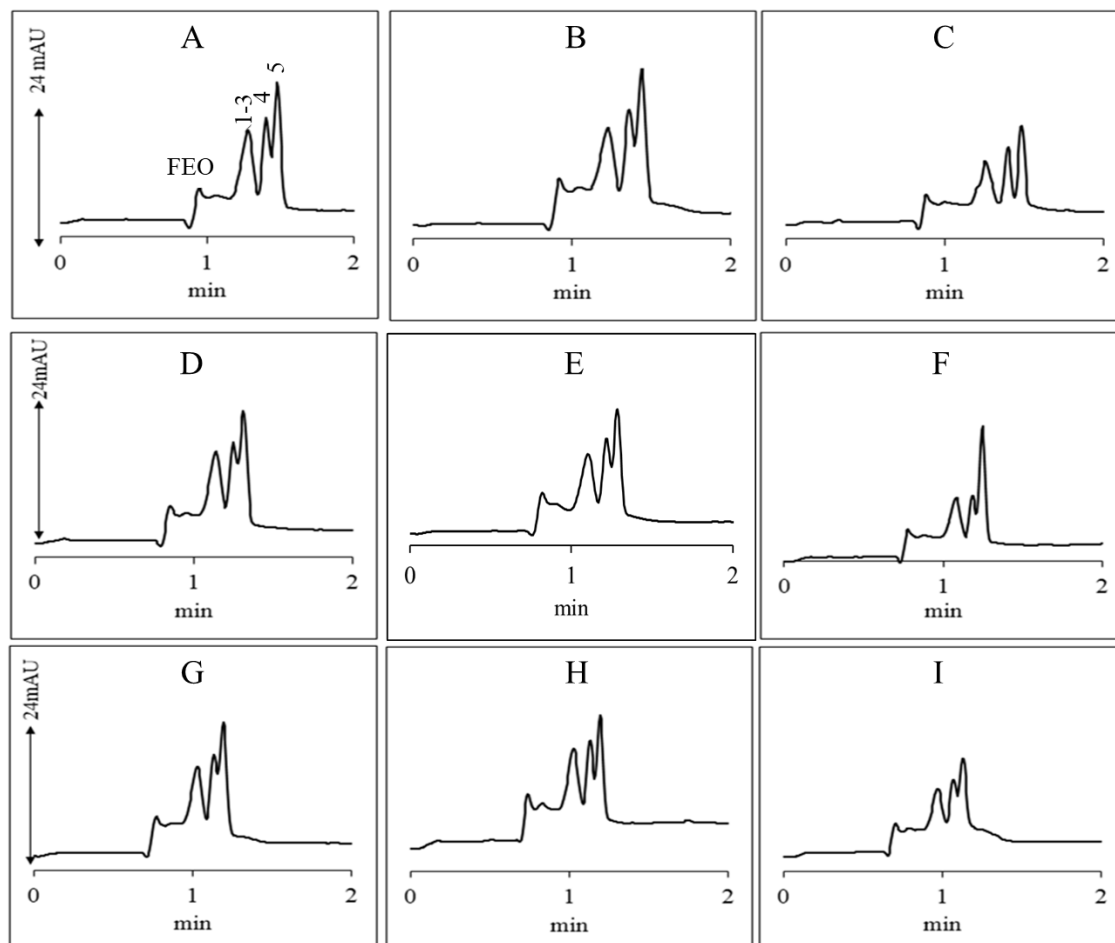
Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Estes parâmetros foram escolhidos pois, pela Equação 7, pode-se inferir que a tensão é inversamente proporcional ao tempo de migração e a temperatura está relacionada com a viscosidade e conseqüentemente com  $\mu_{ELE}$  e  $\mu_{OSM}$ , como evidenciado na Equação 1 e na Equação 2 (página 41). Os três níveis selecionados tiveram como ponto central os valores do trabalho prévio de Porto *et al.* (2015) e os níveis superiores e inferiores variaram em três unidades em comparação com o ponto central (Tabela 2).

Os primeiros experimentos foram realizados empregando-se uma mistura de padrões com ácido elaídico (C18:1 9*t*) a 1,0 mmol L<sup>-1</sup> e os outros AG (C19:1 10*c* – padrão interno, C18:1 9*c*, C18:2 9*c*12*c* e C18:3 9*c*12*c*15*c*) a 0,5 mmol L<sup>-1</sup>. O C19:1 10*c* foi selecionado para ser utilizado como padrão interno por ser um AG insaturado usualmente não encontrado em matrizes alimentícias e migrar próximo aos isômeros do ácido octadecenóico. Os outros AG foram incluídos na mistura de padrões por serem AG insaturados majoritários em uma variedade de alimentos.

O eletrólito foi o mesmo utilizado em trabalho prévio para detecção direta de AG por CZE-UV (PORTO; SOUZA; DE OLIVEIRA, 2011), descrito na subseção 3.1.4 (página 53) e outras condições instrumentais como pressão e tempo de injeção foram fixadas, enquanto se variava os parâmetros tensão e temperatura. Nove combinações distintas destes parâmetros variados foram avaliadas, em um total de 11 ensaios, considerando a triplicata no ponto central. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória. Na Figura 13 são ilustrados os primeiros eletroferogramas obtidos a partir da realização do planejamento experimental empregando-se um capilar com 50  $\mu\text{m}$  diâmetro interno e 375  $\mu\text{m}$  diâmetro externo.

Figura 13 - Eletroferogramas das injeções feitas pelo compartimento de saída com capilar de 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno nas nove condições avaliadas selecionadas pelo planejamento experimental  $3^2$

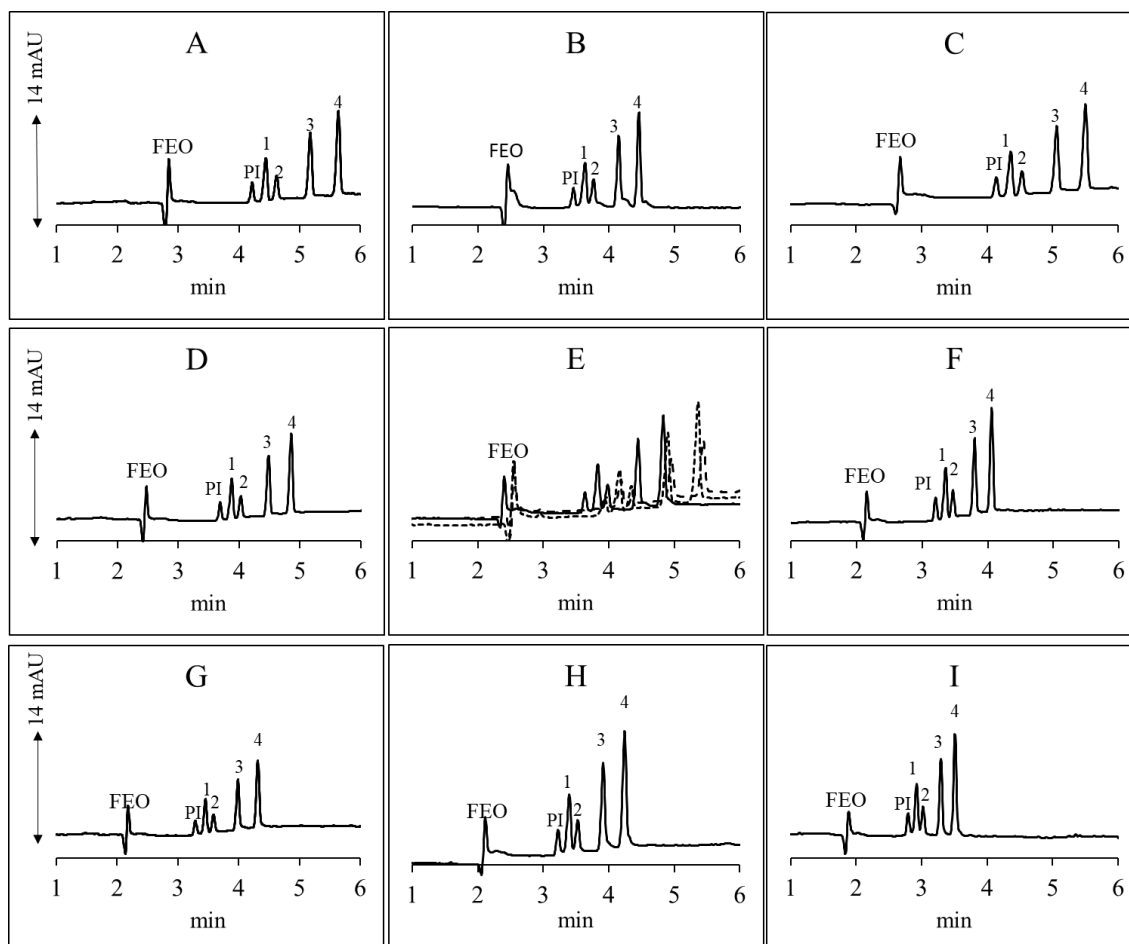


Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica (25 mbar por 5 s), capilar com comprimento total de 33,5 cm (8,5 cm de comprimento efetivo), 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 375  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo. Temperaturas e tensões investigadas estão mostradas na Tabela 2. Solução de eletrólito foi detalhada na subseção 3.1.4. Comprimento de onda de detecção: 200 nm. Picos: (1) C19:1 10c – padrão interno, (2) C18:1 9t, (3) C18:1 9c, (4) C18:2 9c12c, (5) C18:3 9c12c15c. FEO: fluxo eletroosmótico.

Como pode ser observado, todos os AG selecionados migraram em aproximadamente 1 minuto, em todas as condições avaliadas. Entretanto, uma separação em linha de base não foi alcançada em nenhuma das condições investigadas. Então, optou-se por realizar o planejamento de experimentos empregando-se a injeção pelo compartimento de entrada do cartucho, com o menor  $C_{tot}$  possível (33,5 cm, sendo 25 cm de  $C_{ef}$ ). Um capilar TSU de 50  $\mu\text{m}$  diâmetro interno foi escolhido. Os eletroferogramas obtidos nas nove condições avaliadas, com triplicata no ponto central são mostrados na Figura 14.

Figura 14 - Eletroferogramas das injeções feitas pelo compartimento de entrada com capilar de 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno nas nove condições avaliadas selecionadas por planejamento experimental  $3^2$



Fonte: Adaptado de Amorim; Porto; de Oliveira (2017), com permissão da Royal Society of Chemistry.

Condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica (25 mbar por 5 s), capilar com comprimento total de 33,5 cm (8,5 cm de comprimento efetivo), 50  $\mu\text{m}$  diâmetro interno e 375  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo. Temperaturas e tensões investigadas são mostradas na Tabela 2. Solução de eletrólito foi detalhada na subseção 3.1.4. Comprimento de onda de detecção: 200 nm. Picos: (PI) padrão interno - C19:1  $10c$ , (1) C18:1  $9t$ , (2) C18:1  $9c$ , (3) C18:2  $9c12c$ , (4) C18:3  $9c12c15c$ . FEO: fluxo eletroosmótico.

A separação em linha de base dos AG selecionados pode ser observada na Figura 14 em todas as condições avaliadas com tempos de análises significativamente curtos (4-6 min). A REC calculada para cada experimento é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 - Respostas do planejamento fatorial 3<sup>2</sup>

Experimentos	Temperatura	Tensão	Respostas
A	-1	-1	8,47
B	0	-1	10,40
C	1	-1	1156,22
D	-1	0	136,72
E <sub>1</sub>	0	0	44,95
E <sub>2</sub>	0	0	20,64
E <sub>3</sub>	0	0	36,40
F	1	0	8,09
G	-1	1	80,14
H	0	1	10,84
I	1	1	12,27

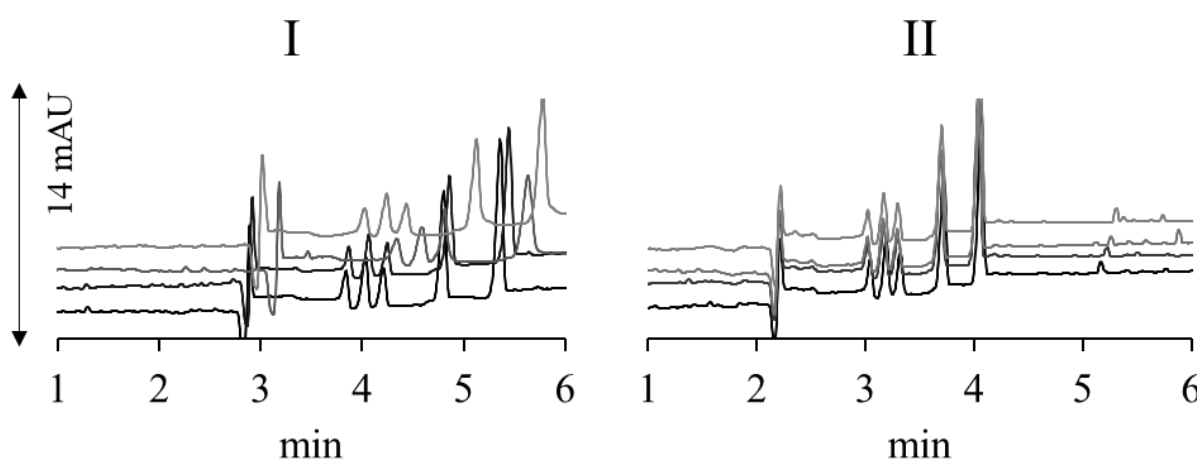
Fonte: Adaptado de Amorim; Porto; de Oliveira (2017), com permissão da Royal Society of Chemistry.

Temperatura: (-1) 24 °C, (0) 27 °C, (1) 30 °C;

Tensão: (-1) +24 kV, (0) +27 kV, (1) +30 kV

Analisando-se a Tabela 3 pode-se perceber que os experimentos A e F resultaram nos menores valores de REC. Para se avaliar a repetibilidade de ambas condições, uma mistura de padrões foi injetada em quadruplicata em cada condição aleatoriamente. Os eletroferogramas obtidos são mostrados na Figura 15.

Figura 15 - Eletroferogramas mostrando injeções em quadruplicata da mistura de padrões nas condições A (I) e F (II) do planejamento experimental para verificação da repetibilidade das condições instrumentais



Fonte: Adaptado de Amorim; Porto; de Oliveira (2017), com permissão da Royal Society of Chemistry. Condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica (25 mbar por 5 s), capilar com comprimento total de 33,5 cm (25 cm de comprimento efetivo), 50 µm diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. Temperaturas e tensões investigadas são mostradas na Tabela 2. Solução de eletrólito foi detalhada na subseção 3.1.4. Comprimento de onda de detecção: 200 nm.

Visto que a condição F apresentou uma boa repetibilidade, definiu-se uma temperatura de 30 °C e tensão de +27 kV como parâmetros ideais para esta separação, aliados as outras condições eletroforéticas supracitadas (injeção hidrodinâmica a 25 mbar por 5 s) e capilar TSU com comprimento total de 33,5 cm (25 cm de comprimento efetivo), 50 µm diâmetro interno e 375 µm diâmetro externo. Pode-se perceber que além de mais repetível, a condição F fornece um menor tempo de análise (~ 4 min), mostrando-se mais vantajosa por resultar em uma maior frequência analítica. Ainda é interessante ressaltar que existe uma vantagem em se utilizar este capilar TSU que possui revestimento transparente, devido ao fato de não ser necessária a remoção do revestimento polimérico externo para abertura de janela de detecção, o que deixaria o capilar mais frágil.

### **3.2.2 Otimização do preparo de amostras**

No método prévio a este estudo para quantificação de AGT por CZE-UV, o preparo de amostras foi realizado com uma etapa de extração lipídica (HARA; RADIN, 1978) seguida por saponificação das amostras. Foi reportado não ser possível fazer apenas a saponificação direta, devido ao alto teor de açúcares nas amostras, pois ocorria a caramelização das mesmas ao serem aquecidas. Entretanto, vários métodos para determinação de AG por CE reportaram a possibilidade do preparo de amostras com apenas a etapa de saponificação em diferentes matrizes (CASTRO BARRA *et al.*, 2010, 2012, 2013, 2014).

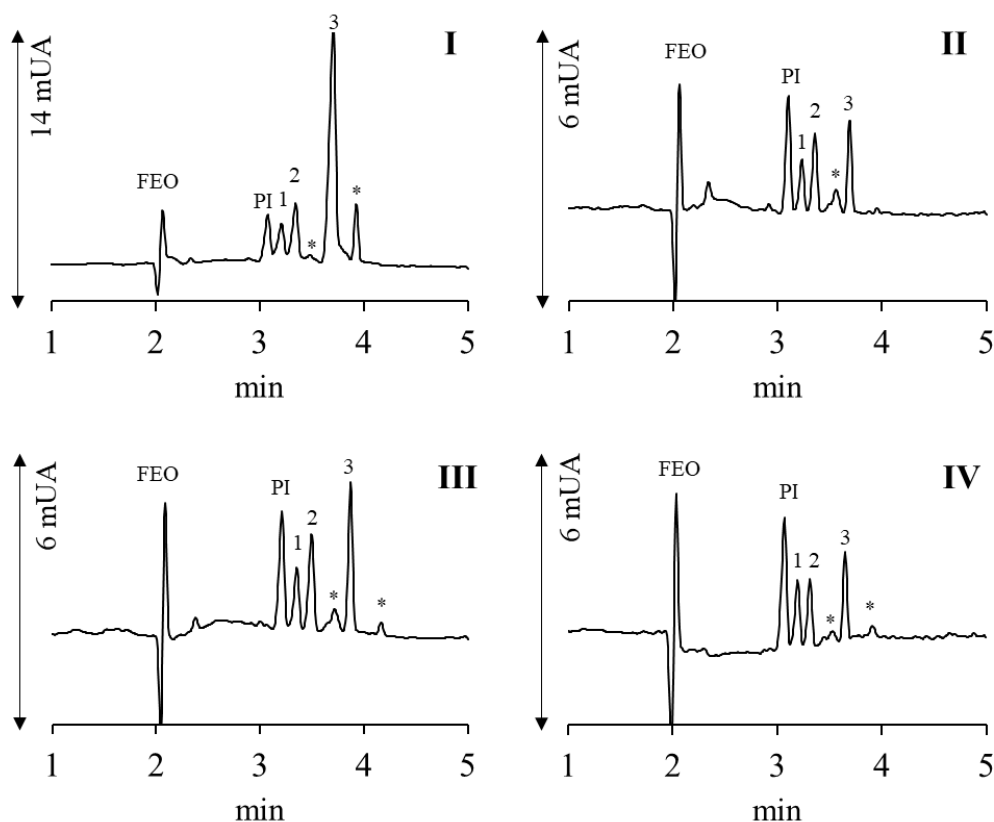
Com o intuito de investigar a possibilidade do preparo de amostras com apenas saponificação direta das amostras, alguns testes foram realizados, como descrito na subseção 3.1.6 (página 54). Percebeu-se que com maiores quantidades de massas ocorria a caramelização das amostras e muito resíduo permanecia no frasco. Porém, com quantidades menores, era possível recolher o sobrenadante após reação, mesmo em amostras com altos teores de açúcares. Optou-se em trabalhar com a quantidade mínima de amostra testada, 150 mg, onde menos resíduo foi observado no fundo do balão após a reação, e verificar a exatidão desta análise posteriormente. Em estudos anteriores de Castro Barra *et al.*, essa mesma quantidade de amostra foi empregada para saponificação de triacilgliceróis em outras matrizes alimentícias.



### 3.2.3 Aplicação do método em matrizes alimentícias

As condições instrumentais de eletromigração otimizadas (sumarizadas na subseção 3.1.4 página 53) foram utilizadas na análise das amostras descritas na subseção 3.1.1 (página 48), após o devido preparo por saponificação, conforme detalhado na subseção 3.1.2 (página 49). Todas as análises foram realizadas considerando-se padrão interno, na concentração de 1 mmol L<sup>-1</sup>. A utilização de padrão interno em CE é altamente recomendada para uma melhora dos resultados quantitativos (ALTRIA; MAHUZIER; CLARK, 2002). Diferentes diluições foram utilizadas para as diferentes matrizes, no intuito de se evitar a comigração de AG. As diluições utilizadas para estas análises também foram especificadas na subseção de preparo de amostras. Um eletroferograma de cada amostra analisada está sendo ilustrado na Figura 16.

Figura 16 - Eletroferogramas das amostras de alimentos industrializados contendo gordura vegetal hidrogenada analisadas para validação do método. I: “biscoitinhos de goiabada”, II: “mistura para bolo”, III: “rosquinhas de coco”, IV: “palitos de wafer”



Fonte: Adaptado de Amorim; Porto; de Oliveira (2017), com permissão da Royal Society of Chemistry.

Condições experimentais detalhadas na subseção 3.1.4. Comprimento de onda de detecção: 200 nm. Picos: (PI) padrão interno - C19:1 10c, (1) C18:1 t, (2) C18:1 9c, (3) C18:2 9c12c e (\*) não identificados. FEO: fluxo eletroosmótico.

Observa-se que em todos os eletroferogramas foi obtida uma separação em linha de base para todos os AG avaliados. AGT totais do ácido octadecênico, representado pelo isômero C18:1 *9t* na mistura de padrões, foram identificados em todas as amostras (representado por C18:1 *t* na Figura 16 devido ao fato do pico corresponder a AGT totais C18:1). Uma injeção com o padrão de ácido vacênico (C18:1 *11t*) foi realizada nestas mesmas condições, e os tempos de migração do C18:1 *9t* e *11t* coincidiram. Além disso, é válido mencionar que alguma diferença no tempo de migração observada entre as diferentes amostras e os padrões pode ser justificada pelo efeito de matriz.

### 3.2.4 Quantificação dos ácidos graxos *trans* totais e validação do método

Na Tabela 4 são mostrados os valores de razão de área (C18:1 *9t* / C19:1 *10c*) obtidos para a curva analítica, usados para o ajuste do modelo de regressão por mínimos quadrados ordinários, bem como o desvio-padrão relativo calculado para cada nível.

Tabela 4 - Valores usados para o ajuste do modelo por regressão

[C18:1 <i>9t</i> ] / [C19:1 <i>10c</i> ]	Sinal 1 <sup>a</sup> replica	Sinal 2 <sup>a</sup> replica	Sinal 3 <sup>a</sup> replica	Desvio-padrão relativo (%)
0,3	0,31	0,30	0,32	3,06
0,6	0,75	0,70	0,76	4,64
0,9	1,02	0,96	1,08	5,68
1,2	1,54	1,34	1,45	6,83
1,5	1,92	1,73	1,89	5,46

Fonte: Adaptado de Amorim; Porto; de Oliveira (2017), com permissão da Royal Society of Chemistry.

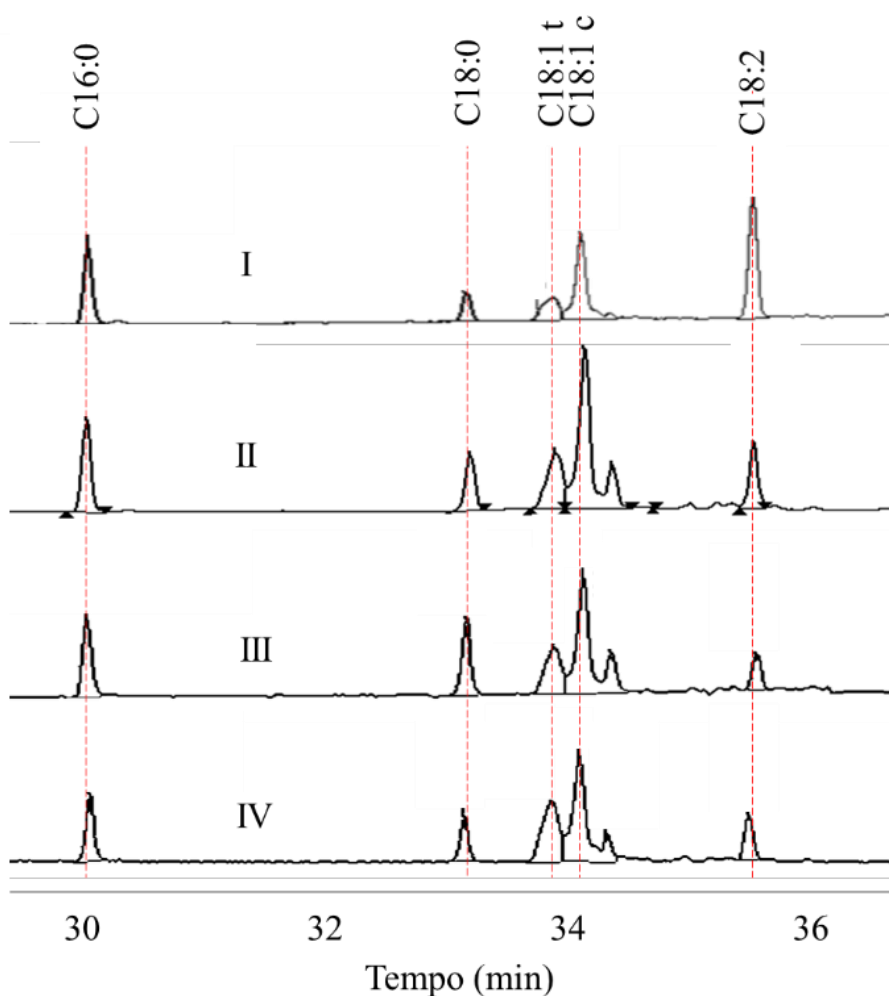
Sinal foi calculado a partir da razão de área C18:1 *9t*/C19:1 *10c*

Pode-se observar que baixo desvio-padrão relativo foi calculado para as triplicatas em todos os níveis (< 6,83 %). A homocedasticidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Cochran ( $C_{cal} = 0,414 < C_{tab-5,3} = 0,684$ , aceitou-se a hipótese nula que supunha que os resíduos eram homocedásticos) e a normalidade pelo teste de Ryan Joiner ( $p$ -valor > 0,1, aceitou-se a hipótese nula que supunha que os resíduos seguiam distribuição normal). Não foi constatada falta de ajuste do modelo num intervalo de 95 % de confiança ( $F_{cal} = 1,02 < F_{tab-0,05;3;10} = 3,71$ , aceitou-se a hipótese nula que supunha que o modelo linear era adequado). Adicionalmente, o coeficiente linear foi estatisticamente diferente de zero ( $F_{cal} = 869,51 > F_{tab-0,05;1;13} = 4,67$ , rejeitou-se a hipótese nula que supunha que o coeficiente linear era igual a 0), indicando que  $y$  efetivamente varia em função de  $x$  e que o método pode ser considerado linear (BRASIL, 2017).

A equação de regressão obtida foi  $y' (\pm 0,0702) = 1,26 [C18:1 9t] / [C19:1 10c] (\pm 0,0427) - 0,0622 (\pm 0,0425)$ . O coeficiente de determinação foi 0,985 e o coeficiente de correlação foi 0,992.

Todas as amostras foram analisadas em duplicatas autênticas por CZE-UV e GC-FID para avaliação da exatidão e especificidade do método. Um cromatograma de cada amostra analisada está ilustrado na Figura 17.

Figura 17 - Cromatogramas das amostras analisadas. I: “biscoitinhos de goiabada”, II: “mistura para bolo”, III: “rosquinhas de coco”, IV: “palitos de wafer”



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Condições instrumentais detalhadas na subseção 3.1.5.

Percebe-se que em todas amostras analisadas por GC-FID, também foi identificada a presença de AGT, expresso pelo pico C18:1 *t* (como em CZE-UV, o método cromatográfico utilizado não era capaz de distinguir isômeros posicionais *trans* e o pico identificado corresponde aos AGT totais). Além dos AG insaturados identificados por CZE-UV, alguns AG

saturados como C16:0 e C18:0 também foram identificados por GC-FID. Pode-se notar que ambos os métodos forneceram em um perfil de AG insaturados muito semelhantes, o que confirma a especificidade do método por CZE-UV para distinguir os AGT totais do ácido octadecenóico dos outros AG presentes nas matrizes alimentícias avaliadas. Comparando-se os eletroferogramas e os cromatogramas, ainda é possível supor que os picos identificados entre o ácido oleico e o ácido linoleico nas amostras provavelmente se tratam de outros isômeros C18:1 *cis*, que são característicos nessa região, o que não pode ser confirmado devido a indisponibilidade destes padrões.

As determinações feitas por ambas as técnicas foram comparadas por teste t pareado paramétrico, visto que o teste de normalidade de Ryan Joiner nos resíduos resultou em  $p$ -valor  $> 0,1$  (aceitou-se a hipótese nula que supunha que os resíduos seguissem distribuição normal). Na Tabela 5 são apresentados os resultados (média das duplicatas e desvios-padrão) obtidos por CZE-UV e GC-FID, expressos em  $\text{g } 100\text{g}^{-1}$  de amostra, e o resultado do teste t pareado.

Tabela 5 - Quantificação de ácidos graxos *trans* totais C18:1 nas amostras analisadas por Eletroforese Capilar de Zona com Detecção Direta na Região do Ultravioleta (CZE-UV) e Cromatografia Gasosa com Detecção por Ionização em Chama (GC-FID)

Amostras	CZE-UV (%)	Desvio-Padrão	GC-FID (%)	Desvio-Padrão
I	2,25	0,30	2,89	1,73
II	1,45	0,04	1,94	1,17
III	1,79	0,16	1,94	0,64
IV	5,05	0,38	4,89	0,13
<i>p</i> -valor	0,45			

Fonte: Adaptado de Amorim; Porto; de Oliveira (2017), com permissão da Royal Society of Chemistry.

I: “biscoito de goiabada”, II: “mistura para bolo”; III: “rosquinhas de coco”; IV: “palitos de wafer”.

Resultados expressos em  $\text{g } 100\text{g}^{-1}$  de amostra

Não foram observadas diferenças significativas num intervalo de 95 % de confiança entre ambos os métodos, visto que um  $p$ -valor  $> 0,05$  foi calculado através do teste t pareado (aceitou-se a hipótese nula que supunha não haver diferenças entre os métodos), o que evidencia a exatidão do método no intervalo de confiança considerado.

O LD calculado para a determinação dos AGT totais do ácido octadecenóico pelo método CZE-UV foi de  $0,17 \text{ mmol L}^{-1}$  e o LQ foi de  $0,54 \text{ mmol L}^{-1}$  (correspondente a  $0,05$  e  $0,15 \text{ g L}^{-1}$ , respectivamente).

A robustez do método foi avaliada medindo-se o impacto da variação dos parâmetros temperatura e tensão na resolução dos pares de AG adjacentes. Os resultados destes experimentos são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6 - Resolução entre os pares críticos de ácidos graxos em diferentes condições de temperatura e tensão selecionados a partir do planejamento fatorial  $3^2$

Experimento	Temperatura	Tensão	R <sub>C19:1/C18:1 t</sub>	R <sub>C18:1 t/C18:1 c</sub>	R <sub>C18:1 c/C18:2</sub>	R <sub>C18:2/C18:3</sub>
A	-1	-1	2,15	1,62	5,21	4,16
B	0	-1	1,79	1,30	4,06	3,26
C	1	-1	1,98	1,49	4,66	3,64
D	-1	0	2,01	1,53	4,87	3,86
E	0	0	1,93	1,43	4,44	3,47
F*	1	0	1,76	1,27	3,83	3,00
G	-1	1	1,86	1,45	4,50	3,58
H	0	1	1,78	1,32	3,99	3,14
I	1	1	1,60	1,19	3,32	2,55

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Temperatura: (-1) 24 °C, (0) 27 °C, (1) 30 °C; Tensão: (-1) 24 kV, (0) 27 kV, (1) 30 kV

\* Corresponde as condições instrumentais ótimas.

Observa-se que nas condições experimentais otimizadas (experimento F), resoluções  $\geq 1,27$  foram calculadas para todos os pares adjacentes (faixa de 1,27 a 3,83). Quando os parâmetros temperatura e tensão foram variados, a resolução diminuiu, em alguns casos, como no experimento I, que resultou nas menores resoluções (faixa de 1,19 a 3,32). Entretanto, em todos os experimentos, resoluções  $\geq 1,2$  foram alcançadas, o que demonstra a robustez do método para a separação dos AG considerados.

A precisão instrumental do método é mostrada quantitativamente através da Tabela 7. Os desvios-padrão relativos foram calculados considerando-se a área do pico, a altura do pico e o tempo de migração. Os eletroferogramas utilizados para os cálculos foram os mostrados na Figura 15-II (condições otimizadas, experimento F, página 61).

Tabela 7 - Precisão instrumental do método avaliada através dos cálculos do desvio-padrão relativo (%) na área do pico, altura do pico e tempo de migração, considerando-se injeção de padrões em quadruplicata

Parâmetro	Réplica	C18:1 9t	C18:1 9c	C18:2 9c12c	C18:3 9c12c15c
Área do Pico	1	0,17	0,14	0,42	0,59
	2	0,16	0,12	0,38	0,55
	3	0,15	0,12	0,37	0,54
	4	0,19	0,12	0,37	0,53
	Desvio (%)	0,38	0,13	0,40	0,42
Altura do Pico	1	2,79	2,49	7,11	10,26
	2	2,71	2,34	6,66	9,71
	3	2,66	2,27	6,50	9,49
	4	3,05	2,24	6,41	9,26
	Desvio (%)	3,26	1,68	4,31	5,72
Tempo de Migração	1	3,17	3,32	3,72	4,06
	2	3,16	3,30	3,69	4,04
	3	3,17	3,29	3,69	4,04
	4	3,19	3,30	3,70	4,06
	Desvio (%)	0,01	0,02	0,01	0,01

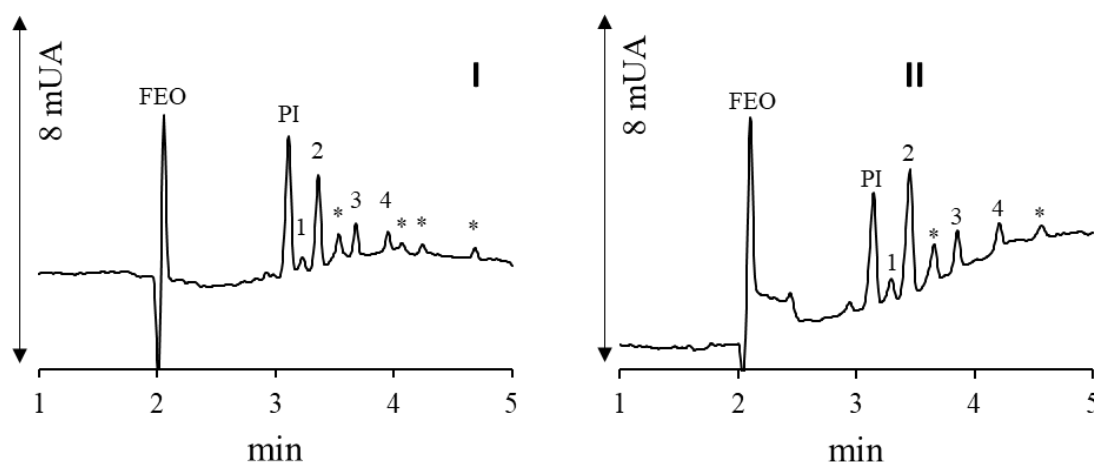
Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Observa-se que desvios-padrão relativos baixos ( $\leq 0,42$ ; 5,72 e 0,02) foram obtidos considerando-se a área do pico, a altura do pico e o tempo de migração dos analitos, respectivamente, o que evidencia a repetibilidade instrumental das condições selecionadas.

### 3.2.5 Uma nova aplicação para o método desenvolvido

Apesar do método descrito ter sido desenvolvido objetivando a quantificação de AGT em amostras contendo gordura vegetal hidrogenada, ele também tem aplicabilidade em matrizes lácteas, contendo essencialmente AGT de origem natural, como ilustra a Figura 18, onde são mostrados os eletroferogramas de amostras de leite em pó (I) e queijo (II). Visualiza-se um maior número de picos correspondentes a AG não identificados, devido a maior complexidade de matrizes lácteas, onde mais de 400 AG já foram identificados por GC (DE LA FUENTE; JUÁREZ, 2009). Entretanto, observa-se que foi obtida uma boa separação dos AG investigados em ambos eletroferogramas.

Figura 18 - Eletroferogramas ilustrando as análises de amostras de leite em pó (I) e queijo (II)



Condições experimentais detalhadas na subseção 3.1.4. Comprimento de onda de detecção: 200 nm. Picos: (PI) padrão interno - C19:1 10*c*, (1) C18:1 *t*, (2) C18:1 9*c*, (3) C18:2 9*c*12*c*, (4) C18:3 9*c*12*c*15*c* e (\*) não identificados. FEO: fluxo eletroosmótico.

Fonte: Elaborada pela autora (2020).

A aplicação deste método para análises rápidas em matrizes lácteas é muito interessante, pois o mesmo também pode ser usado para o monitoramento de AG insaturados majoritários em leite e derivados, bem como para a avaliação da ocorrência de reações de oxidação lipídica, já que estes são os AG mais propensos a sofrerem oxidação devido à presença das insaturações nas suas cadeias hidrocarbônicas.

O ácido oleico pode representar mais de 98 % dos AG monoinsaturados no leite bovino, e os ácidos *cis* polienóicos compreendem o ácido linoleico e o ácido  $\alpha$ -linolênico quase exclusivamente (DE LA FUENTE; JUÁREZ, 2009). Nesse sentido, a avaliação destes três AG no leite pode fornecer informações muito úteis sobre o perfil dos AG insaturados. Além disso, na literatura é reportado que uma diminuição significativa no conteúdo de AG insaturados, principalmente em AG poli-insaturados de cadeia longa, pode fornecer evidências sobre a ocorrência de oxidação lipídica (CHUDY; PIKUL; RUDZIŃSKA, 2015; MAHDY; YANG, 2014; ROMEU-NADAL *et al.*, 2007).

Neste contexto, diversas amostras de leite em pó, fornecidas por uma indústria de lácteos local, empacotadas com diferentes níveis de oxigênio, foram analisadas após 10 meses de armazenamento em sua embalagem original (sacos revestidos internamente com alumínio) para avaliar possíveis diferenças nos conteúdos de AG insaturados devido a oxidação lipídica. Três lotes distintos (produções de 3 dias diferentes) foram avaliados, e dentro de cada lote, uma amostra foi empacotada com um nível alto e um nível baixo de oxigênio, como mostrado na

Tabela 8. As amostras foram conservadas em temperatura ambiente e protegidas da luz durante o armazenamento.

Tabela 8 - Informação sobre a concentração de oxigênio nas amostras de leite em pó analisadas

Lote	Amostra	Concentração de Oxigênio (% v/v)
1	A1	14,1
	A2	20,4
2	B1	0,9
	B2	14,5
3	C1	0,3
	C2	18,0

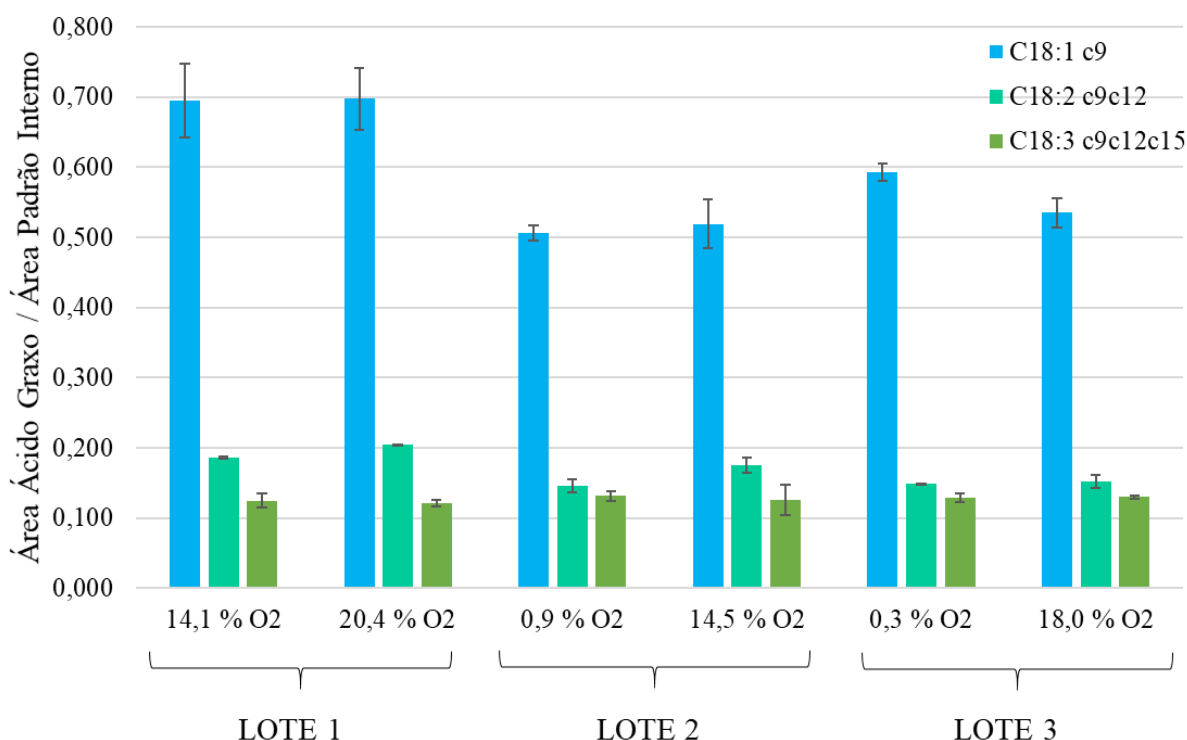
Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Os níveis de oxigênio variando de  $< 1$  % v/v até temperatura ambiente foram selecionados, uma vez que há pouca informação na literatura a respeito dos índices aceitáveis e sobre como a estabilidade das amostras em pó pode ser afetada dependendo do nível de oxigênio disponível (TEHRANY; SONNEVELD, 2009). 0,3 % era o menor nível de oxigênio possível na indústria durante o empacotamento.

As análises das amostras descritas na Tabela 8 foram feitas em duplicatas autênticas, após devido preparo, conforme descrito na sub seção 3.1.2 (página 50, exceção que concentração de padrão interno foi de  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Para se avaliar diferenças no conteúdo de AG insaturados nas diferentes amostras, avaliou-se inicialmente a razão de área do AG e do padrão interno, que já providencia informação suficiente para a comparação. Na Figura 19 são mostradas nas colunas as médias das razões de áreas entre os AG investigados e o padrão interno. As barras ilustram o desvio-padrão da média, estimado como o desvio-padrão da amostra dividido pela raiz quadrada das réplicas ( $n = 2$ ).



Figura 19 - Razões de áreas dos ácidos graxos insaturados e o padrão interno para as diferentes amostras de leite em pó analisadas



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Diferenças significativas entre os conteúdos de AG insaturados não foram observadas graficamente comprando-se as amostras empacotadas com níveis altos e baixos de oxigênio nos três lotes avaliados, o que foi corroborado com uma análise estatística. Os *p*-valores obtidos quando se comparou as razões de área do ácido oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico individualmente nas amostras empacotadas com baixos e altos níveis de oxigênio em cada um dos lotes foram todos  $> 0,05$  (aceitou-se a hipótese nula que supunha não haver diferenças significativas num intervalo de 95 % de confiança entre as amostras empacotadas com baixos e altos níveis de oxigênio).

Observando-se estes resultados, sugere-se que a oxidação lipídica não tenha ocorrido em nenhuma amostra avaliada, após dez meses de armazenamento na embalagem original, conservada protegida da luz e a temperatura ambiente. Além disso, estas evidências estão em conformidade com outros estudos na literatura, que não puderam atribuir apenas a atmosfera de oxigênio como um fator impactante para as reações de oxidação lipídica em produtos à base de leite em pó e fórmulas (CHENG *et al.*, 2017; DRISCOLL; BRENNAND; HENDRICKS, 1985). Além disso, outros fatores como temperatura de armazenamento, exposição à luz e

atividade da água podem ter mais impacto na oxidação do que apenas a atmosfera de empacotamento (TEHRANY; SONNEVELD, 2009).

Ambas aplicações para o método desenvolvido discutidas nessa seção foram publicadas em revistas científicas. A pesquisa envolvendo a quantificação de AGT totais em alimentos contendo gordura vegetal hidrogenada (AMORIM; PORTO; DE OLIVEIRA, 2017) foi publicada na *Analytical Methods* e está disponível sob o Identificador Digital de Objetos (do inglês, *digital object identifier* – DOI) 10.1039/c6ay02906j. O estudo sobre a oxidação lipídica em amostras de leite em pó (AMORIM; DE OLIVEIRA, 2020b) foi publicado na *International Dairy Journal* e está disponível sob o DOI 10.1016/j.idairyj.2020.104861. Em adição, a pesquisa bibliográfica feita para este estudo resultou em uma revisão da literatura publicada na *Analytical Methods*, abordando os métodos disponíveis por CE para quantificação de AGT totais do ácido octadecenóico, que está disponível sob o DOI: 10.1039/c7ay00193b (AMORIM; DE OLIVEIRA, 2017).

#### **4 SEPARAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS *TRANS* POSICIONAIS ISOMÉRICOS DO ÁCIDO OCTADECENÓICO MAJORITÁRIOS EM ALIMENTOS POR ELETROFORESE CAPILAR**

A discriminação de AGT industriais e naturais é importante para atender a algumas legislações vigentes que proíbem ou restringem a presença de AGT de origem industrial em alimentos, o que já ocorre nos Estados Unidos (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2015), Canadá (HEALTH CANADA, 2017) e nos Estados-membros da União Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2019). Neste caso, um método capaz de discriminar AGT naturais e industriais em alimentos tem potencial aplicação para autenticação dos produtos e detecção de fraudes.

Essa determinação também é tradicionalmente feita por GC após derivatização dos analitos utilizando-se colunas altamente polares de 100 m ou ainda mais extensas (MOSSOBA; KRAMER, 2010). Contudo, para se obter uma maior resolução de separação é recomendada uma etapa de fracionamento dos ésteres gerados após procedimento de derivatização através de TLC ou cartuchos para extração em fase sólida, para análise das frações *trans* isoladas (CRUZ-HERNANDEZ *et al.*, 2004; KRAMER *et al.*, 2008; PRECHT; MOLKENTIN, 1996).

Nenhum método por CE foi encontrado na literatura anteriormente a este, objetivando a separação dos isômeros *trans* majoritários em alimentos. Todavia, a técnica apresenta significativas vantagens frente a GC para a determinação de AG quando um perfil completo de AG não é requerido, como já mencionado. Assim, nesta seção será abordada uma metodologia para discriminação de AGT naturais e industriais majoritários em alimentos, empregando-se CZE-UV.

##### **4.1 MATERIAIS E MÉTODOS**

Nesta subseção serão apresentados os materiais necessários para a realização dos experimentos, o desenho experimental utilizado, os protocolos para preparo das amostras e as condições instrumentais empregadas nas análises.

#### 4.1.1 Padrões, reagentes, solventes, soluções e amostras

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau analítico. Água foi purificada por osmose reversa no sistema Quimis (São Paulo, SP, Brasil). Acetonitrila, metanol, NaOH e  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  foram comprados da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina, com pureza de 98 %, Brij<sup>®</sup> 35; dodecil sulfato de sódio, ciclodextrinas naturais ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e os padrões de AG (C18:1 *9c*, C18:1 *9t* e C18:1 *11t*), utilizados para os experimentos de CE, foram comprados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O capilar de sílica fundida utilizado, com revestimento de poli-imida modelo TSP e dimensões de 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 375  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo, foi adquirido da Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, EUA).

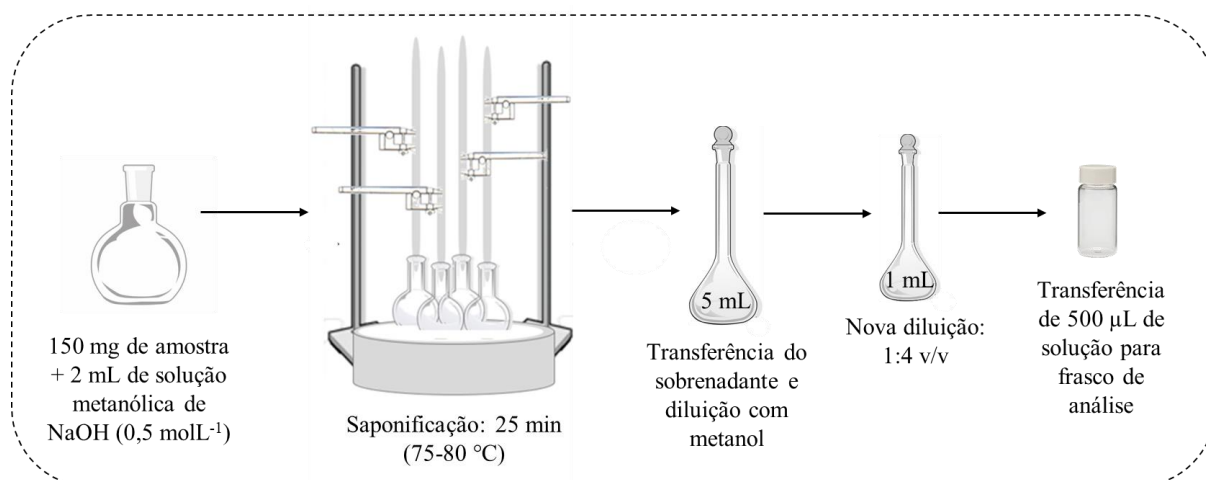
Soluções estoques individuais dos padrões de AG foram preparados na concentração de 20,0 mmol.  $\text{L}^{-1}$  dissolvendo-se as quantidades apropriadas destes em metanol. Soluções padrões em concentrações intermediárias também foram preparadas por conveniente diluição das soluções estoque em metanol. Todas soluções de padrões foram mantidas em freezer a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  até análise. Soluções de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (100,0 mmol  $\text{L}^{-1}$ ) e NaOH (1,0 mol  $\text{L}^{-1}$ ) foram preparadas em água deionizada. Solução de NaOH (0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ ) utilizada para hidrólise alcalina dos triacilgliceróis foi preparada em metanol.

Diferentes amostras de requeijão foram adquiridas no mercado local (Juiz de Fora, MG, Brasil) para demonstrar a aplicabilidade do método em amostras reais.

#### 4.1.2 Preparo de amostras

150 mg de cada amostra de requeijão foi saponificada separadamente em balões de fundo chato com 2,0 mL de uma solução metanólica de NaOH (0,5 mol  $\text{L}^{-1}$ ) em banho térmico com refluxo (75–80  $^\circ\text{C}$ ) por 25 min. Então, o conteúdo contido nos frascos de saponificação foi recolhido com uma pipeta e filtrado com papel de filtro em um balão volumétrico âmbar de 5,00 mL avolumado com metanol. Antes da injeção, 250  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram diluídos separadamente em um balão volumétrico âmbar de 1,00 mL. Em seguida, uma alíquota de 500  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi transferida independentemente para os respectivos frascos de análise e analisados por CZE-UV (Figura 20).

Figura 20 - Preparo de amostras de requeijões



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

### 4.1.3 Instrumentação para Eletroforese Capilar

Os experimentos foram conduzidos em um equipamento de CE da Agilent Technologies modelo CE7100 (Palo Alto, CA, EUA), disponível nas dependências do departamento de química da Universidade Federal de Juiz de Fora, equipado com detector UV por arranjo de diodos. Aquisição e tratamento de dados foi feito em software HP Chem Station (Rev.06.01). Nas condições otimizadas, a temperatura foi controlada no interior do cartucho em 19 °C, o sistema eletroforético foi operado sob polaridade normal e tensão constante de 19 kV e as amostras foram injetadas hidrodinamicamente (25,0 mbar por 2 s). A detecção dos compostos foi realizada no comprimento de onda de 192 nm, com frequência de aquisição de dados de 2,5 Hz. O eletrólito otimizado foi preparado de modo a se obter 24 mmol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 10 mmol L<sup>-1</sup> de heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)-β-ciclodextrina, 45 % v/v metanol e 15 % v/v acetonitrila em balão de 5,00 mL. Utilizou-se a heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)-β-ciclodextrina pesando a massa correspondente diretamente no balão. Antes do uso, o eletrólito foi levado ao banho ultrassônico por 10 minutos para eliminar eventuais bolhas de ar. Para todos os experimentos com o método otimizado foi utilizado o capilar de sílica fundida TSP com 33,5 cm de comprimento total (25 cm de comprimento efetivo) 50 µm diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. O condicionamento do capilar antes de uma série de análises foi feito mediante lavagem com pressão de 25 mbar com solução de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> por 15 min, seguido por água deionizada por 15 min e solução de eletrólito por 15 min. Entre corridas foi feito um condicionamento breve pela injeção de solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup> (2 min), água

deionizada (2 min) e eletrólito (2 min). No final das análises, o capilar foi lavado com solução de NaOH e água por 10 min cada, seguido por uma injeção de ar (5 min).

#### 4.1.4 Desenho experimental

Para otimização do método proposto, iniciou-se uma investigação de um eletrólito adequado capaz de separar os isômeros majoritários ácido oleico, elaídico e vacênico, em uma mistura de padrões a  $1 \text{ mmol L}^{-1}$ . Uma solução tamponante de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  (pH = 9,2) a  $24 \text{ mmol L}^{-1}$  foi selecionada para realização dos experimentos iniciais. Adicionalmente, uma mistura de solventes contendo metanol e acetonitrila na proporção de 45:15 % v/v foi utilizada no eletrólito. Como seletores, testou-se a eficiência do surfactante neutro Brij® 35; do surfactante aniônico dodecil sulfato de sódio, das ciclodextrinas naturais ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) e da ciclodextrina modificada heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina na concentração de  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  inicialmente. As condições instrumentais de temperatura e tensão iniciais foram  $15 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $15 \text{ kV}$ , respectivamente. Outras condições foram fixadas como descrito na subseção 4.1.3.

Após testes iniciais com o eletrólito, as condições instrumentais de temperatura ( $^\circ\text{C}$ ) e tensão (kV) foram estudadas mediante um planejamento experimental do tipo  $2^2$ , nos níveis 15 e 19. A resposta medida foi a resolução entre os picos ácido elaídico e ácido vacênico (calculada através da Equação 4). Nas condições selecionadas de temperatura e tensão, outros testes com níveis variáveis de solventes (metanol variando de 30 a 50%, acetonitrila variando de 10 a 20%), tampão ( $12$  e  $24 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e seletor ( $5$  e  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) também foram realizados.

O estudo do preparo de amostras contemplou 2 procedimentos. O primeiro consistiu na extração lipídica pelo procedimento de Hara e Radin, detalhado na subseção 3.1.3 (página 50), seguido pelo procedimento de saponificação, detalhado na subseção 4.1.2 (página 74). Neste caso, todo o conteúdo lipídico foi submetido à saponificação. O segundo preparo contemplou apenas o procedimento de saponificação lipídica, detalhado na subseção 4.1.2.

O LD para os ácido elaídico e o ácido vacênico foi estimado através da Equação 8, onde  $D_{LB}$  é o desvio-padrão do sinal da linha base medido em uma região sem picos,  $C_{AG}$  é a concentração do AG e  $H$  é a altura do pico (BOQUÉ, R.; HEYDEN, Y.V., 2009).

Equação 8

$$LD = \frac{3D_{LB}C_{AG}}{H}$$

## 4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A separação de isômeros posicionais de AGT por CE não é uma tarefa trivial devido à semelhança molecular e de geometria destes compostos. Em geral, mesmo utilizando-se a GC com o emprego de fracionamento prévio para o isolamento da fração *trans* por TLC ou extração com cartuchos em fase sólida, pouca resolução entre os isômeros C18:1 é obtida, com tempos de corrida de aproximadamente 90 min (MOSSOBA; KRAMER, 2010).

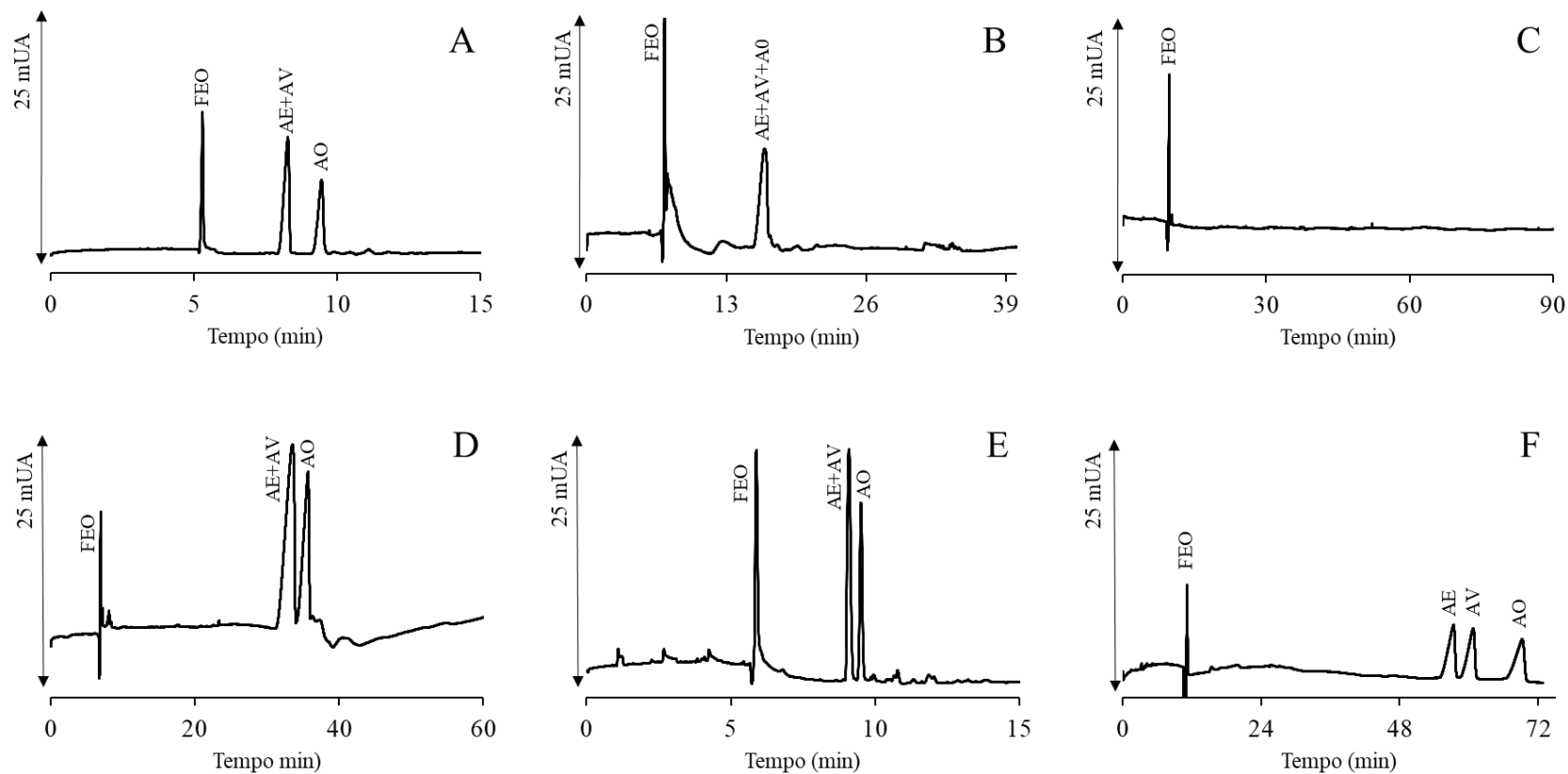
Dessa forma, o maior desafio deste trabalho consistiu na seleção de um eletrólito capaz de promover essa separação inédita por CE. Além disso, condições instrumentais foram otimizadas através de planejamento de experimentos objetivando um curto tempo de análise, e o preparo de amostras também foi estudado, uma vez que a aplicação do método em amostras reais envolveu matrizes lácteas, de elevada complexidade, que continham AGT tanto de origem industrial quando natural.

É importante mencionar que este estudo teve como foco os isômeros posicionais de AGT, ácido elaídico e ácido vacênico, por serem os representantes majoritários dos AGT de origem industrial e natural em alimentos, além de ter considerado o isômero C18:1 *cis* majoritário, o ácido oleico. Sabe-se que outros isômeros C18:1 *cis* e *trans* são encontrados em menores proporções na gordura de leite e também em gordura vegetal hidrogenada, com insaturações em posições que variam principalmente de 4 a 15 (GÓMEZ-CORTÉS; JUÁREZ; DE LA FUENTE, 2018). Entretanto, devido a não disponibilidade de todos esses padrões comercialmente, apenas os isômeros mais relevantes e majoritários em alimentos, e também disponíveis comercialmente foram considerados neste estudo. Além disso, uma vez que o objetivo deste estudo foi detectar a presença de AGT industriais, expresso pelo ácido elaídico, em amostras lácteas contendo ácido vacênico, decidiu-se trabalhar com detecção direta na região do UV dos analitos de interesse.

### 4.2.1 Otimização do eletrólito

Na Figura 21 é mostrada a influência de cada um dos seletores investigados na separação dos isômeros ácido oleico, elaídico e vacênico.

Figura 21 - Eletroferogramas mostrando a separação de uma mistura de padrões de ácido eláidico, ácido vacênico e ácido oleico a 1 mmol L<sup>-1</sup> com a utilização de diferentes seletores no eletrólito



Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2019a).

Condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica (25 mbar por 3 s), capilar com comprimento total de 33,5 cm (25 cm de comprimento efetivo), 50  $\mu$ m de diâmetro interno e 375  $\mu$ m de diâmetro externo. Temperatura de 15 °C e tensão de +15 kV. Comprimento de onda de detecção: 192 nm. Composição do eletrólito: 24 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O, 15 % v/v acetonitrila, 45 % v/v metanol e (A) 10 mmol L<sup>-1</sup> de  $\alpha$ -ciclodextrina, (B) 10 mmol L<sup>-1</sup> de  $\beta$ -ciclodextrina, (C) 10 mmol L<sup>-1</sup> de  $\gamma$ -ciclodextrina, (D) 10 mmol L<sup>-1</sup> de dodecil sulfato de sódio, (E) 10 mmol L<sup>-1</sup> de Brij<sup>®</sup> 35 e (F) 10 mmol L<sup>-1</sup> de heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina. FEO: fluxo eletroosmótico; AE: ácido eláidico; AV: ácido vacênico; AO: ácido oleico.



Como pode ser notado nos experimentos de A a E, surfactantes e ciclodextrinas naturais não foram capazes de separar os isômeros de interesse em uma mistura de padrões. Os seletores capazes de separar os isômeros *cis* e *trans* foram  $\alpha$ -ciclodextrina, dodecil sulfato de sódio e Brij<sup>®</sup> 35. Os 3 AG coeluíram quando se utilizou a  $\beta$ -ciclodextrina e com a  $\gamma$ -ciclodextrina nenhum pico foi observado em um tempo de análise de 90 min. Entretanto, como pode ser visto na Figura 21-F, na presença da ciclodextrina neutra modificada, os 3 isômeros foram separados. Todavia, com um tempo de análise muito alto, de 72 min.

Investigou-se o papel destes seletores, pois surfactantes neutros, como Brij<sup>®</sup> 35, e ciclodextrinas foram utilizados em alguns trabalhos para a separação *cis/trans* do ácido octadecenóico (CASTRO BARRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA, MARCONE A. L. *et al.*, 2003; AMORIM; PORTO; DE OLIVEIRA, 2017; WONG; SAAD; MAKAHLEH, 2013). Além disso, o surfactante aniônico SDS já foi reportado para a separação de AG trienólicos isoméricos conjugados (BOHLIN *et al.*, 2003) e algumas ciclodextrinas modificadas, como a heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina, também já foram empregadas para determinação de AGT totais (WONG; SAAD; MAKAHLEH, 2013).

#### 4.2.2 Otimização das condições instrumentais

Na Tabela 9 é mostrada a matriz de contraste do planejamento fatorial utilizada para a otimização das condições instrumentais, assim como a resolução calculada para cada um dos experimentos. Os parâmetros fixos foram: injeção hidrodinâmica com pressão e tempo de injeção de 25 mbar e 2 segundos, respectivamente; e capilar de 33,5 cm de comprimento total (25 cm de comprimento efetivo) com 50  $\mu$ m de diâmetro interno e 375  $\mu$ m de diâmetro externo. Na Figura 22 são mostrados os eletroferogramas obtidos para cada um dos experimentos realizados.

Tabela 9 - Matriz de contraste do planejamento fatorial 2<sup>2</sup>

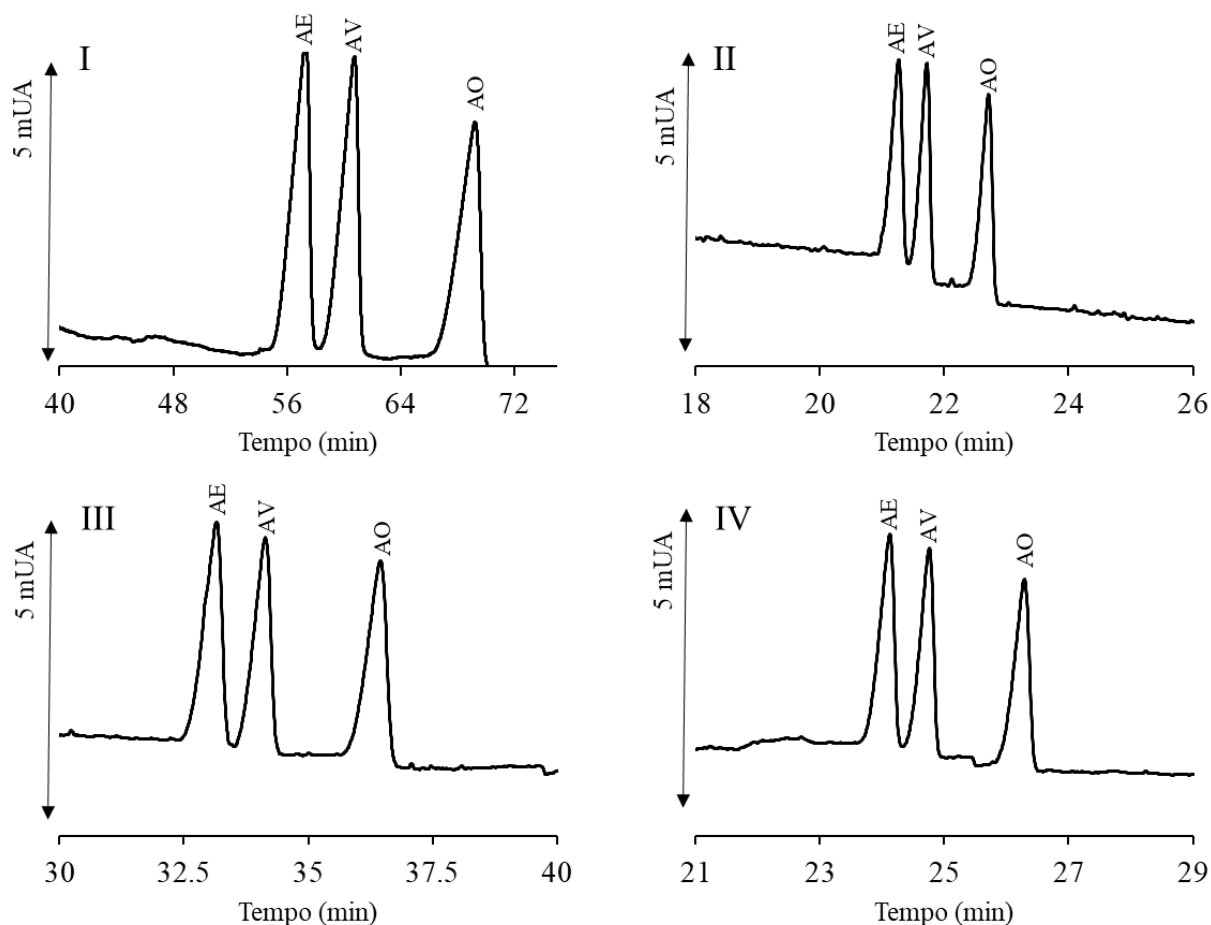
Experimento	Temperatura	Tensão	Resolução
I	-1	-1	1,08
II	-1	+1	0,99
III	+1	-1	1,08
IV	+1	+1	1,13

Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2019a).

Temperatura: (-1) 15 °C (+1) 19 °C

Tensão: (-1) 15 kV (+1) 19 kV

Figura 22 - Eletroferogramas ilustrando os experimentos do planejamento experimental 2<sup>2</sup>

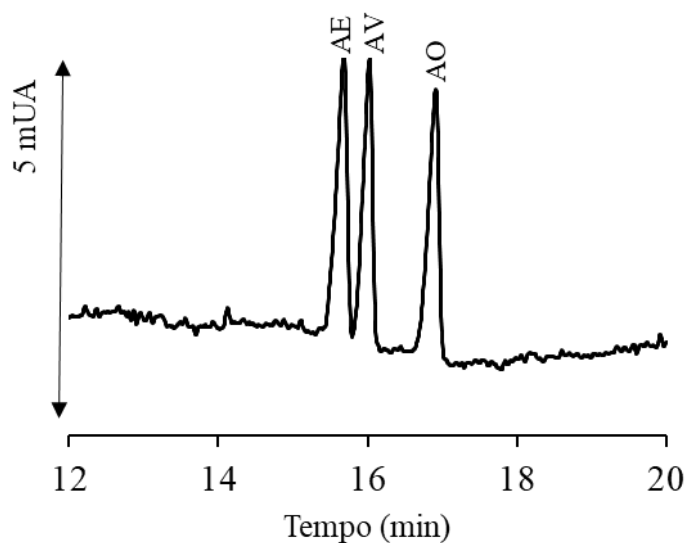


Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Condições eletroforéticas fixas: injeção hidrodinâmica (25 mbar por 2 s), capilar com comprimento total de 33,5 cm (25 cm de comprimento efetivo), 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 375  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo. Comprimento de onda de detecção: 192 nm. Composição do eletrólito: 24  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 10  $\text{mmol L}^{-1}$  de heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina, 45 % v/v metanol e 15 % v/v acetonitrila. AE: ácido eláidico; AV: ácido vacênico; AO: ácido oleico.

Observando-se a Tabela 9 e os eletroferogramas percebe-se que os níveis superiores de tensão e temperatura forneceram a melhor resolução de separação para o par crítico ácido eláidico/ácido vacênico ( $R = 1,13$ ) em 27 min. Como o planejamento experimental indicou que níveis mais altos poderiam fornecer resultados melhores (maiores resoluções), realizou-se mais um experimento com a temperatura de 23  $^{\circ}\text{C}$  e com a tensão de 23 kV. O eletroferograma obtido é ilustrado na Figura 23.

Figura 23 - Eletroferograma ilustrando a condição 23 °C e 23 kV



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica (25 mbar por 2 s), capilar com comprimento total de 33,5 cm (25 cm de comprimento efetivo), 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 375  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo. Temperatura de 23 °C e tensão de 23 kV. Comprimento de detecção: 192 nm. Composição do eletrólito: 24  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 10  $\text{mmol L}^{-1}$  de heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina, 45 % v/v metanol e 15 % v/v acetonitrila. AE: ácido elaídico, AV: ácido vacênico, AO: ácido oleico

Observa-se que o tempo de análise foi reduzido para 17 minutos, entretanto houve perda de resolução ( $R = 1,01$ ) e maior ruído foi observado na linha base. Dessa forma, optou-se em trabalhar com os níveis superiores do planejamento 2<sup>2</sup>: temperatura de 19 °C e tensão de +19 kV.

Em resumo, os parâmetros otimizados foram: temperatura do cartucho mantida em 19 °C, tensão positiva de +19 kV, injeção hidrodinâmica de 25 mbar por 2 segundos, comprimento total do capilar de 33,5 cm (25 cm de comprimento efetivo), 50  $\mu\text{m}$  diâmetro interno e 375  $\mu\text{m}$  diâmetro externo, detecção a 192 nm (2,5 Hz) e eletrólito composto por 24  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , 10  $\text{mmol L}^{-1}$  heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina, 45 % v/v metanol e 15 % v/v acetonitrila.

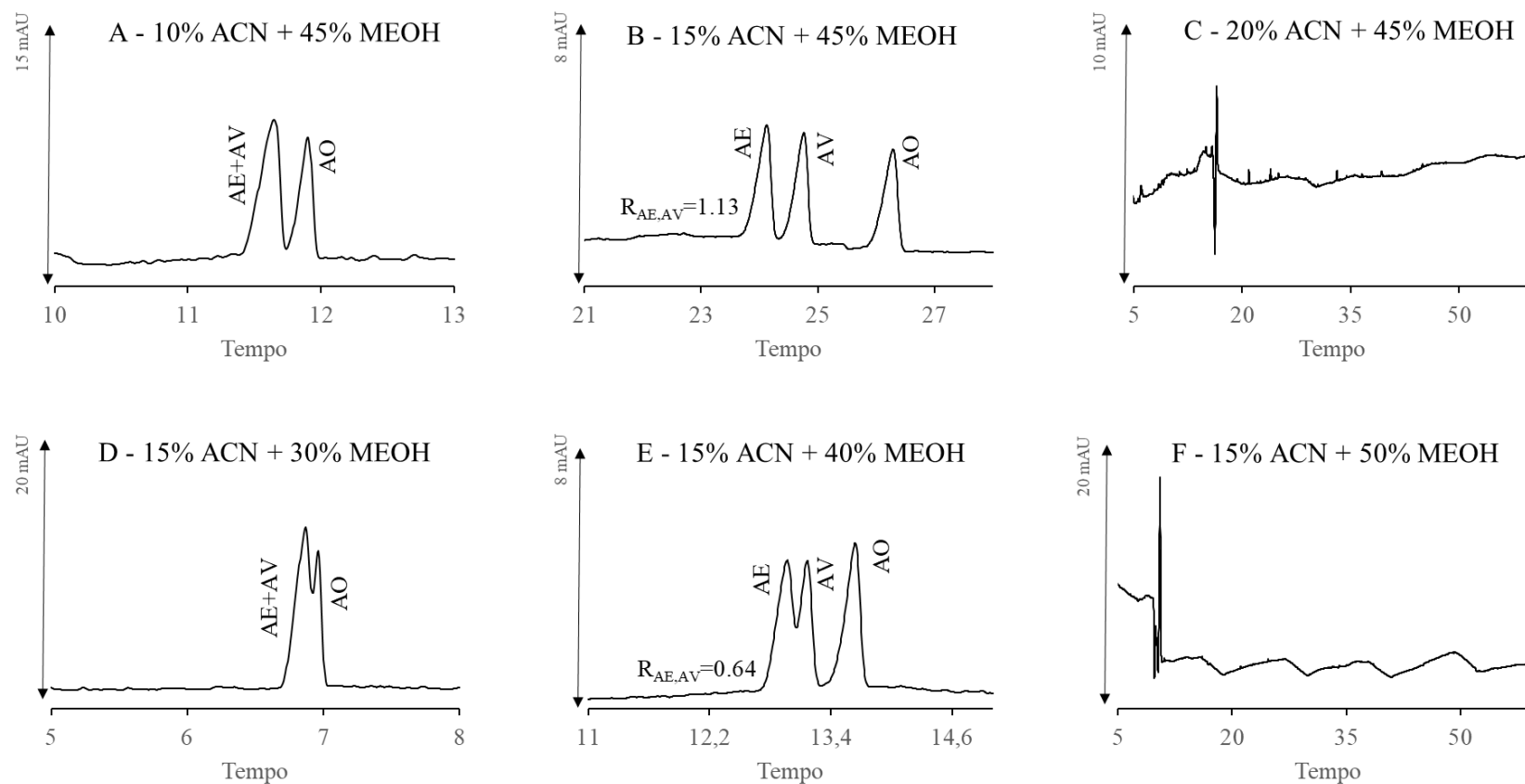
### 4.2.3 Estudo da influência da concentração de solventes orgânicos, tampão e ciclodextrina no eletrólito

Após a otimização das condições experimentais, ainda decidiu-se avaliar o impacto de se utilizar diferentes concentrações de solventes orgânicos (metanol e acetonitrila), tampão e ciclodextrina no eletrólito previamente descrito. No que diz respeito aos solventes utilizados, uma mistura de metanol e acetonitrila já havia sido utilizada em outros eletrólitos em alguns outros trabalhos deste grupo de pesquisa em diferentes proporções (PORTO *et al.*, 2015; PORTO; SOUZA; DE OLIVEIRA, 2011). A adição de solventes orgânicos no eletrólito altera a viscosidade e a constante dielétrica do meio e, conseqüentemente, o potencial zeta do capilar, o que causa uma variação na velocidade do fluxo eletroosmótico (TAVARES, 1997). Os trabalhos de Oliveira, Wong e colaboradores (DE OLIVEIRA, *et al.*, 2003; WONG; SAAD; MAKAHLEH, 2013) mostraram que o conteúdo de metanol influencia a resolução de separação dos analitos e a acetonitrila é efetiva em reduzir o fluxo eletroosmótico aumentando a resolução.

No presente estudo, uma mistura de metanol/acetonitrila 45:15 % v/v foi utilizada em testes preliminares, uma vez que a separação do par crítico ácido eláidico e ácido vacênico foi obtida com resolução maior que 1, quando este sistema foi empregado. Entretanto, a concentração de acetonitrila também foi avaliada de 10 a 20 % v/v (intervalo de 5 unidades) e a concentração de metanol foi avaliada de 30 a 50 % v/v (intervalo de 10 unidades). Na Figura 24 são mostrados os eletroferogramas obtidos com estes experimentos.

A concentração de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  de  $12 \text{ mmol L}^{-1}$  também foi averiguada de modo a investigar se um tempo de análise menor era possível devido a diminuição da força iônica do meio (Figura 25-B). Este valor foi investigado uma vez que foi otimizado em trabalhos prévios do grupo (PORTO; SOUZA; DE OLIVEIRA, 2011). Adicionalmente, foi avaliada a possibilidade de se utilizar  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina, com o intuito de verificar se uma menor quantidade deste reagente poderia ser utilizada (Figura 25-C), diminuindo o custo da análise.

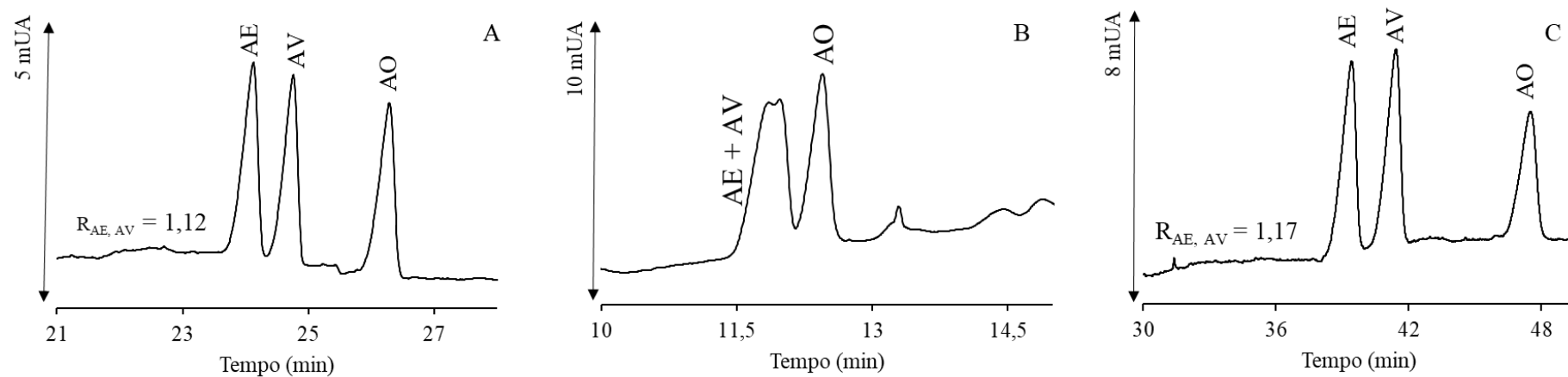
Figura 24 - Eletroferogramas obtidos variando-se o percentual (volume/volume) de solvente orgânico utilizado na separação de uma mistura de padrões de ácido eláidico, ácido vacênico e ácido oleico a  $1 \text{ mmol L}^{-1}$



Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2019a).

Condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica (25 mbar por 2 s), capilar com comprimento total de 33,5 cm (25 cm de comprimento efetivo), 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 375  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo. Temperatura de 19  $^{\circ}\text{C}$  e tensão de 19 kV. Comprimento de onda de detecção: 192 nm. Composição do eletrólito fixa: 24  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  e 10  $\text{mmol L}^{-1}$  de heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina. AE: ácido eláidico, AV: ácido vacênico, AO: ácido oleico; ACN: acetonitrila; MeOH: metanol.

Figura 25 - Eletroferogramas obtidos quando outras concentrações de solução tamponante e ciclodextrina foram testadas



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica (25 mbar por 2 s), capilar com comprimento total de 33,5 cm (25 cm de comprimento efetivo), 50  $\mu\text{m}$  de diâmetro interno e 375  $\mu\text{m}$  de diâmetro externo. Temperatura de 19  $^{\circ}\text{C}$  e tensão de 19 kV. Comprimento de onda de detecção: 200 nm. Composição do eletrólito fixa: 45 % v/v metanol e 15 % v/v acetonitrila; (A) 24  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  e 10  $\text{mmol L}^{-1}$  de heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina; (B) 12  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  e 10  $\text{mmol L}^{-1}$  de heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina; (C) 24  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  e 5  $\text{mmol L}^{-1}$  de heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina. AE: ácido elaídico; AV: ácido vacênico; AO: ácido oleico.

Avaliando inicialmente o papel da acetonitrila, percebe-se que quando foi utilizado 10 % v/v deste solvente, o par crítico não foi separado (Figura 24-A); 15 % v/v resultou em uma boa separação (Figura 24-B) e com 20 % v/v de acetonitrila não se pode observar nenhum pico num tempo de 60 min, uma vez que a mobilidade do fluxo eletroosmótico foi significativamente reduzida (Figura 24-C). Quando se considera a variação no percentual de metanol no eletrólito, o nível que proporcionou a melhor separação do par crítico foi 45 % v/v. Quando se utilizou 30 % v/v de metanol, a separação dos AGT elaídico e vacênico não foi observada e inclusive a resolução da separação dos isômeros geométricos foi bastante baixa (Figura 24-D). Aumentando-se o percentual de metanol para 40 % v/v foi possível observar uma separação inicial dos isômeros (Figura 24-E), mas uma resolução baixa ainda foi obtida ( $R = 0,64$ ). Já com 50 % v/v de metanol no eletrólito, houve uma redução na velocidade do fluxo eletroosmótico e nenhum pico foi observado num tempo de 60 min (Figura 24-F). Neste eletroferograma também se notam perturbações na linha de base, consequência de uma maior variação da corrente.

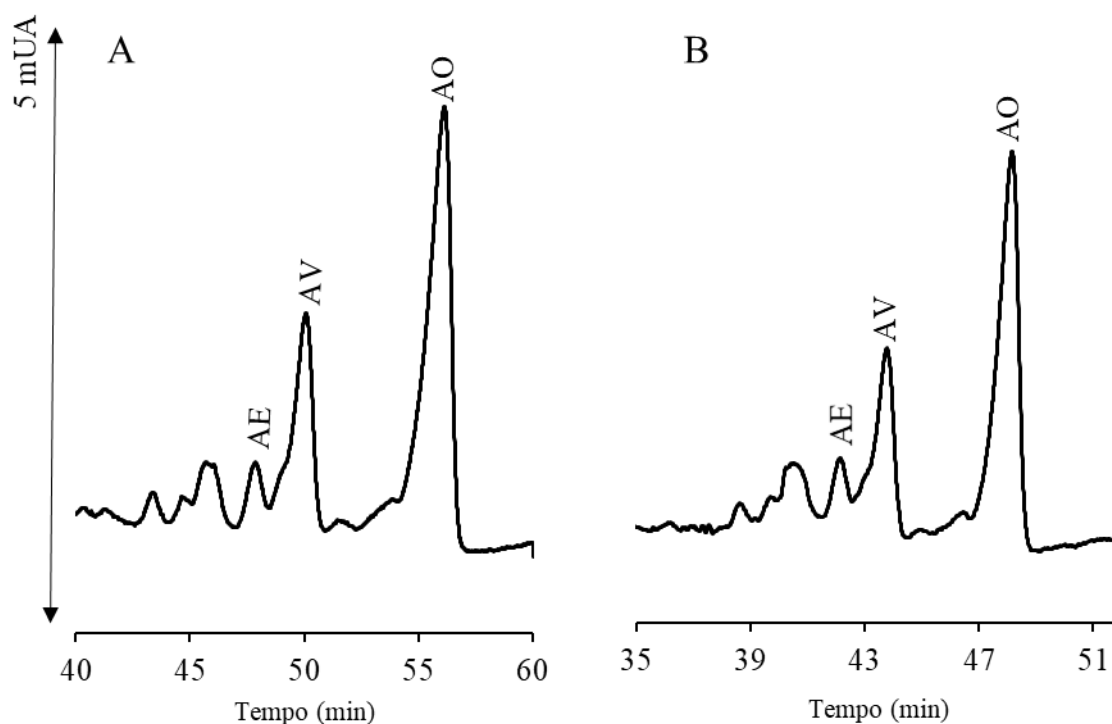
Quanto a concentração de tampão, quando  $12 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  foi utilizado no eletrólito, a separação total do par crítico ácido elaídico/ácido vacênico não foi observada (Figura 25-B) e quando utilizou-se  $5 \text{ mmol L}^{-1}$  de heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina, o tempo de análise foi muito longo (Figura 25-C).

Em resumo, o eletrólito selecionado foi composto por uma solução tamponante de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  ( $24 \text{ mmol L}^{-1}$ ), heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) e uma mistura de metanol/ acetonitrila 45:15 % v/v (Figura 25-A).

#### 4.2.4 Estudo do preparo das amostras

Dois preparos de amostras foram investigados neste estudo: um contemplou a extração lipídica seguido de saponificação (Preparo A) e o outro contemplou apenas o procedimento de saponificação lipídica (Preparo B). Os eletroferogramas obtidos quando foram testados ambos procedimentos para preparo de amostras são ilustrados na Figura 26.

Figura 26 - Eletroferogramas obtidos após diferentes preparos de amostra: A) extração lipídica seguida de saponificação; B) apenas saponificação



Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2019a).

Condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica (25 mbar por 2 s), temperatura do cartucho mantida em 19 °C, tensão aplicada de +19 kV, capilar com comprimento total de 33,5 cm (25 cm de comprimento efetivo), 50 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. Comprimento de onda de detecção: 192 nm. Composição do eletrólito: 24 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 10 mmol L<sup>-1</sup> de heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)-β-ciclodextrina, 45 % v/v metanol e 15 % v/v acetonitrila. AE: ácido elaídico, AV: ácido vacênico, AO: ácido oleico.

Ambos preparos resultaram em perfis eletroforéticos semelhantes, como mostrado na Figura 26. Adicionalmente, comparou-se a razão de área dos analitos/massa de amostra inicial e estas razões também foram muito semelhantes: para o ácido elaídico, as razões calculadas foram 60,76 e 59,77 para os tratamentos A e B respectivamente e para o ácido vacênico, calculou-se razões de 329,36 e 324,93, para os tratamentos A e B respectivamente. Dessa forma, decidiu-se trabalhar apenas com a saponificação como preparo de amostras, uma vez que este preparo é mais simples, menos oneroso e mais rápido, e forneceu um resultado semelhante à aquele com o emprego prévio de extração de gordura.

Amostras de requeijão foram selecionadas para mostrar a aplicabilidade deste método pois é uma matriz láctea de elevada complexidade que além de conter AGT naturais, como o ácido vacênico, pode conter também AGT industriais devido a incorporação de gordura vegetal

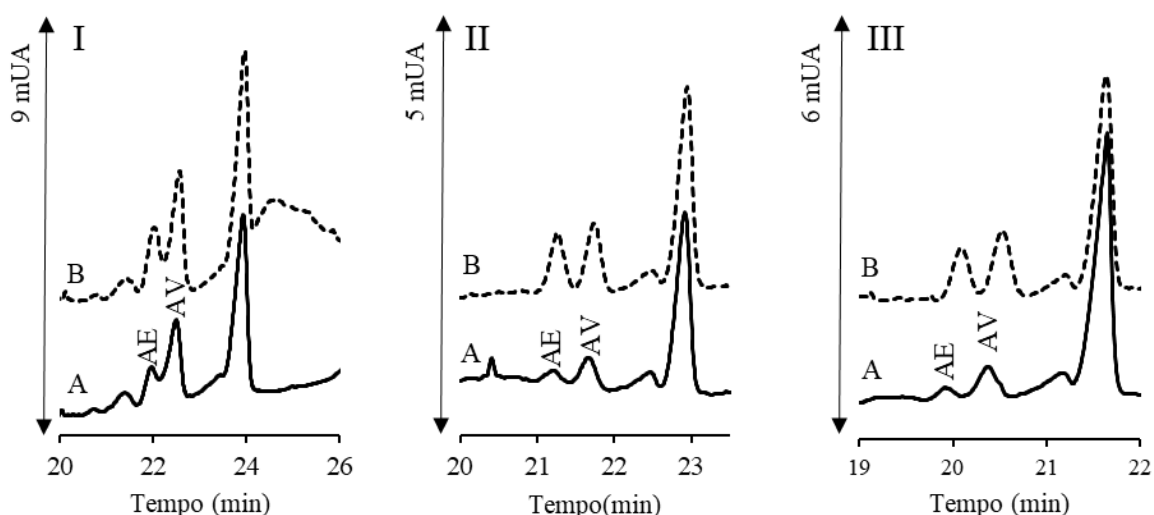


hidrogenada. Alguns fornecedores utilizam este tipo de gordura em substituição a ingredientes lácteos para melhorar sua consistência, e também reduzir custos de manufatura (CUNHA; DIAS; VIOTTO, 2010).

#### 4.2.5 Aplicação do método em amostras de requeijão

Eletroferogramas de três amostras diferentes de requeijão analisados nas condições anteriormente selecionadas são ilustrados na Figura 27. Com o propósito de identificar os picos, uma adição de padrão de ácido elaídico e ácido vacênico a  $0,25 \text{ mmol L}^{-1}$  foi realizada, mostrada pela linha pontilhada nos eletroferogramas (linha B).

Figura 27 - Eletroferogramas das amostras de requeijão analisadas



Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2019a).

Condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica (25 mbar por 2 s), temperatura do cartucho mantida em  $19 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , tensão aplicada de  $+19 \text{ kV}$ , capilar com comprimento total de  $33,5 \text{ cm}$  ( $25 \text{ cm}$  de comprimento efetivo),  $50 \text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro interno e  $375 \text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro externo. Comprimento de onda de detecção:  $192 \text{ nm}$ . Composição do eletrólito:  $24 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ,  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina,  $45 \text{ \% v/v}$  metanol e  $15 \text{ \% v/v}$  acetonitrila. AE: ácido elaídico, AV: ácido vacênico, AO: ácido oleico.

Os ácidos elaídico e vacênico foram identificados em todas as amostras analisadas. Além disso, é possível notar que o tempo de migração observado nos eletroferogramas das amostras difere um pouco do eletroferograma da solução de padrões analisada nas condições otimizadas e isto pode ser justificado devido ao efeito de matriz na amostra. Também se nota

alguma diferença nos tempos de migração dos 3 eletroferogramas, já que amostras distintas, com diferentes matrizes, estavam sendo analisadas.

#### 4.2.6 Detectabilidade do método

Estimou-se o LD instrumental a partir da Equação 8, já mencionada. Este cálculo foi realizado com os dados obtidos pela injeção da mistura de padrões a  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  mostrado na Figura 25-A. A região sem picos entre 27 e 29 min foi utilizada para o cálculo do desvio-padrão da linha de base. Nas condições otimizadas, o LD estimado para os ácidos elaídico e vacênico foi  $0,02 \text{ mmol L}^{-1}$ , o equivalente a aproximadamente  $0,01 \text{ g L}^{-1}$ .

#### 4.2.7 Estudo da ordem de migração através de modelagem molecular

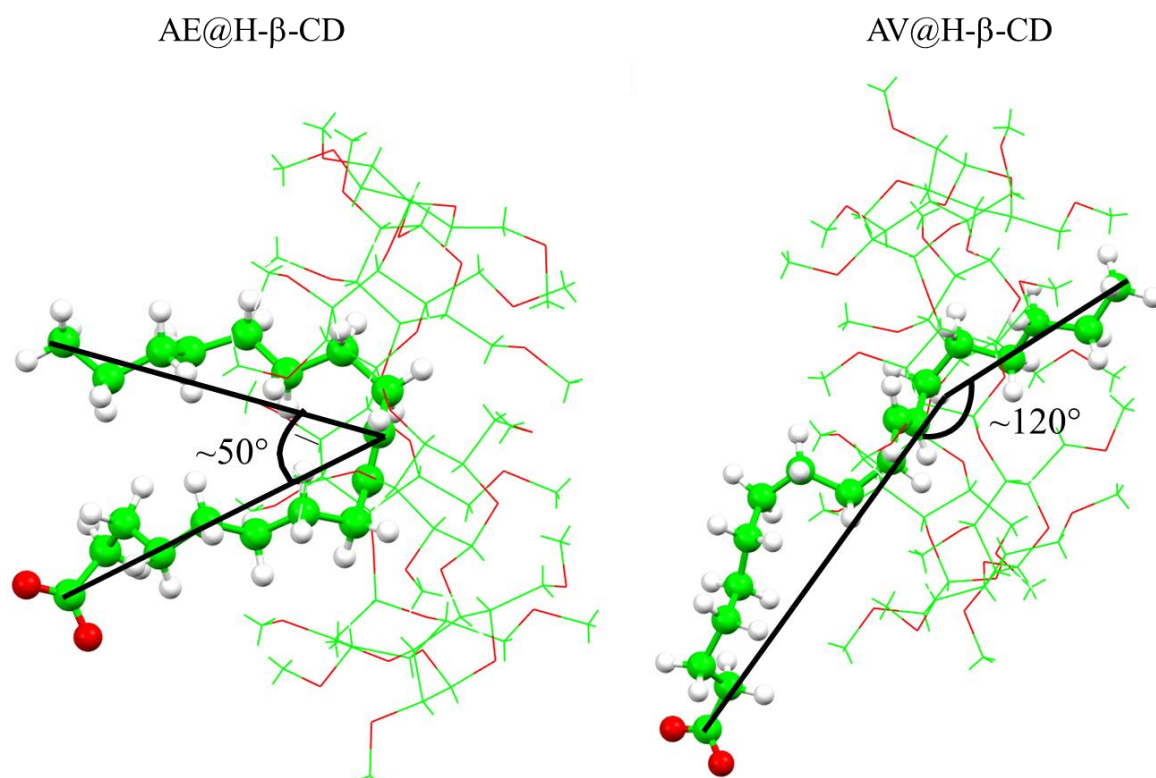
A separação de íons grandes, como os AG, é conduzida frequentemente em contrafluxo, como discutido em seções anteriores. A ordem de migração dos analitos é definida pela  $\mu_{ELE}$  de cada composto, que é proporcional a carga iônica ( $q$ ) e inversamente proporcional ao raio solvatado ( $r$ ) do analito (Equação 1, página 41). Como neste método foi empregada uma ciclodextrina modificada que interage com os analitos de forma diferenciada promovendo a separação dos isômeros geométricos e posicionais do ácido octadecenoico, é importante ainda considerar a formação do complexo de inclusão do analito na ciclodextrina na ordem de eluição. Sem o emprego deste tipo de seletor é bastante difícil alcançar a separação dos AGT posicionais e geométricos, uma vez que estes têm magnitudes de  $q$  e  $r$  similares.

Isômeros *cis* e *trans* interagem diferentemente com a heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina, por conta da diferente geometria dos compostos, que foi ilustrada na Figura 1 (página 25). Experimentalmente nota-se que os isômeros *cis* e *trans* são separados com boa resolução, e isômeros *trans* que possuem uma geometria linear, migram primeiro, tanto em GC (coluna CP SIL 88) quanto em CZE (contrafluxo). Entretanto, é difícil explicar como ocorre a separação dos isômeros *trans*, que possuem características tão semelhantes.

Neste sentido, como abordagem final deste estudo, foi conduzida uma investigação de simulação por modelagem molecular em parceria com o Núcleo de Estudos em Química computacional da Universidade Federal de Juiz de Fora, para obter uma visão de como atua a ciclodextrina utilizada neste trabalho na separação dos isômeros posicionais ácido elaídico e ácido vacênico. As estruturas obtidas após 150 ns de simulação são representadas na Figura 28

para os complexos de inclusão do ácido elaídico com a heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina, chamado de AE@H- $\beta$ -CD, e do ácido vacênico com a ciclodextrina, chamado de AV@H- $\beta$ -CD.

Figura 28 - Interação do ácido elaídico e ácido vacênico com a heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina

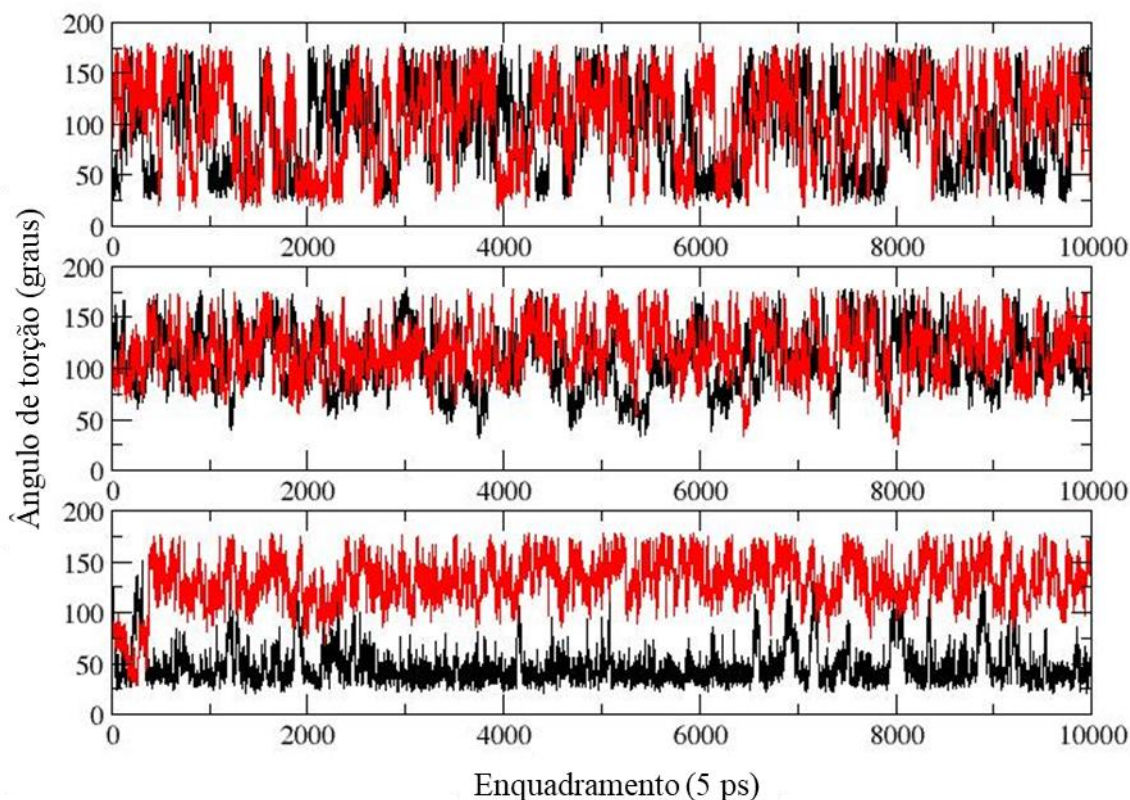


Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2019a).

AE@H- $\beta$ -CD: complexo de inclusão do ácido elaídico com heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina; AV@H- $\beta$ -CD: complexo de inclusão do ácido vacênico com heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina.

Observando-se a Figura 28 pode-se notar que o complexo AE@H- $\beta$ -CD sofreu torção durante a simulação, assumindo uma forma dobrada, enquanto o isômero ácido vacênico se manteve na forma estendida. Essa mudança conformacional foi monitorada pelo ângulo entre os átomos de carbono do carboxilato (cabeça polar), o meio da cadeia e a o grupo metílico terminal, a partir daqui chamado de ângulo de torção. Os resultados estão sendo mostrados na Figura 29, onde avaliaram-se os isômeros sem interação com nenhum meio, interagindo com a ciclodextrina natural  $\beta$ -ciclodextrina (que havia sido também utilizada experimentalmente, Figura 21-B, página 78) e com a ciclodextrina modificada heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina.

Figura 29 - Ângulo de torção calculado para as estruturas nos últimos 50 ns da simulação.



Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2019a).

Ácido elaídico: preto; ácido vacênico: vermelho. Isômeros sem interação com nenhum meio (acima), isômeros interagindo com a  $\beta$ -ciclodextrina (meio), isômeros interagindo com a heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina (abaixo).

Pode-se observar que quando os compostos estão interagindo com a ciclodextrina modificada, o ácido elaídico apresenta um arranjo dobrado com ângulo de torção de aproximadamente 50 graus e o ácido vacênico assume uma forma estendida com ângulo de torção de aproximadamente 120 graus. Quando os isômeros não estão interagindo com nenhum meio, estes são muito flexíveis e um equilíbrio entre as formas dobrada e estendida é estabelecida, com ângulo de torção de aproximadamente 100 graus para ambos os isômeros. Interessantemente, quando a ciclodextrina natural  $\beta$  é parte do sistema, os isômeros ainda se comportam desta mesma maneira, mantendo uma conformação estendida com flexibilidade reduzida. Estes dados corroboram com o que foi observado experimentalmente na Figura 21-B, página 78, onde pode-se observar que não é possível separar os isômeros quando se utiliza a ciclodextrina natural  $\beta$ , mas utilizando a ciclodextrina modificada, acontece a separação.

Adicionalmente, foi calculada a energia de interação entre os analitos e as ciclodextrinas natural e a ciclodextrina modificada, considerando-se as contribuições das forças de Van der

Waals e das forças eletrostáticas, bem como a energia de interação em fase gasosa e em solução aquosa (Tabela 10). As contribuições hidrofóbicas desempenharam um papel principal para a energia global de interação. Para o ácido elaídico e o ácido vacênico os valores encontrados para energias de interação em solução aquosa foram  $-26,9$  e  $-28,6$  kcal mol<sup>-1</sup>, respectivamente quando se considera a interação com a heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina. Já quando a  $\beta$ -ciclodextrina foi utilizada como hospedeira, os complexos de inclusão foram menos estáveis (aproximadamente  $-13$  kcal mol<sup>-1</sup> para ambos isômeros) e não diferiram entre o ácido elaídico e o ácido vacênico.

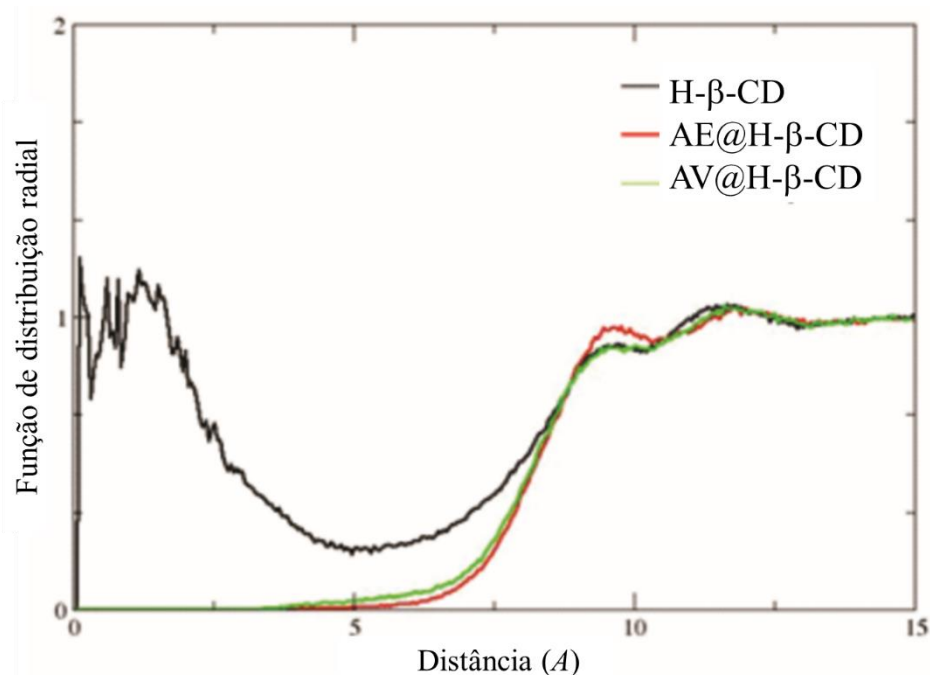
Tabela 10 - Energias de interação calculadas para os distintos complexos de inclusão

Energias de interação	AE@H- $\beta$ -CD	AV@H- $\beta$ -CD	AE@ $\beta$ -CD	AV@ $\beta$ -CD
Contribuição das forças de Van der Waals	-28,6	-29,6	-20,0	-19,6
Contribuição das forças eletrostáticas	0,7	0,5	-35,7	-34,9
Energia de interação em fase gasosa	-27,9	-29,1	-55,8	-54,6
Energia de interação em solução aquosa	-26,9	-28,6	-13,1	-13,2

Fonte: Elaborada pela autora (2020).  
Valores estão em kcal mol<sup>-1</sup>.

O tamanho do soluto em solução, de significativa importância quando se avalia a ordem de eluição dos compostos, foi estimado da função de distribuição radial entre o centro de massa do soluto e o oxigênio de água. Na Figura 30 são mostrados os tamanhos dos solutos (em Angström, Å) quando se considera apenas a heptakis (2,3,6-tri-*o*-metil)- $\beta$ -ciclodextrina, o AE@H- $\beta$ -CD e AV@H- $\beta$ -CD.

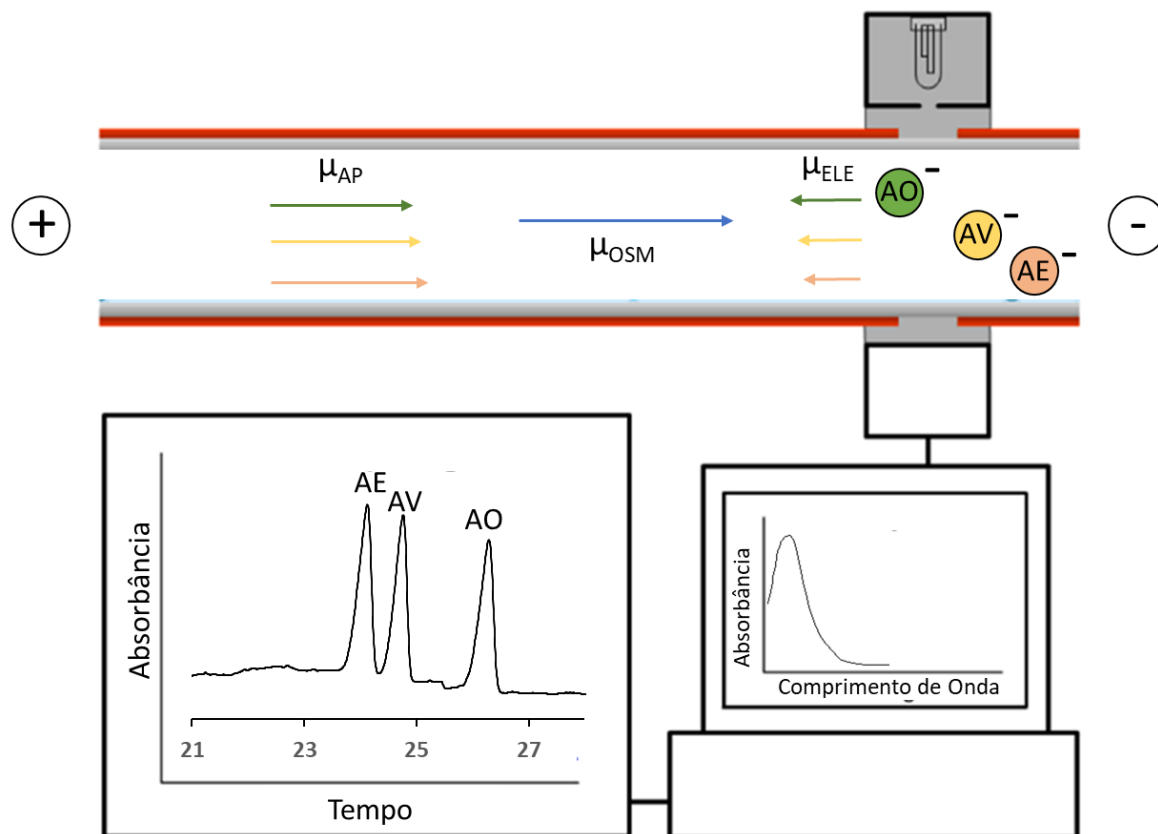
Figura 30 - Função de distribuição radial entre o centro de massa do soluto e o oxigênio da água



Fonte: Elaborada pela autora (2020).  
Valores estão em Angström.

Percebe-se que para o AE@H-β-CD, a primeira camada de solvatação se estende até 11,17 Å e corresponde a 113 moléculas de água. Para o AV@H-β-CD, a primeira camada de solvatação é menor, estendendo-se até 10,32 Å, o que corresponde a 73 moléculas de água ao redor do soluto, aproximadamente. Isso sugere uma maior agregação (soluto + solvente) para o ácido elaídico, o que está intimamente relacionado a ordem de migração observada experimentalmente. Com uma maior agregação de solvente, o ácido elaídico tem um raio solvatado maior e conseqüentemente,  $\mu_{ELE}$  menor. Por esta razão, como a análise é conduzida em contrafluxo, a  $\mu_{AP}$  do ácido elaídico é maior e o analito tem um tempo de migração menor, migrando antes do ácido vacênico, como ilustrado na Figura 31, onde é esquematizada a migração dos AG considerados neste estudo em contrafluxo.

Figura 31 - Migração em contra fluxo para os isômeros posicionais e geométricos do ácido octadecenóico estudados



Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2019a).  
Ácido elaídico (AE), ácido vacênico (AV) e ácido oleico (AO).

Este estudo que contempla o desenvolvimento de um método por CZE-UV para discriminação dos isômeros majoritários C18:1 (*cis* e *trans*) em alimentos foi publicado na revista *Analytica Chimica Acta* (AMORIM *et al.*, 2019a) e está disponível através do DOI 10.1016/j.aca.2018.10.057.

## 5 OUTRAS METODOLOGIAS PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM ALIMENTOS ENVOLVENDO TÉCNICAS ELETROFORÉTICAS, CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS ASSOCIADAS A MODELOS MULTIVARIADOS

Além das metodologias apresentadas envolvendo AGT, que foram o foco principal do projeto de pesquisa de doutorado, outros métodos foram estudados para quantificação e identificação de AG em alimentos e serão brevemente apresentados nesta seção.

### 5.1 METODOLOGIAS POR ELETROFORESE CAPILAR

Nesta subseção, serão apresentados outros métodos estudados para determinação de AG empregando-se CE para análise de alguns óleos vegetais e marinhos.

#### 5.1.1 Determinação de ácidos graxos em amostras de óleos vegetais usados como suplementação nutricional

Com o propósito de uma rápida análise de óleos vegetais utilizados como suplementação nutricional, um método por CZE com detecção indireta na região do UV previamente otimizado (CASTRO BARRA *et al.*, 2013) foi aplicado e validado para análise de óleo de cártamo, linhaça, abacate e prímula, compostos majoritariamente pelos AG C16:0, C18:0, C18:1 *9c*, C18:2 *9c12c* e C18:3 *9c12c15c*, em diferentes proporções. As amostras foram analisadas em menos de 10 minutos, como mostra a Figura 32 e o preparo de amostras compreendeu apenas uma reação de saponificação (como descrito na seção 3.1.2, página 50, exceto que diluição foi de 5% e a concentração do padrão interno, C13:0, foi de 0,5 mmol L<sup>-1</sup>).

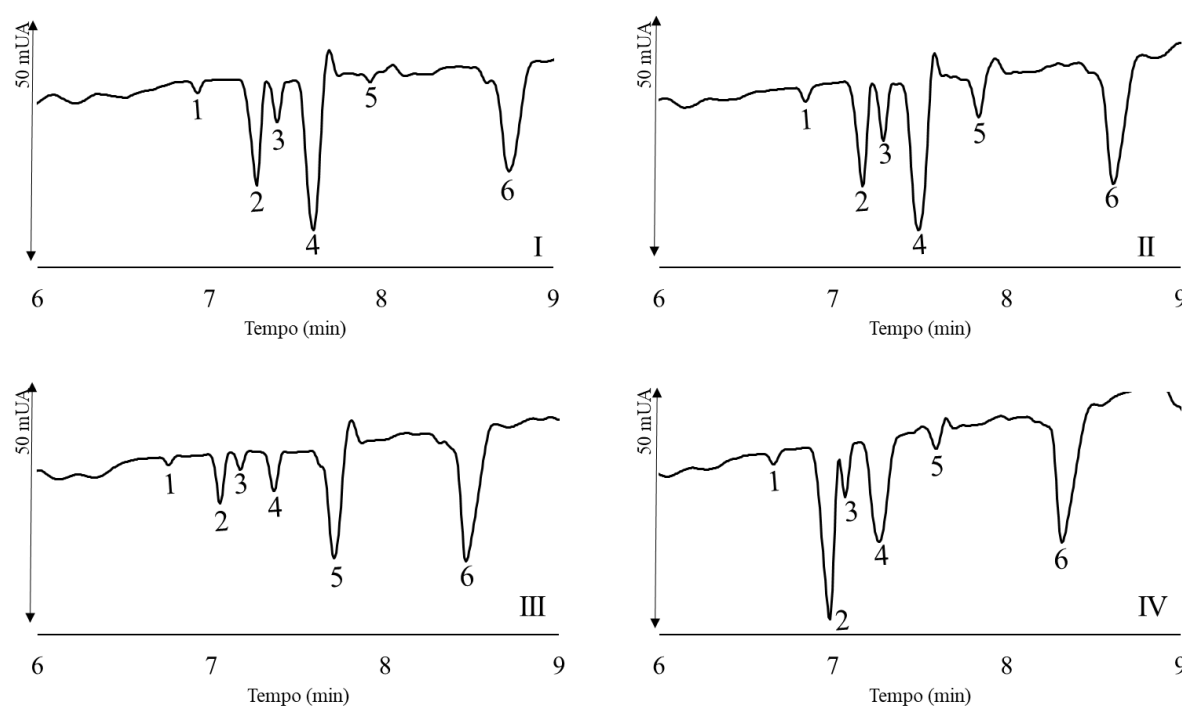
As condições instrumentais empregadas foram: temperatura de 25 °C; tensão de +19 kV; injeção hidrodinâmica (12 mbar por 4 s); detecção no comprimento de onda de 224 nm (2,5 Hz); e capilar com  $C_{tot}$ : 48.5 cm (40 cm  $C_{ef}$ ), 75 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. O eletrólito foi composto por 15 mmol L<sup>-1</sup> de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH = 6,8), 4 mmol L<sup>-1</sup> de dodecil benzeno sulfonato de sódio (cromóforo), 8,3 mmol L<sup>-1</sup> Brij<sup>®</sup> 35, 45 % v/v acetoneitrila e 2,1 % octanol.

A validação do método compreendeu ensaios de linearidade, repetibilidade, exatidão e cálculos dos limites de detecção e quantificação. A exatidão do método foi avaliada por GC,



nas condições experimentais descritas nas seções 3.1.3 e 3.1.5 (páginas 50 e 53). Repetibilidades inter e intra dia (considerando tempo de migração em amostras injetadas em quadruplicata) resultaram em desvios-padrão relativos < 3 %. Adicionalmente, diferenças significativas não foram encontradas num intervalo de 95 % de confiança quando foram comparados os resultados obtidos por CZE e GC. Limites de detecção calculados variaram de 0,01 – 0,02 mmol L<sup>-1</sup> e os limites de quantificação variaram de 0,05 – 0,07 mmol L<sup>-1</sup>. Este trabalho foi publicado na revista LWT – Food Science and Technology e pode ser consultado integralmente pelo DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108380 (AMORIM *et al.*, 2019b).

Figura 32 - Eletroferogramas de suplementos de óleo de cártamo (I), óleo de prímula (II), óleo de linhaça (III) e óleo de abacate (IV) analisados por Eletroforese Capilar de Zona com Detecção Indireta na Região do Ultravioleta



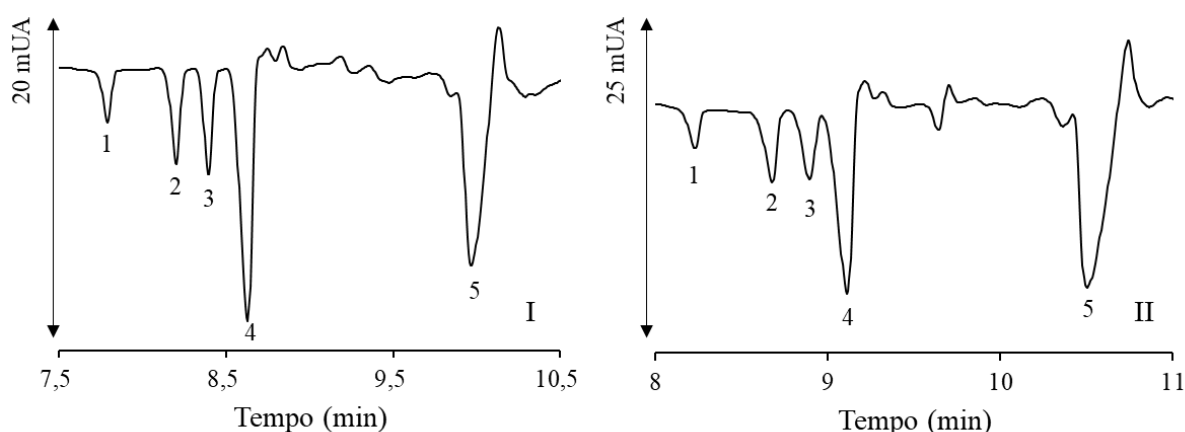
Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2019b).

Condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica (12 mbar por 4 s), temperatura do cartucho mantida em 25 °C, tensão aplicada de +19 kV, capilar com comprimento total de 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo), 75 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. Comprimento de onda de detecção: 224 nm. Composição do eletrólito: 15 mmol L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH = 6,8), 4 mmol L<sup>-1</sup> dodecil benzeno sulfonato de sódio, 8,3 mmol L<sup>-1</sup> Brij® 35, 45 % v/v acetonitrila, e 2,1 % 1-octanol. Picos: 1, C18:0; 2, C18:1 9c; 3, C16:0; 4, C18:2 9c12c; 5, C18:3 9c12c15c, 6, C13:0 (padrão interno).

### 5.1.2 Determinação de ácidos graxos em amostras de óleo de semente de abóbora e cosméticos contendo o óleo em sua composição

O óleo de semente de abóbora é composto pelos AG majoritários C16:0, C18:0, C18:1 *9c* e C18:2 *9c12c* e tem sido utilizado na produção de cosméticos pelas suas propriedades emolientes, além de ser consumido como suplementação nutricional. CZE com detecção indireta no UV também foi empregada para análise deste óleo vegetal, bem como de cosméticos contendo o óleo em sua composição, como mostrado na Figura 33, e o método foi validado para esta abordagem.

Figura 33 - Eletroferogramas de amostras de óleo de semente de abóbora (I) e creme hidratante contendo o óleo (II), analisados por Eletroforese Capilar de Zona com Detecção Indireta na Região do Ultravioleta



Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2019c), com permissão da Royal Society of Chemistry. Condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica (12 mbar por 4 s), temperatura do cartucho mantida em 25 °C, tensão aplicada de +19 kV, capilar com comprimento total de 48,5 cm (40 cm de comprimento efetivo), 75 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. Comprimento de onda de detecção: 192 nm. Composição do eletrólito: 15 mmol L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH = 6,8), 4 mmol L<sup>-1</sup> dodecil benzeno sulfonato de sódio, 8,3 mmol L<sup>-1</sup> Brij<sup>®</sup> 35, 45 % v/v acetonitrila, e 2,1 % 1-octanol. Picos: 1, C18:0; 2, C18:1 *9c*; 3, C16:0; 4, C18:2 *9c12c*; 5, C13:0 (padrão interno).

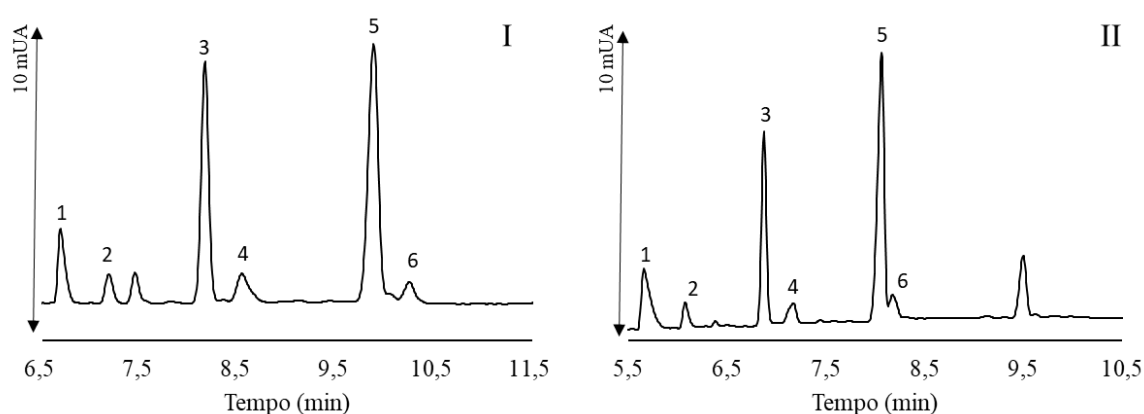
O preparo de amostras compreendeu uma saponificação para ambas matrizes (como descrito na seção 3.1.2, página 50, exceto que diluição foi de 2% para óleos e 15% para cremes hidratantes, e a concentração do padrão interno, C13:0, foi de 0,5 mmol L<sup>-1</sup>). As análises foram realizadas num tempo de corrida menor que 10 min. A validação do método também compreendeu ensaios de linearidade, repetibilidade, exatidão e cálculos dos limites de detecção e quantificação, como em 5.1.1. Repetibilidades inter e intra dia resultaram em desvios-padrão

relativos < 6,5 %. Diferenças significativas não foram evidenciadas num intervalo de 95 % de confiança quando comparados os resultados obtidos por CZE e GC. Os limites de detecção calculados variaram de 0,03 – 0,05 mmol L<sup>-1</sup> e o limite de quantificação foi ≥ 0,1 mmol L<sup>-1</sup>. Este trabalho foi publicado na revista *Analytical Methods* e pode ser consultado integralmente pelo DOI: 10.1039/c9ay01917k (AMORIM *et al.*, 2019c).

### 5.1.3 Determinação de ácidos graxos $\omega$ -3 em amostras de óleos marinhos

Um método para determinação dos AG  $\omega$ -3 eicosapentaenóico (C20:5 5c8c11c14c17c) e docosahexaenóico (C22:6 4c7c10c13c16c19c) foi desenvolvido utilizando-se CZE-UV e aplicado à análise de suplementos de óleos de origem marinha (óleos de peixe e krill). Foi feita a otimização do eletrólito de corrida e das condições instrumentais univariadamente, a partir de condições anteriormente descritas para determinação destes AG em ovos (PORTO; SOUZA; DE OLIVEIRA, 2011). O preparo de amostras compreendeu apenas uma etapa de saponificação dos óleos marinhos (como descrito na seção 3.1.2, página 50, exceto que diluição foi de 5% e a concentração do padrão interno, C18:1 9t, foi de 0,5 mmol L<sup>-1</sup>). Amostras foram analisadas em menos de 10 min, como mostrado na Figura 34.

Figura 34 - Eletroferogramas de amostras de óleo de peixe (I) e óleo de krill (II), analisados por Eletroforese Capilar de Zona com Detecção Direta na Região do Ultravioleta



Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2020a).

Condições eletroforéticas: injeção hidrodinâmica (25 mbar por 5 s), temperatura do cartucho mantida em 27 °C, tensão aplicada de +27 kV, capilar com comprimento total de 33,5 cm (25 cm de comprimento efetivo), 50  $\mu$ m de diâmetro interno e 375  $\mu$ m de diâmetro externo. Comprimento de onda de detecção: 200 nm. Composição do eletrólito: 30 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 12 mmol L<sup>-1</sup> Brij<sup>®</sup> 35, 33 % v/v metanol, 17 % v/v acetonitrila. Picos: 1, C18:1 9t (padrão interno); 2, C18:1 9c; 3, C22:6 4c7c10c13c16c19c; 4, C18:2 9c12c; 5, C20:5 5c8c11c14c17c; 6, C18:3 9c12c15c.

As condições instrumentais empregadas foram: temperatura de 27 °C; tensão de +27 kV; injeção hidrodinâmica (25 mbar por 5 s); detecção no comprimento de onda de 200 nm; e capilar com  $C_{tot}$ : 33.5 cm (25 cm  $C_{ef}$ ), 50  $\mu$ m de diâmetro interno e 375  $\mu$ m de diâmetro externo. O eletrólito foi composto por 30 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.10H<sub>2</sub>O, 12.0 mmol L<sup>-1</sup> Brij® 35, 33 % v/v metanol, 17 % v/v acetonitrila.

A validação do método contemplou ensaios de linearidade, repetibilidade, exatidão e cálculos dos limites de detecção e quantificação. As condições experimentais para GC foram empregadas de acordo com método anteriormente otimizado (DE LA FUENTE; RODRÍGUEZ-PINO; JUÁREZ, 2015). Baixos desvios-padrão relativos (< 1,72 %) foram calculados para ambos analitos no teste de repetibilidade considerando tempo de migração e concentração em uma amostra injetada em quintuplicata. Diferenças significativas entre os métodos por CZE e GC também não foram evidenciados num intervalo de 95 % de confiança. Os limites de detecção calculados foram 0,0011 e 0,0013 mmol L<sup>-1</sup> para os ácidos docosahexaenóico e eicosapentaenóico, respectivamente; enquanto os limites de quantificação foram 0,0037 mmol L<sup>-1</sup> para o ácido docosahexaenóico e 0,0043 mmol L<sup>-1</sup> para o ácido eicosapentaenóico. Este trabalho foi realizado parcialmente no Instituto de Investigação em Ciências da Alimentação (Madrid, Espanha) durante período de doutorado sanduíche no exterior, e foi publicado na revista *Journal of Chromatography A*. O mesmo pode ser consultado integralmente através do DOI 10.1016/j.chroma.2019.460641 (AMORIM *et al.*, 2020a).

Nesta mesma linha de pesquisa, duas revisões da literatura também foram recentemente escritas. Em uma, publicada na revista *Food Analytical Methods* (AMORIM, DE OLIVEIRA, 2020a), disponível sob o DOI 10.1007/s12161-020-01772-w, foram discutidos os métodos por CE desenvolvidos na última década para determinação de lipídios em alimentos. Em outra, publicada na revista *Electrophoresis* (AMORIM, *et al.*, 2020e), disponível sob o DOI 10.1002/(ISSN)1522-2683, os métodos disponíveis na literatura desde a década de 90 para determinação de AG em amostras de óleos vegetais e marinhos empregando-se CE foram abordados.

## 5.2 METODOLOGIAS EMPREGANDO TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Nesta subseção, serão apresentadas as metodologias empregando-se técnicas cromatográficas para análises de amostras de óleo de peixe e chocolates. Essas matrizes foram escolhidas por serem de alta complexidade, uma vez que este estudo preliminar serviu como

base para o desenvolvimento de modelos preditivos e classificatórios empregando métodos multivariados, que serão descritos nas subseções posteriores. Enquanto o foco das metodologias para análise de óleo de peixe foram os AG  $\omega$ -3, a ênfase das metodologias para análise de chocolates foi a distribuição isomérica dos AGT.

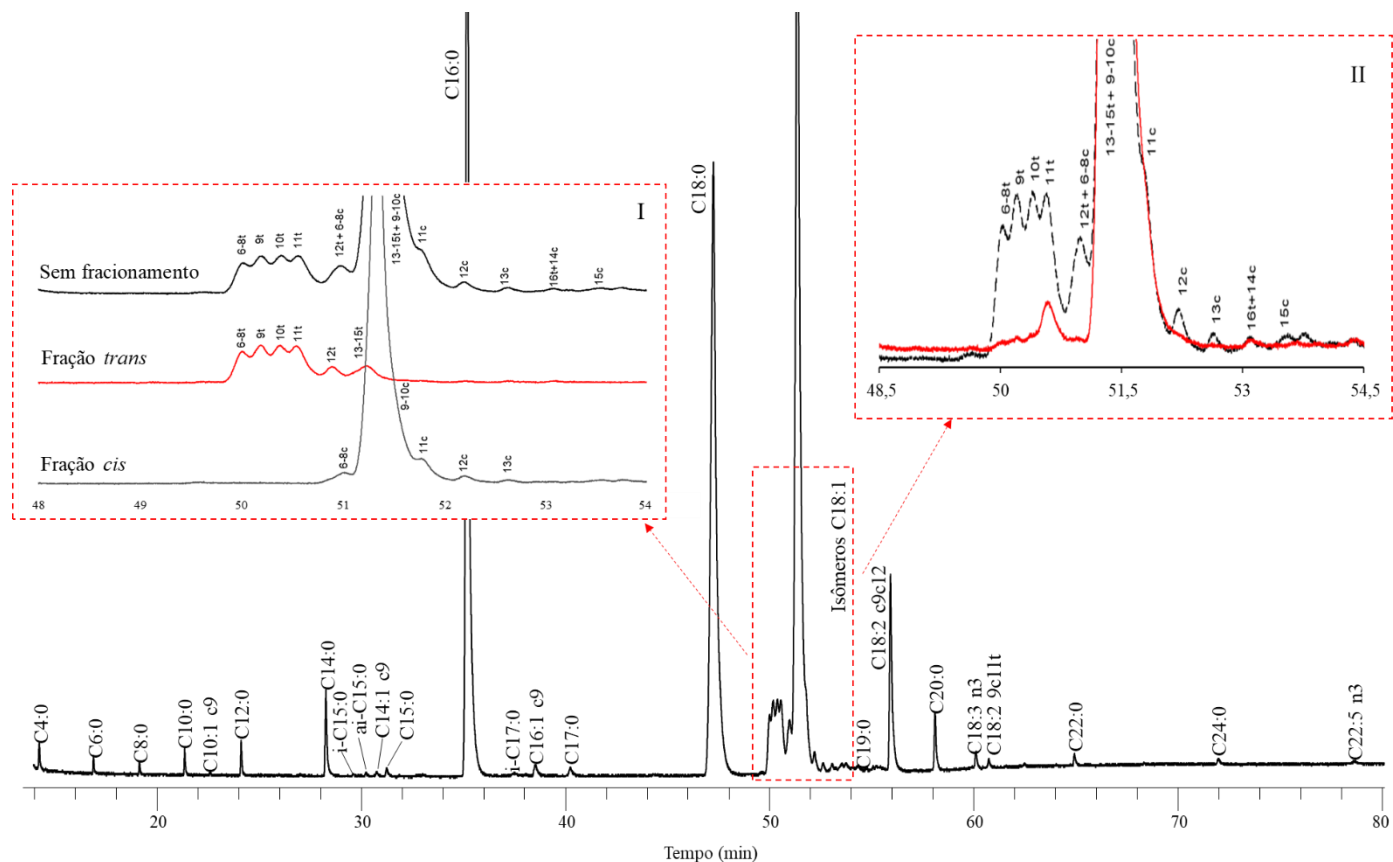
### 5.2.1 Metodologias para análise de chocolates

O estudo de diversas amostras de chocolate (ao leite, amargo e branco) adquiridas no Brasil foi feito empregando-se GC-FID e GC-MS, visando principalmente a determinação de AGT isoméricos posicionais, a distinção de amostras contendo gordura vegetal hidrogenada por quimiometria e a verificação das informações sobre AGT contidos nas embalagens dos produtos. O preparo das amostras compreendeu uma etapa de extração lipídica (detalhada na subseção 3.1.3, página 50), transesterificação com catálise básica (ISO, 2002a) e fracionamento *cis/trans* por extração em fase sólida com cartuchos Ag<sup>+</sup> (KRAMER *et al.*, 2008).

Na Figura 35 são ilustrados os cromatogramas de amostras de chocolates ao leite analisadas por GC-FID. Na ampliação em I é possível observar a região dos isômeros C18:1 de um chocolate contendo gordura vegetal hidrogenada analisado com e sem o fracionamento dos metis ésteres. Na ampliação em II, se ilustra a diferença na proporção dos isômeros C18:1 *trans* de um chocolate ao leite contendo gordura vegetal hidrogenada, e de outro sem este tipo de gordura em sua composição. Percebe-se a utilidade do fracionamento dos metis ésteres (Figura 35-I) no que diz respeito a observação de menor coeluição de picos C18:1 *cis/trans*. Também pode-se notar que o ácido vacênico (C18:1 11*t*) é majoritário em amostras contendo apenas leite, enquanto vários outros isômeros estão presentes em amostras contendo gordura vegetal hidrogenada (Figura 35-II), como já ilustrado na Figura 3 (página 28).

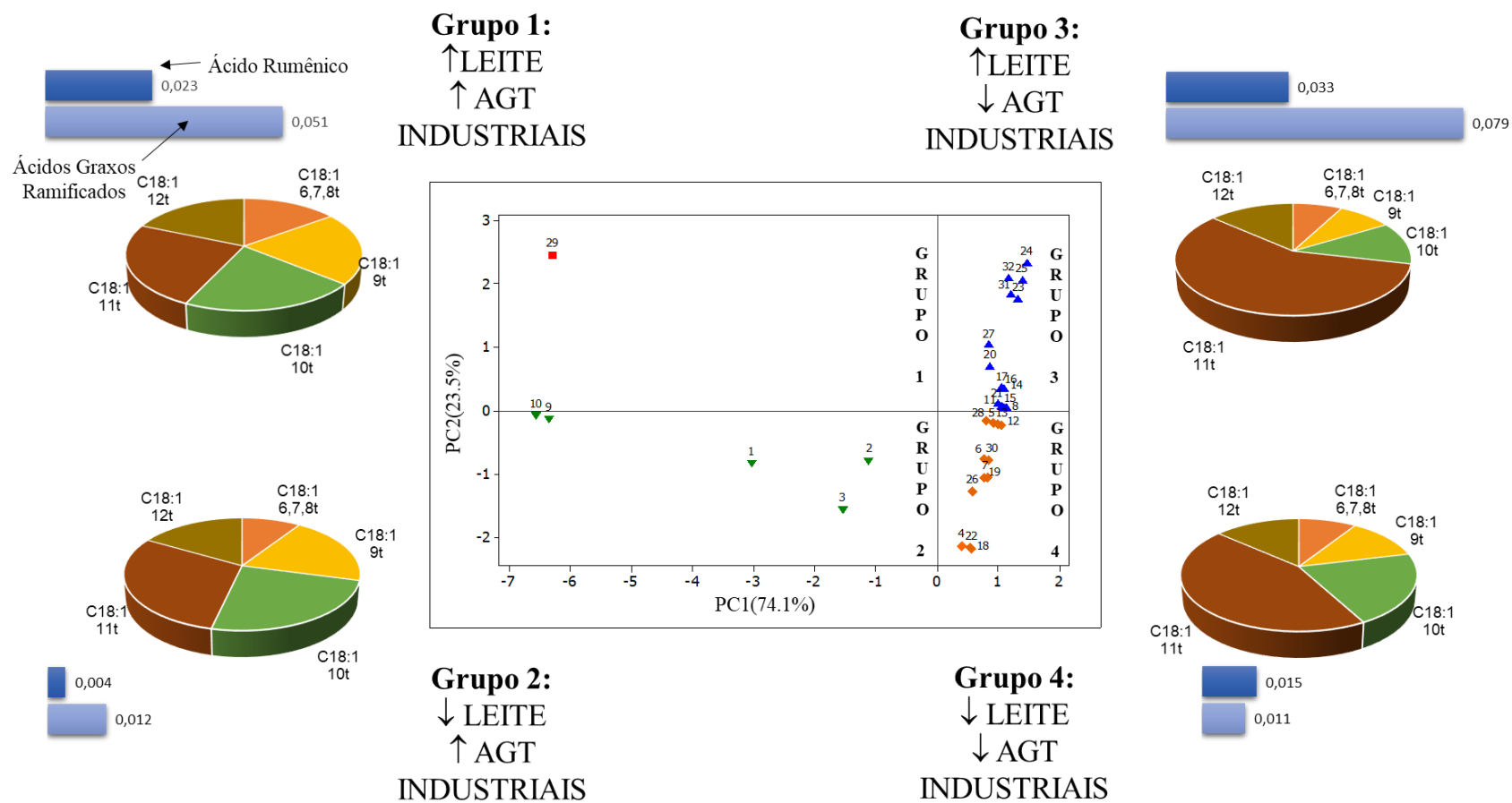
Através de ferramentas quimiométricas foi possível distinguir 4 grupos de chocolates dentre todas as amostras analisadas, como ilustra a Figura 36: chocolates com alto teor de AGT (industriais) e alto teor de leite (grupo 1); alto teor de AGT e baixo teor de leite (grupo 2); baixo teor de AGT e alto teor de leite (grupo 3) e baixo teor de AGT e baixo teor de leite (grupo 4). Os marcadores da presença de leite foram os AG ramificados e o ácido rumênico e o alto teor de AGT industriais foi avaliado pela distribuição isomérica dos AGT C18:1. Verificou-se que algumas amostras não foram etiquetadas conforme legislação atual e possuíam teores de AGT totais maiores que o informado, incluindo amostras que aparentemente não possuíam gordura vegetal hidrogenada em sua composição.

Figura 35 - Cromatogramas de amostras de chocolates ao leite



Fonte: Reproduzido (adaptado) com permissão de Amorim *et al.* (2019d). Direitos autorais (2019) American Chemical Society. (I) Separação dos isômeros C18:1 em uma amostra de chocolate contendo gordura vegetal hidrogenada com e sem fracionamento prévio. (II) Distribuição isomérica de um chocolate contendo gordura vegetal hidrogenada (linha preta) e um chocolate sem gordura vegetal hidrogenada (linha vermelha). Condições instrumentais: temperaturas do injetor e do detector foram de 250 °C; volume de injeção 1,0 µL (split 1:100); programa de temperatura: inicialmente 45 °C; depois de 4 min, elevada a uma taxa 13 °C min<sup>-1</sup> até 165 °C e mantida por 35 min, depois foi aumentada para 215 °C a 4 °C min<sup>-1</sup> e mantida por 30 min. Hélio foi o gás de arraste a um fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Coluna: CPSIL-88 (100 m, 0,25 mm x 0,2 µm).

Figura 36 - Análise por componentes principais das 32 amostras de chocolates e distribuição de ácidos graxos marcadores do leite (gráfico de barras) e isômeros C18:1 *trans* (gráfico de setores) em uma amostra de cada grupo



Fonte: Reproduzido (adaptado) com permissão de Amorim *et al.* (2019d). Direitos autorais (2019) American Chemical Society.

O método cromatográfico utilizado neste estudo já havia sido previamente otimizado para aplicação em outras matrizes alimentícias (DE LA FUENTE; RODRÍGUEZ-PINO; JUÁREZ, 2015). Os AG das 32 amostras foram quantificados por GC-FID através do cálculo do fator de resposta de amostra de concentração conhecida (ISO, 2002b), e a identificação dos AG foi feita por comparação do tempo de retenção com mistura de padrões e corroborada por GC-MS.

Este trabalho foi conduzido integralmente no Instituto de Investigação em Ciências da Alimentação (Madrid, Espanha), e foi publicado na revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. O mesmo pode ser consultado através do DOI 10.1021/acs.jafc.9b05603 (AMORIM *et al.*, 2019d).

### **5.2.2 Metodologias para análise de óleos de peixe**

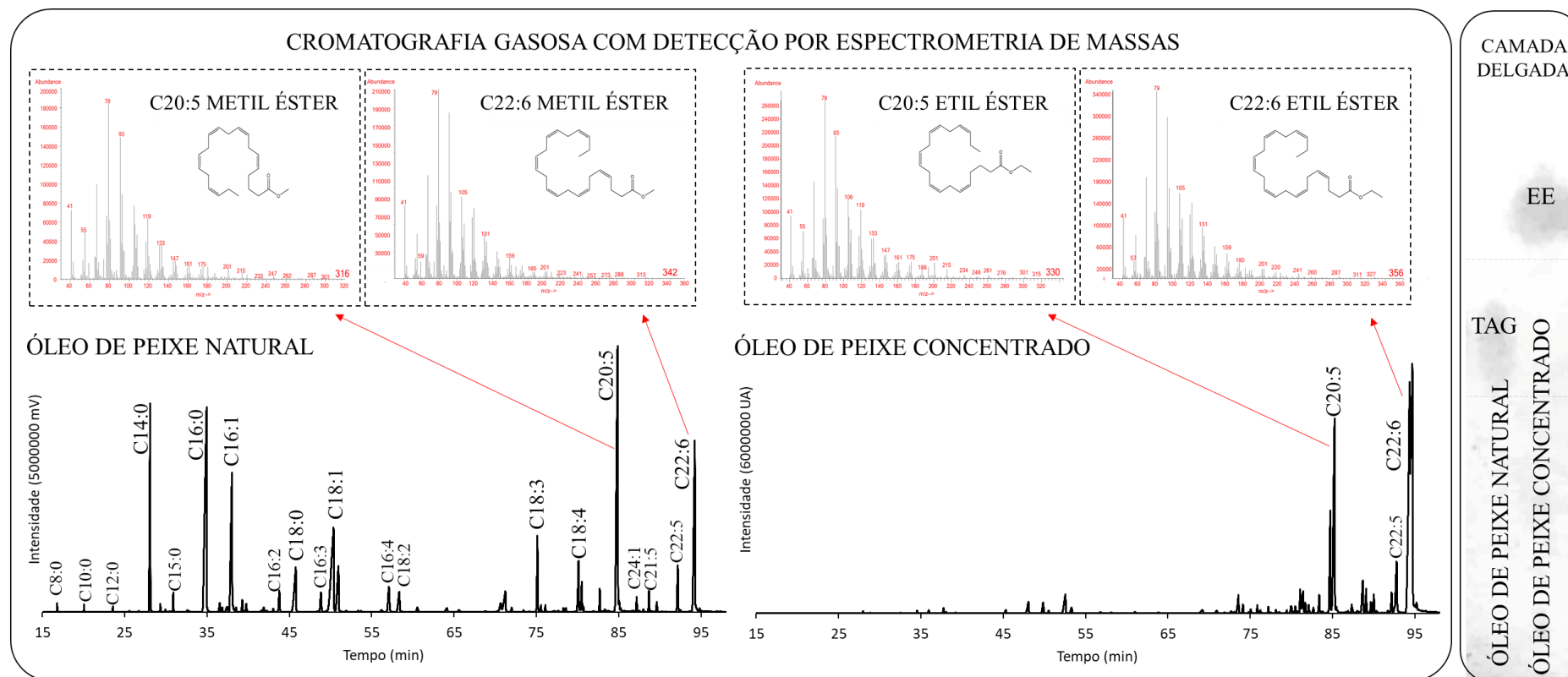
O estudo de diferentes amostras de óleo de peixe adquiridos em lojas físicas e online do Brasil, Espanha, Estados Unidos e Canadá, vendidos na sua forma natural e concentrada, foi feito empregando-se TLC, GC-FID e GC-MS, visando principalmente a distinção de AG na forma de triacilgliceróis e etis ésteres.

A justificativa deste estudo se deve ao fato de que enquanto triacilgliceróis são geralmente encontrados em suplementos naturais, etis ésteres são encontrados majoritariamente em suplementos concentrados e muitos estudos tem evidenciado uma maior biodisponibilidade dos triacilgliceróis em comparação aos etis ésteres.

O preparo de amostras para GC compreendeu uma etapa de transesterificação por catálise básica (ISO, 2002a) e as análises ocorreram por emprego de método anteriormente otimizado (DE LA FUENTE; RODRÍGUEZ-PINO; JUÁREZ, 2015). Assim, triacilgliceróis foram analisados como metis ésteres de AG. As análises por TLC foram realizadas seguindo um método descrito na literatura (SRIGLEY; ORR-TOKLE, 2018). Na Figura 37 são ilustradas as principais diferenças no perfil cromatográfico de óleos de peixe naturais e concentrados quando analisados por TLC, GC-FID e GC-MS.



Figura 37 - Amostras de óleo de peixe natural e concentrado analisados por Cromatografia Gasosa e Cromatografia em Camada Delgada



Fonte: Adaptado de Amorim *et al.* (2020b).

Condições instrumentais: temperaturas do injetor, fonte de íons e interface 250, 150 e 230 °C; respectivamente. Volume de injeção 1,0 µL (split 1:20); programa de temperatura: inicialmente 45 °C; depois de 4 min, elevada a uma taxa 13 °C min<sup>-1</sup> até 165 °C e mantida por 35 min, depois foi aumentada para 215 °C a 4 °C min<sup>-1</sup> e mantida por 30 min. Hélio foi o gás de arraste a 1 mL min<sup>-1</sup>. Coluna: CPSIL-88 (100 m, 0,25 mm x 0,2 µm). MS: 400 µA, 70 eV, m/z 30-400. Cromatografia em Camada Delgada realizada como em Srigley; Orr-Tokle, (2018). TAG: triacilgliceróis; EE: etis ésteres.

Foi possível distinguir triacilgliceróis e etis ésteres empregando-se qualquer uma das técnicas, como ilustrado (Figura 37). O método por TLC empregado resultou em diferentes fatores de retenção para os diferentes tipos de AG. Por GC, foi possível visualizar diferentes tempo de retenção para etis ésteres e triacilgliceróis quando empregada a detecção por FID, bem como foram observados diferentes espectros de massas para os diferentes tipos de AG quando foi utilizada GC-MS. A identificação dos AG por FID foi feita por comparação com o tempo de retenção de mistura de padrões e foi corroborada por MS.

Dentre dez amostras de óleo de peixe analisadas, adquiridas no mercado nacional, apenas uma apresentou AG na forma de etis ésteres. Em adição, todas amostras apresentaram o conteúdo de AG  $\omega$ -3 na embalagem conforme legislação local (que permite uma variação de  $\pm 20\%$  no conteúdo informado), com exceção de uma amostra, que apresentou conteúdo total de ácidos graxos  $\omega$ -3 inferior a 80% do valor informado. Este trabalho foi conduzido integralmente no Instituto de Investigação em Ciências da Alimentação (Madrid, Espanha) e foi publicado na revista *Brazilian Journal of Analytical Chemistry* (AMORIM, *et al.*, 2020b). Está disponível através do DOI: 10.30744/brjac.2179-3425.AR-19-2020.

### 5.3 METODOLOGIAS EMPREGANDO TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS ASSOCIADAS A MODELOS MULTIVARIADOS

Nesta subseção, serão apresentadas metodologias empregando-se técnicas espectroscópicas (NMR, ATR-FTIR e Raman) associadas a modelos multivariados para predição ou classificação de amostras. Modelos quantitativos foram desenvolvidos para predição de AGT totais e isoméricos em amostras de chocolates e modelos classificatórios foram desenvolvidos para diferenciar amostras de óleo de peixe contendo AG na forma de triacilgliceróis e etis ésteres. Estes estudos também foram realizados em parceria com o Instituto de Investigação em Ciências da Alimentação (Madrid, Espanha), durante doutorado sanduíche no exterior.

A aquisição dos espectros de ATR-FTIR e Raman foi feita diretamente na fração lipídica das amostras (nos óleos de peixe após retirada da capsula gelatinosa e nos chocolates após extração da gordura, como descrito na seção 3.1.3, página 50). Para aquisição dos espectros NMR, 5 mg de amostra foram dissolvidas em 500  $\mu$ L de clorofórmio deuterado.

Os espectros ATR-FTIR foram obtidos usando um espectrômetro Bruker Alpha, localizado no *Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición*, Madrid, Espanha, no

modo de absorvância, na faixa de 650-4000  $\text{cm}^{-1}$ , com 16 *scans* a uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . O tempo de análise foi de 20 s por amostra. Os espectros Raman foram obtidos usando um espectrômetro Bruker FT Raman RFS 100/S, instalado no departamento de química da Universidade Federal de Juiz de Fora, com potência do laser ajustado para 100 mW. Faixa de aquisição de dados foi de 50 a 3600  $\text{cm}^{-1}$  (deslocamento Stokes), com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . 32 *scans* foram considerados e o tempo de aquisição de cada espectro foi de aproximadamente 1 min. Os experimentos de NMR foram realizados em um equipamento Bruker Avance III HD, localizado no departamento de química da Universidade Federal de Juiz de Fora, operado a 500 MHz. Espectros foram obtidos com 16 *scans* e o tempo de aquisição de cada espectro foi de aproximadamente 1 min.

### 5.3.1 Metodologias para predição de ácidos graxos *trans* em amostras de chocolate

Duas metodologias foram desenvolvidas para predição de AGT em amostras de chocolate, uma com NMR (Tabela 11) e outra utilizando-se de ATR-FTIR na Região do Infravermelho Médio (Tabela 12), associadas a regressão por mínimos quadrados parciais. Diferentes amostras com teores variáveis de AGT, calculados inicialmente por GC (subseção 5.2.1, página 99), foram utilizadas para a construção dos modelos, que contemplou etapa de calibração e validação cruzada (70 % das amostras) e predição (30 % das amostras). As amostras utilizadas para a predição foram obtidas organizando os dados em ordem crescente de concentração e selecionando uma em cada três.

Alguns pré-tratamentos do espectro foram estudados, como algoritmo de suavização de Savitzky-Golay (item 3, nas tabelas) (SAVITZKY; GOLAY, 1964), variação normal padrão (item 2) (BARNES; DHANOA; LISTER, 1989), bem como foi avaliada a utilização do espectro sem nenhum pré-tratamento (item 1). Para o estudo por NMR, a ferramenta *icoshift* sempre foi aplicada (SAVORANI; TOMASI; ENGELSEN, 2010). A utilização de toda a região espectral para modelagem (item a, nas tabelas), apenas um intervalo espectral (item b) ou a sinergia entre intervalos (item c) também foi estudada (espectro foi dividido em 20 intervalos). Os modelos foram avaliados considerando 10 variáveis latentes (VL), os coeficientes de correlação para validação cruzada ( $r_{cv}$ ) e predição ( $r_p$ ), e as raízes quadradas dos erros médios quadráticos de validação cruzada e previsão (do inglês, *root-mean-square error of cross-validation and prediction* – *RMSECV*, *RMSEP*).

Tabela 11 - Modelos avaliados para a predição de isômeros posicionais C18:1 *trans* em amostras de chocolate por ressonância magnética nuclear

AG	Modelo	Pré-processamento	Região espectral (cm <sup>-1</sup> )	VL	RMSECV	RMSEP	<i>r</i> <sub>cv</sub>	<i>r</i> <sub>p</sub>
<b>Σ C18:1 6,7,8 <i>t</i></b>	a	1	0.0-6.0	5	0,09	0,07	0,945	0,672
	a	1	5.19-5.46	5	0,07	0,04	0,973	0,940
	a	1	4.10-4.37 & 5.19-5.46	4	0,07	0,05	0,973	0,866
	b	2	0.0-6.0	5	0,07	0,07	0,971	0,814
	<b>b</b>	<b>2</b>	<b>5.19-5.46</b>	<b>5</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	<b>0,989</b>	<b>0,967</b>
	b	2	3.83-4.10 & 5.19-5.46	6	0,05	0,04	0,992	0,966
	c	3	0.0-6.0	4	0,10	0,08	0,933	0,614
	c	3	1.94-2.21	3	0,07	0,07	0,964	0,918
	c	3	1.94-2.21 & 2.75-3.02	3	0,07	0,07	0,966	0,889
<b>C18:1 9 <i>t</i></b>	a	1	0.0-6.0	3	0,13	0,18	0,927	0,719
	a	1	5.19-5.46	3	0,12	0,15	0,946	0,883
	a	1	1.94-2.21 & 5.19-5.46	5	0,12	0,06	0,945	0,978
	b	2	0.0-6.0	3	0,11	0,16	0,952	0,823
	b	2	5.19-5.46	5	0,10	0,07	0,972	0,986
	<b>b</b>	<b>2</b>	<b>3.83-4.10 &amp; 5.19-5.46</b>	<b>7</b>	<b>0,09</b>	<b>0,05</b>	<b>0,976</b>	<b>0,981</b>
	c	3	0.0-6.0	3	0,15	0,17	0,904	0,751
	c	3	1.94-2.21	3	0,12	0,17	0,942	0,943
	c	3	1.94-2.21 & 2.75-3.02	3	0,12	0,18	0,944	0,883

AG	Modelo	Pré-processamento	Região espectral (cm <sup>-1</sup> )	VL	RMSECV	RMSEP	r <sub>cv</sub>	r <sub>p</sub>
<b>C18:1 10t</b>	a	1	0.0-6.0	3	0,19	0,23	0,942	0,719
	a	1	1.94-2.21	3	0,15	0,17	0,966	0,963
	a	1	4.10-4.37 & 5.19-5.46	5	0,14	0,08	0,972	0,959
	b	2	0.0-6.0	3	0,16	0,19	0,959	0,823
	b	2	5.19-5.46	6	0,12	0,06	0,981	0,989
	<b>b</b>	<b>2</b>	<b>1.94-2.21 &amp; 5.19-5.46</b>	<b>4</b>	<b>0,12</b>	<b>0,05</b>	<b>0,977</b>	<b>0,987</b>
	c	3	0.0-6.0	4	0,20	0,20	0,932	0,714
	c	3	1.94-2.21	3	0,15	0,20	0,964	0,971
	c	3	1.94-2.21 & 2.75-3.02	3	0,15	0,21	0,966	0,937
<b>C18:1 11t</b>	a	1	0.0-6.0	3	0,23	0,25	0,928	0,565
	a	1	5.19-5.46	2	0,19	0,24	0,949	0,641
	a	1	1.94-2.21 & 5.19-5.46	7	0,12	0,15	0,980	0,928
	b	2	0.0-6.0	3	0,20	0,23	0,946	0,671
	<b>b</b>	<b>2</b>	<b>1.94-2.21</b>	<b>4</b>	<b>0,16</b>	<b>0,10</b>	<b>0,966</b>	<b>0,941</b>
	b	2	1.94-2.21 & 5.19-5.46	6	0,13	0,13	0,977	0,936
	c	3	0.0-6.0	4	0,25	0,25	0,914	0,471
	c	3	1.94-2.21	2	0,21	0,24	0,941	0,860
	c	3	1.40-1.66 & 1.94-2.21	2	0,19	0,28	0,950	0,441

AG	Modelo	Pré processamento	Região espectral (cm <sup>-1</sup> )	VL	RMSECV	RMSEP	r <sub>cv</sub>	r <sub>p</sub>
C18:1 12t	a	1	0.0-6.0	3	0,14	0,17	0,936	0,635
	a	1	1.94-2.21	3	0,12	0,13	0,954	0,949
	a	1	1.94-2.21 & 5.19-5.46	2	0,11	0,12	0,958	0,885
	b	2	0.0-6.0	3	0,11	0,14	0,959	0,753
	<b>b</b>	<b>2</b>	<b>1.94-2.21</b>	<b>6</b>	<b>0,05</b>	<b>0,06</b>	<b>0,992</b>	<b>0,983</b>
	b	2	1.94-2.21 & 5.19-5.46	7	0,05	0,06	0,993	0,972
	c	3	0.0-6.0	4	0,15	0,14	0,918	0,654
	c	3	1.94-2.21	3	0,12	0,14	0,951	0,946
	c	3	1.94-2.21 & 2.75-3.02	3	0,12	0,14	0,952	0,891
Σ AGT	a	1	0.0-6.0	3	0,76	0,91	0,938	0,665
	a	1	1.94-2.21	3	0,61	0,73	0,961	0,944
	a	1	1.66-1.94 & 5.19-5.46	7	0,55	0,43	0,967	0,909
	b	2	0.0-6.0	3	0,62	0,77	0,959	0,777
	b	2	1.94-2.21	6	0,33	0,40	0,989	0,991
	<b>b</b>	<b>2</b>	<b>1.94-2.21 &amp; 5.19-5.46</b>	<b>7</b>	<b>0,26</b>	<b>0,38</b>	<b>0,993</b>	<b>0,977</b>
	c	3	0.0-6.0	4	0,84	0,82	0,923	0,668
	c	3	1.94-2.21	3	0,64	0,79	0,956	0,984
	c	3	1.94-2.21 & 3.02-3.291	3	0,64	0,79	0,956	0,984

Fonte: Adaptada de Amorim *et al.* (2020c).

Tabela 12 - Modelos avaliados para a predição de isômeros posicionais C18:1 *trans* em amostras de chocolate por Espectroscopia de Infravermelho

AG	Modelo	Pré-processamento	Região espectral (cm <sup>-1</sup> )	VL	RMSECV	RMSEP*	<i>r</i> <sub>cv</sub>	<i>r</i> <sub>p</sub>
<b>Σ C18:1 6,7,8<i>t</i></b>	a	1	4000-650	8	0,24	0,09	0,704	0,957
	a	1	986-818	4	0,08	0,07	0,970	0,967
	<b>a</b>	<b>1</b>	<b>2330-2162 &amp; 986-818</b>	<b>5</b>	<b>0,06</b>	<b>0,07</b>	<b>0,986</b>	<b>0,973</b>
	b	2	4000-650	7	0,22	0,13	0,620	0,909
	b	2	986-818	5	0,09	0,06	0,971	0,980
	b	2	2330-2162 & 986-818	5	0,06	0,07	0,973	0,967
	c	3	4000-650	8	0,20	0,10	0,726	0,945
	c	3	986-818	4	0,07	0,05	0,974	0,983
	c	3	3667-3500 & 986-818	3	0,06	0,05	0,978	0,984
<b>C18:1 9<i>t</i></b>	a	1	4000-650	3	0,38	0,19	0,489	0,887
	a	1	986-818	4	0,07	0,07	0,985	0,984
	<b>a</b>	1	<b>1994-1826 &amp; 986-818</b>	<b>5</b>	<b>0,06</b>	<b>0,07</b>	<b>0,987</b>	<b>0,986</b>
	b	2	4000-650	7	0,33	0,16	0,563	0,928
	b	2	986-818	7	0,11	0,06	0,957	0,994
	b	2	3166-2999 & 986-818	7	0,08	0,07	0,978	0,986
	c	3	4000-650	8	0,30	0,09	0,684	0,970
	c	3	986-818	5	0,06	0,06	0,985	0,994
	<b>c</b>	<b>3</b>	<b>3166-2999 &amp; 986-818</b>	<b>5</b>	<b>0,04</b>	<b>0,07</b>	<b>0,997</b>	<b>0,991</b>

AG	Modelo	Pré-processamento	Região espectral (cm <sup>-1</sup> )	VL	RMSECV	RMSEP*	r <sub>cv</sub>	r <sub>p</sub>
C18:1 10t	a	1	4000-650	7	0,34	0,15	0,777	0,974
	a	1	986-818	3	0,13	0,10	0,967	0,984
	<b>a</b>	<b>1</b>	1658-1490 & 986-818	4	0,10	0,11	0,982	0,981
	b	2	4000-650	6	0,33	0,18	0,734	0,958
	b	2	986-818	6	0,11	0,07	0,977	0,993
	b	2	2330-2162 & 986-818	5	0,08	0,11	0,990	0,982
	c	3	4000-650	8	0,25	0,10	0,856	0,984
	c	3	986-818	3	0,09	0,08	0,984	0,994
	<b>c</b>	<b>3</b>	<b>1490-1322 &amp; 986-818</b>	<b>5</b>	<b>0,07</b>	<b>0,08</b>	<b>0,994</b>	<b>0,991</b>
C18:1 11t	a	1	4000-650	7	0,39	0,16	0,773	0,978
	a	1	986-818	4	0,13	0,11	0,970	0,986
	<b>a</b>	<b>1</b>	<b>1490-1322 &amp; 986-818</b>	<b>5</b>	<b>0,07</b>	<b>0,10</b>	<b>0,992</b>	<b>0,988</b>
	b	2	4000-650	7	0,34	0,15	0,761	0,973
	b	2	986-818	5	0,10	0,14	0,985	0,975
	b	2	3333-3166 & 986-818	5	0,08	0,12	0,989	0,983
	c	3	4000-650	8	0,29	0,14	0,854	0,975
	c	3	986-818	3	0,11	0,13	0,980	0,982
	c	3	1490-1322 & 986-818	5	0,07	0,11	0,990	0,986



AG	Modelo	Pré-processamento	Região espectral (cm <sup>-1</sup> )	VL	RMSECV	RMSEP*	r <sub>cv</sub>	r <sub>p</sub>
C18:1 12t	a	1	4000-650	3	0,34	0,19	0,571	0,897
	a	1	986-818	4	0,06	0,05	0,991	0,993
	<b>a</b>	<b>1</b>	<b>2665-2498 &amp; 986-818</b>	<b>6</b>	<b>0,04</b>	<b>0,04</b>	<b>0,996</b>	<b>0,998</b>
	b	2	4000-650	8	0,27	0,09	0,662	0,977
	b	2	986-818	6	0,05	0,04	0,994	0,998
	b	2	3667-3500 & 986-818	6	0,05	0,06	0,992	0,991
	c	3	4000-650	8	0,24	0,10	0,763	0,971
	c	3	986-818	5	0,03	0,04	0,997	0,997
	c	3	2832-2665 & 986-818	5	0,03	0,05	0,997	0,996
Σ AGT	a	1	4000-650	7	1,72	0,60	0,726	0,979
	a	1	986-818	4	0,30	0,22	0,992	0,997
	<b>a</b>	<b>1</b>	<b>2832-2665 &amp; 986-818</b>	<b>7</b>	<b>0,23</b>	<b>0,18</b>	<b>0,995</b>	<b>0,998</b>
	b	2	4000-650	7	1,48	0,71	0,689	0,957
	b	2	986-818	7	0,22	0,21	0,994	0,998
	b	2	3667-3500 & 986-818	6	0,19	0,30	0,997	0,992
	c	3	4000-650	8	1,27	0,44	0,794	0,982
	c	3	986-818	4	0,18	0,23	0,996	0,997
	c	3	3166-2999 & 986-818	4	0,16	0,26	0,997	0,996

Fonte: Reproduzido (adaptado) com permissão de Amorim *et al.* (2020d). Direitos autorais (2020) American Chemical Society.

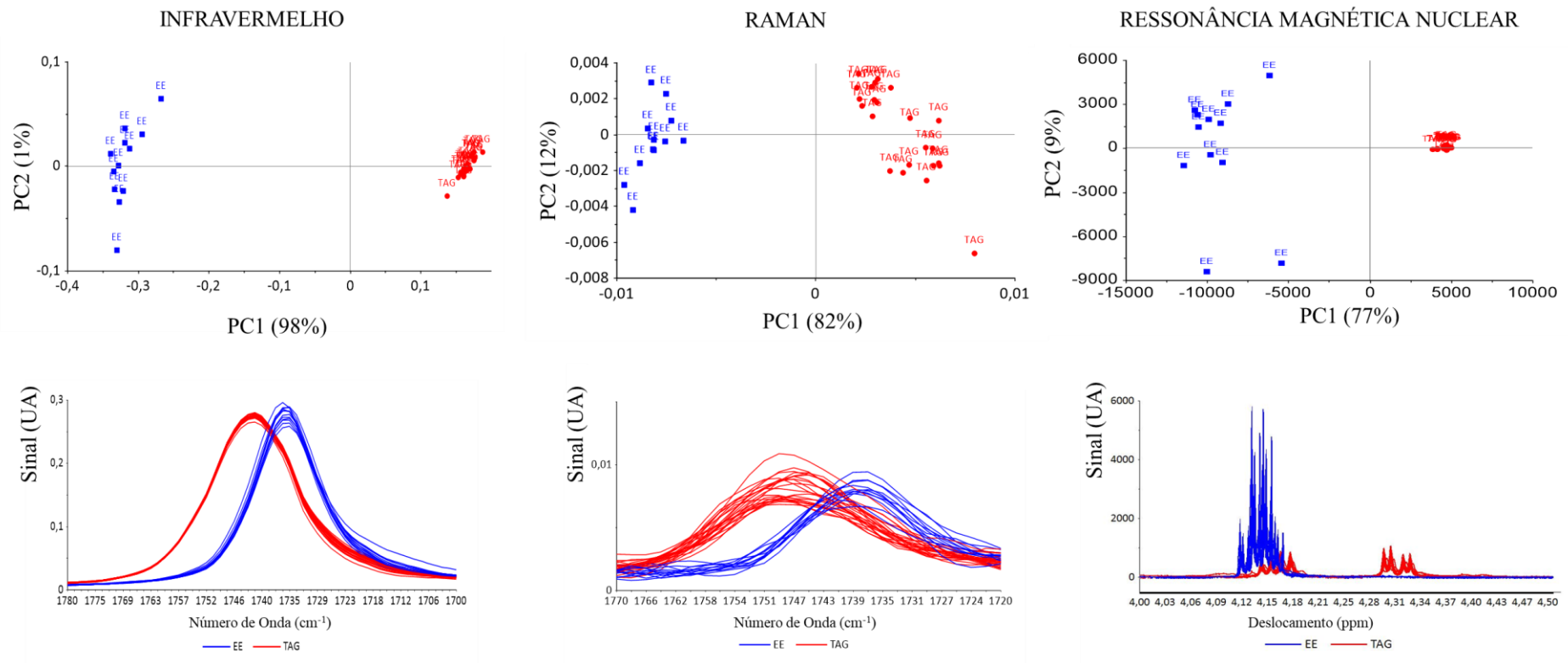
Observando-se as tabelas observa-se que ambas as técnicas forneceram resultados interessantes para predição de AGT totais e AGT isoméricos, evidenciado pelos altos coeficientes de correlação e baixos erros. Modelos parsimônicos e robustos foram obtidos. Estes métodos podem ser usados como alternativa ao monitoramento de AGT em alimentos e são as primeiras demonstrações do potencial da associação destas técnicas espectroscópicas a modelagem multivariada para análise quantitativa de matrizes alimentícias contendo AGT de origem natural e industrial em sua composição. O estudo envolvendo NMR foi publicado na revista LWT - Food Science and Technology, DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109689 (AMORIM *et al.*, 2020c), enquanto o estudo por ATR-FTIR foi publicado na revista Journal of Agricultural and Food Chemistry, e está disponível sob o DOI 10.1021/acs.jafc.0c04316 (AMORIM *et al.*, 2020d).

### **5.3.2 Metodologias para classificação de amostras de óleo de peixe contendo ácidos graxos como triacilgliceróis e etis ésteres**

As técnicas de NMR, ATR-FTIR e Raman foram estudadas para classificação de amostras de óleo de peixe ( $n = 32$ ) contendo AG como triacilgliceróis e etis ésteres a partir de associação com análise discriminante por mínimos quadrados parciais. Suplementos naturais e concentrados contendo AG como triacilgliceróis e etis ésteres foram inicialmente estudados por técnicas cromatográficas (seção 5.2.2, página 102) e então modelos classificatórios foram desenvolvidos a partir de etapa de calibração, validação e predição. 70 % das amostras foram usadas na etapa de calibração e validação cruzada, enquanto 30 % das amostras foram usadas na etapa de predição.

Para cada técnica foram selecionadas regiões importantes nos espectros para discriminação de triacilgliceróis e etis ésteres (Figura 38), afim de reduzir o número de variáveis modeladas. A diferenciação entre triacilgliceróis e etis ésteres pelas técnicas espectroscópicas vibracionais foi caracterizada por um deslocamento da banda correspondente a carboxila (ATR-FTIR:  $1700-1780\text{ cm}^{-1}$ , Raman:  $1720-1770\text{ cm}^{-1}$ ), enquanto por NMR, a diferenciação se deu por conta da multiplicidade dos diferentes sinais das moléculas na região de 4 – 4,5 ppm.

Figura 38 - Análise por componentes principais das amostras de óleo de peixe, quando analisadas por Espectroscopia de Infravermelho, Raman, e Ressonância Magnética Nuclear (acima). Regiões utilizadas para análise multivariada (abaixo)



Fonte: Elaborada pela autora (2020).

Alguns modos de pré-processamento foram avaliados para tratamento do espectro, como o algoritmo de suavização de Savitzky-Golay e variação normal padrão, usados independente ou simultaneamente, mas mesmo a utilização do espectro original nos modelos resultou satisfatória. Em termos quantitativos, o uso de ATR-FTIR forneceu melhores resultados (menores RMSEP e maior percentual de variação explicada pela análise de componentes principais), mas 100 % de amostras foram classificadas corretamente quando foi utilizado qualquer uma das técnicas estudadas, até mesmo quando nenhum pré-processado foi aplicado, como ilustra a análise por componentes principais da Figura 38.

Esta abordagem é interessante devido ao fato de os diferentes tipos de AG resultarem em diferente biodisponibilidade dos AG  $\omega$ -3 no organismo, como anteriormente mencionado. Além disso, o uso de quimiometria associada as técnicas espectroscópicas permite a avaliação da composição dos óleos marinhos por analistas sem especialização na interpretação espectroscópica. Ademais, apesar da informação sobre o tipo de AG presente nos suplementos ser facultativa em muitos países atualmente, métodos espectroscópicos associados a calibração multivariada podem ser utilizados para verificação da veracidade das informações contidas nos rótulos dos produtos, sendo mais simples, rápidos e menos onerosos que técnicas cromatográficas. Estes estudos encontram-se em fase de publicação.

## 6 CONCLUSÕES

Um método para a determinação dos AGT totais do ácido octadecenoico em alimentos por CZE-UV foi estudado inicialmente, sendo o mais rápido para esta finalidade por CE até o momento (tempo de corrida < 4 min). Além disso, o método tem aplicação na avaliação de AG insaturados majoritários em lácteos (oleico, linoleico e  $\alpha$ -linolênico). Também estudou-se a separação dos isômeros C18:1 *cis* e *trans* majoritários em alimentos (ácidos oleico, elaídico e vacênico) por CZE-UV Modificada por Ciclodextrinas. Este método apresenta potencial para avaliação da autenticidade dos alimentos e detecção de fraudes, principalmente naqueles países onde já não é permitida a adição de gordura vegetal hidrogenada aos alimentos. Ambos os métodos desenvolvidos por CE para determinação de AGT em alimentos não requerem colunas específicas, e pouca amostra, reagentes e solventes são utilizados, o que segue os princípios da química analítica verde. Além disso, um preparo de amostras simplificado e um tempo de análise curto são inerentes vantagens dos métodos.

Adicionalmente, outras metodologias foram avaliadas para determinação de AG em alimentos, não apenas considerando os AGT, foco principal deste trabalho. Alguns métodos por CZE-UV foram validados para análise de óleos vegetais e marinhos, com potencial aplicação no monitoramento de AG e para rotulagem nutricional. Metodologias empregando-se técnicas cromatográficas (TLC, GC-FID e GC-MS) para análises de chocolates e óleos de peixe também foram avaliadas, servindo como base para o desenvolvimento de métodos alternativos utilizando técnicas espectroscópicas associados a modelos multivariados, objetivando predição de AG e classificação de amostras. Estes métodos alternativos também contam com pouco ou nenhum preparo da amostra, e tem potencial para uma análise rápida de chocolates almejando a quantificação de AGT isoméricos e para uma distinção rápida de óleos de peixes naturais e concentrados contendo AG na forma de triacilgliceróis e etis ésteres.

Apesar da robustez e da alta capacidade de pico da GC, os métodos propostos nesta tese empregando técnicas eletroforéticas e espectroscópicas proporcionaram resultados altamente correlacionados com os fornecidos pelos métodos cromatográficos, com elevada precisão, exatidão e sensibilidade na determinação de AG em alimentos. Estes métodos alternativos podem ser utilizados por pesquisadores acadêmicos, indústrias e agências regulatórias, em substituição ou complementarmente aos métodos clássicos, dependendo da finalidade do uso, como opções mais rápidas, simples e ecologicamente sustentáveis, quando comparados aos métodos tradicionalmente utilizados para as análises abordadas.

## REFERÊNCIAS

- ALDAI, N. *et al.* Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 7, p. 1073–1083, 2005.
- ALTRIA, K. D.; MAHUZIER, P. E.; CLARK, B. J. Improved performance in capillary electrophoresis using internal standards. **LCGC Europe**, v. 15, p. 588–594, 2002.
- AMORIM, T. L.; PORTO, B. L. S.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Method optimization for trans fatty acid determination by CZE-UV under direct detection with a simple sample preparation. **Analytical Methods**, v. 9, n. 6, p. 958–965, 2017.
- AMORIM, T. L.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Trans fatty acid determination by capillary zone electrophoresis: the state of the art and applications. **Analytical Methods**, v. 9, n. 17, p. 2483–2494, 2017.
- AMORIM, T. L. *et al.* Screening method for simultaneous detection of elaidic and vaccenic trans fatty acid isomers by capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 1048, n. 7, p. 212–220, 2019a.
- AMORIM, T. L. *et al.* A validated capillary electrophoresis method for fatty acid determination in encapsulated vegetable oils supplements. **LWT - Food Science and Technology**, v. 114, p. 108380, 2019b.
- AMORIM, T. L. *et al.* A fast and validated capillary zone electrophoresis method for the determination of selected fatty acids applied to food and cosmetic purposes. **Analytical Methods**, v. 11, p. 5607–5612, 2019c.
- AMORIM, T. L. *et al.* Lipid composition of Brazilian chocolates and chocolate products with special emphasis on their fat origin and trans C18:1 isomeric profile. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 40, p. 11210–11218, 2019d.
- AMORIM, T. L. *et al.* Fast capillary electrophoresis method for determination of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids in marine oils omega-3 supplements. **Journal of Chromatography A**, v. 1613, p. 460641, 2020a.
- AMORIM, T. L. *et al.* Evaluation of Delivery Form of Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic Acids During Quality Control of Fish Oil Supplements. **Brazilian Journal of Analytical Chemistry**, v. 7, p. 20-30, 2020b.
- AMORIM, T. L. *et al.* Screening method for determination of C18:1 trans fatty acids positional isomers in chocolate by <sup>1</sup>H NMR and chemometrics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 131, p. 109689, 2020c.

AMORIM, T. L. *et al.* Prediction of fatty acids in chocolates with emphasis on C18:1 trans fatty acids positional isomers using ATR-FTIR associated with multivariate calibration. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, p. 10893-10901, 2020d.

AMORIM, T. L. *et al.* Capillary electromigration methods for fatty acids determination in vegetable and marine oils: A review. **Electrophoresis**, 2020e.

AMORIM, T. L.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Advances in Lipid Capillary Electromigration Methods to Food Analysis Within the 2010s Decade. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 1503–1522, 2020a.

AMORIM, T. L.; DE OLIVEIRA, M. A. L. A capillary electrophoresis approach for major unsaturated fatty acids screening in milk. **International Dairy Journal**, v. 112, p. 104861, 2020b.

ANGELIERI, C. T. *et al.* Trans fatty acid intake is associated with insulin sensitivity but independently of inflammation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 7, p. 625–631, 2012.

AOAC. AOAC Official Method 996.06: Fat (Total, Saturated, and Unsaturated) in Foods, 2001.

AOCS. AOCS Official Method Ce 1j-07: cis-, trans-, Saturated, Monounsaturated, and Polyunsaturated Fatty Acids in Extracted Fats by Capillary GLC, 2017.

AWAD, A. B. *et al.* 18:1 n7 fatty acids inhibit growth and decrease inositol phosphate release in HT 29 cells compared to n9 fatty acids. **Cancer Letters**, v. 91, n. 1, p. 55–61, 1995.

AZAB, S. M.; RITCHIE, L.; BRITZ-MCKIBBIN, P. Robust method for high-throughput screening of fatty acids by multisegment injection-nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry with stringent quality control. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 2329–2336, 2019.

AZAB, S. M. *et al.* Serum nonesterified fatty acids have utility as dietary biomarkers of fat intake from fish, fish oil, and dairy in women. **Journal of Lipid Research**, v. 61, n. 6, p. 933–944, 2020.

BALESTEROS, M. R. *et al.* Determination of olive oil acidity by CE. **Electrophoresis**, v. 28, n. 20, p. 3731–3736, 2007.

BAKKER, N.; VAN'T VEER, P.; ZOCC, P. L. Adipose fatty acids and cancers of the breast, prostate and colon: An ecological study. **International Journal of Cancer**, v. 72, n. 4, p. 587–591, 1997.

BARNES, R. J.; DHANOA, M. S.; LISTER, S. J. Standard normal variate transformation and

de-trending of near-infrared diffuse reflectance spectra. **Applied Spectroscopy**, v. 43, n. 5, p. 772–777, 1989.

BLEWETT, H. J. *et al.* Vaccenic acid favourably alters immune function in obese JCR:LA-cp rats. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 4, p. 526–536, 2009.0007-1145.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 21, 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.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 359, de 23 de Dezembro de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 2003a.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 360. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins De Rotulagem Nutricional. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 2003b.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 54. Dispõe sobre o Regulamento Técnico sobre Informação Nutricional Complementar. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 2012.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 2017.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 332. Define os requisitos para uso de gorduras trans industriais em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF. 2019.

BREADMORE, M. C. *et al.* Separation of Nile Blue-labelled fatty acids by CE with absorbance detection using a red light-emitting diode. **Electrophoresis**, v. 28, n. 8, p. 1252–1258, 2007.

BOQUÉ, R.; HEYDEN, Y.V, The limit of detection. **LCGC Europe**, v. 22, n. 2, p. 82-85, 2009.

BUGLIONE, L.; SEE, H. H.; HAUSER, P. C. Rapid separation of fatty acids using a poly(vinyl alcohol) coated capillary in nonaqueous capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 34, n. 14, p. 2072–2077, 2013.

CASTRO BARRA, P. M. *et al.* Total Trans Fatty Acid Analysis in Spreadable Cheese by Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 1403–1409, 2010.



CASTRO BARRA, P. M. *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, n. 2, p. 456–461, 2012.

CASTRO BARRA, P. M. *et al.* An alternative method for rapid quantitative analysis of majority cis-trans fatty acids by CZE. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 33–41, 2013.

CASTRO BARRA, P. M. *et al.* Study of fatty acids profile in biological sample by capillary zone electrophoresis associate to chemometric approach. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 4, p. 675–685, 2014.

CHAVARRO, J. E. *et al.* A Prospective Study of Trans-Fatty Acid Levels in Blood and Risk of Prostate Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 17, n. 1, p. 95–101, 2008.

CHENG, H. *et al.* High temperature storage of infant formula milk powder for prediction of storage stability at ambient conditions. **International Dairy Journal**, v. 73, p. 166–174, 2017.

CHO, E. *et al.* Premenopausal Fat Intake and Risk of Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 14, p. 1079–1085, 2003.

CHRISTIE, W.W. **Preparation of Ester Derivatives of Fatty Acids for Chromatographic Analysis**. Oily Press, 1993.

CHUDY, S.; PIKUL, J.; RUDZIŃSKA, M. Effects of storage on lipid oxidation in milk and egg mixed powder. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 54, n. 1, p. 31–40, 2015.

COSTA, A. G. V. *et al.* Ácidos Graxos Trans: Alimentos e Efeitos na Saúde. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 56, n. 1, p. 12–21, 2006.

CRUZ-HERNANDEZ, C. *et al.* Methods for analysis of conjugated linoleic acids and trans-18:1 isomers in dairy fats by using a combination of gas chromatography, silver-ion thin-layer chromatography/gas chromatography, and silver-ion liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 87, n. 2, p. 545–62, 2004.

CUNHA, C. R.; DIAS, A. I.; VIOTTO, W. H. Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of a spreadable processed cheese analogue made with vegetable fat. **Food Research International**, v. 43, n. 3, p. 723–729, 2010.

DA SILVA, J. A. F. *et al.* Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740–744, 2007.

DE LA FUENTE, M. A.; JUÁREZ, M. Fatty Acids. *In*: NOLLET, L. M. L.; TOLDRA, F.

**Handbook of dairy foods analysis.** CRC Press, 2009.

DE LA FUENTE, M. A.; RODRÍGUEZ-PINO, V.; JUÁREZ, M. Use of an extremely polar 100-m column in combination with a cyanoalkyl polysiloxane column to complement the study of milk fats with different fatty acid profiles. **International Dairy Journal**, v. 47, p. 52–63, 2015.

DE OLIVEIRA, M. A. L. *et al.* Method development for the analysis of trans-fatty acids in hydrogenated oils by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, n. 10, p. 1641–1647, 2003.

DE OLIVEIRA, M. A. L. *et al.* Analysis of amino acids, proteins, carbohydrates and lipids in food by capillary electromigration methods: A review. **Analytical Methods**, v. 8, n. 18, p. 3649–3680, 2016.

DERMAUX, A. *et al.* Analysis of the triglycerides and the free and derivatized fatty acids in fish oil by capillary electrochromatography. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 21, n. 10, p. 545–548, 1998.

DOWNS, S. M.; THOW, M.; LEEDER, S. R. The effectiveness of policies for reducing dietary trans fat: a systematic review of the evidence. **Bulletin of World Health Organization**, v. 91, p. 262–269, 2013.

DRISCOLL, N.R.; BRENNAND, C.P.; HENDRICKS, D.G. Sensory Quality of Nonfat Dry Milk after Long-Term Storage. **Journal of Dairy Science**, v. 68, n. 8, p. 1931–1935, 1985.

EFTEKHARI, M. H. *et al.* The effect of conjugated linoleic acids and omega-3 fatty acids supplementation on lipid profile in atherosclerosis. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, 2014.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EU) of 24 April 2019 amending Annex III to Regulation (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the Council as regards trans fat, other than trans fat naturally occurring in fat of animal origin, 2019.

FAHY, E. *et al.* A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 839–862, 2005.

FIELD, C. J. *et al.* Human health benefits of vaccenic acid. **Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism**, v. 34, n. 5, p. 979–991, 2009.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. FDA-2013-N-1317 of 17 June 2015. Final Determination Regarding Partially Hydrogenated Oils, 2015.

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

- 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, n. 4, p. 332–354, 2011.
- GÓMEZ-CORTÉS, P.; JUÁREZ, M.; DE LA FUENTE, M. A. Milk fatty acids and potential health benefits: An updated vision. **Trends in Food Science and Technology**, v. 81, p. 1–9, 2018.
- GRAZIOLA, F.; SOLIS, V. S.; CURI, R. Estrutura química e classificação dos ácidos graxos. *In:* CURI, R. *et al.* **Entendendo a Gordura**. Manole Ltda, 2002.
- GRIINARI, J. M. *et al.* Conjugated Linoleic Acid Is Synthesized Endogenously in Lactating Dairy Cows by  $\Delta 9$  Desaturase. **The Journal of Nutrition**. v. 130, n. 9, p. 2285–2291, 2000.
- GROSCHE, O. Carbohydrates - Electrophoresis. *In:* POOLE, C.; COOKE, M. **Encyclopedia of Separation Science**. Elsevier, 2000.
- HAMILTON, R. J. Fatty acids: structure, occurrence, nomenclature, biosynthesis and properties. *In:* DIJKSTRAA, A. J.; HAMILTON, R. J.; HAMM, W. **Trans fatty acids**. Blackwell Publishing, 2010.
- HAN, S. N. *et al.* Effect of hydrogenated and saturated, relative to polyunsaturated, fat on immune and inflammatory responses of adults with moderate hypercholesterolemia. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 3, p. 445–452, 2002.
- HARA, A.; RADIN, N. S. Lipid extraction of tissues with a low toxicity solvent. **Analytical Biochemistry**, v. 90, n. 1, p. 420–426, 1978.
- HARVEY, D. Chromatographic and Electrophoretic Methods. *In:* HARVEY, D. **Modern Analytical Chemistry**. McGraw Hill, 2000.
- HEALTH CANADA. NOM/ADM-C-2017-3 of 15 September 2017. Notice of Modification: Prohibiting the Use of Partially Hydrogenated Oils (PHOs) in Foods. Ottawa, 2017.
- HODGE, A. M. *et al.* Foods, nutrients and prostate cancer. **Cancer Causes and Control**, v. 15, n. 1, p. 11–20, 2004.
- HODGSON, J. M. *et al.* Platelet trans fatty acids in relation to angiographically assessed coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 120, n. 1–2, p. 147–154, 1996.
- HOLMES, M. D. *et al.* Association of dietary intake of fat and fatty acids with risk of breast cancer. **The Journal of the American Medical Association**, v. 281, n. 10, p. 914–920, 1999.
- ISO. 15884:2002 (IDF 182:2002) Milk fat - Preparation of fatty acid methyl esters, 2002a.
- ISO. 15885:2002 (IDF 184:2002) Milk fat - Determination of the fatty acid composition by gas-liquid chromatography, 2002b.
- JACOME-SOSA, M M. *et al.* Increased hypolipidemic benefits of cis -9 , trans -11 conjugated linoleic acid in combination with trans -11 vaccenic acid in a rodent model of the

metabolic syndrome , the JCR : LA -cp rat. **Nutrition & Metabolism**, v. 7, n. 60, 2010.

JACOME-SOSA, M. M. *et al.* Diets enriched in trans-11 vaccenic acid alleviate ectopic lipid accumulation in a rat model of NAFLD and metabolic syndrome. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 7, p. 692–70 , 2014.

KING, I. B. *et al.* Serum trans-fatty acids are associated with risk of prostate cancer in beta-Carotene and Retinol Efficacy Trial. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 14, n. 4, p. 988–92, 2005.

KOHLMEIER, L. *et al.* Adipose tissue trans fatty acids and breast cancer in the European Community Multicenter Study on Antioxidants, Myocardial Infarction, and Breast Cancer. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 6, n. 9, p. 705–710, 1997.

KRAMER, J. K. G. *et al.* Combining Results of Two GC Separations Partly Achieves Except CLA Isomers of Milk Fat as Demonstrated Using Ag-Ion SPE Fractionation. **Lipids**, v. 43, p. 259–273, 2008.

KROMHOUT, D. *et al.* Dietary saturated and trans fatty acids and cholesterol and 25 year mortality from coronary heart disease the Seven Countries Study. **Preventive medicine**, v. 24, p. 308–315, 1995.

LA NASA, J. *et al.* Development of a GC/MS method for the qualitative and quantitative analysis of mixtures of free fatty acids and metal soaps in paint samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1001, p. 51–58, 2018.

LEE, J. H. *et al.* Saturated fatty acid determination method using paired ion electrospray ionization mass spectrometry coupled with capillary electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 984, p. 223–231, 2017.

LIN, J. Dietary Fat and Fatty Acids and Risk of Colorectal Cancer in Women. **American Journal of Epidemiology**, v. 160, n. 10, p. 1011–1022, 2004.

LOPES, L. L.; PELUZIO, M. C. G.; HERMSDORFF, H. H. M. Monounsaturated fatty acid intake and lipid metabolism. **Journal Vascular Brasileiro**, v. 15, n. 1, 2016.

LOPEZ-GARCIA, E. *et al.* Consumption of Trans Fatty Acids Is Related to Plasma Biomarkers of Inflammation and Endothelial Dysfunction. *The Journal of Nutrition*. v. 135, n. 3, p. 562–566, 2005.

LOVEJOY, J. C. *et al.* Effects of Diets Enriched in Saturated (Palmitic), Monounsaturated (Oleic), or trans (Elaidic) Fatty Acids on Insulin Sensitivity and Substrate Oxidation in Healthy Adults. **Diabetes Care**, v. 25, n. 8, p. 1283–1288, 2002.

MAHDY, G.; YANG, A. Changes in Fatty Acid Composition of Reconstituted Whole Milk Powder by Superheated Steam Ghazwan Mahdy and Tajul. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 9, n. 2, p. 220–259, 2014.

MARTIN, C. A. *et al.* Trans fatty acid-forming processes in foods: A review. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 2, p. 343–350, 2007.

MCKELVEY, W. *et al.* A Case-Control Study of Colorectal Adenomatous Polyps and Consumption of Foods Containing Partially Hydrogenated Oils. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 8, p. 519–524, 1999.

MEYER, K. A. *et al.* Dietary fat and incidence of type 2 diabetes in older Iowa women. **Diabetes Care**, v. 24, n. 9, p. 1528–35, 2001.

MILLER, A. *et al.* Vaccenic acid (t11-18:1) is converted to c9,t11-CLA in MCF-7 and SW480 cancer cells. **Lipids**, v. 38, n. 6, p. 623–632, 2003.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Manual de Métodos Oficiais para Análise de Alimentos de Origem Animal. Brasília, 2019.

MINISTRY OF FOOD, AGRICULTURE AND FISHERIES OF DENMARK. **Danish Data on trans fatty acids in food**. Glostrup, 2014.

MOHAMMADZADEH, M. *et al.* Effect of conjugated linoleic acid supplementation on inflammatory factors and matrix metalloproteinase enzymes in rectal cancer patients undergoing chemoradiotherapy. **Integrative Cancer Therapies**, v. 12, n. 6, p. 496–502, 2013.

MOSSOBA, M. M.; KRAMER, J. K. G. **Official Methods for the Determination of Trans Fat**. AOCS Publishing, 2010.

MOZAFFARIAN, D.; ARO, A.; WILLETT, W. C. Health effects of trans-fatty acids: Experimental and observational evidence. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, n. S2, p. 5–21, 2009.

MOZAFFARIAN, D. *et al.* Trans fatty acids and cardiovascular disease. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 15, p. 1601–1613, 2006.

NKONDJOCK, A. *et al.* Assessment of risk associated with specific fatty acids and colorectal cancer among French-Canadians in Montreal: A case-control study. **International Journal of Epidemiology**, v. 32, n. 2, p. 200–209, 2003.

ODEGAARD, A. O.; PEREIRA, M. A. Trans fatty acids, insulin resistance, and type 2 diabetes. **Nutrition reviews**, v. 64, n. 8, p. 364–372, 2006.

OH, K. *et al.* Dietary fat intake and risk of coronary heart disease in women: 20 Years of follow-up of the nurses' health study. **American Journal of Epidemiology**, v. 161, n. 7, p. 672–679, 2005.

OPEKAR, F.; COUFAL, P.; ŠTULÍK, K. Rapid Capillary Zone Electrophoresis Along Short Separation Pathways and Its Use in Some Hyphenated Systems: A Critical Review. **Chemical**

**Reviews**, v. 109, n. 9, p. 4487–4499, 2009.

PADOVESE, R.; FILHO, J. M. Ácidos Graxos Trans. *In: CURI, R. et al. Entendendo a Gordura*. Manole Ltda, 2002.

PARIZA, M. W.; PARK, Y.; COOK, M. E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 4, p. 283–298, 2001.

POMPÉIA, C. Essencialidade dos ácidos graxos. *In: CURI, R. et al. Entendendo a Gordura*. Manole Ltda, 2002.

PORTO, B. L. S. *et al.* Fast screening method for the analysis of trans fatty acids in processed food by CZE-UV with direct detection. **Food Control**, v. 55, p. 230–235, 2015.

PORTO, B. L. S.; SOUZA, M. V. N.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Analysis of omega 3 fatty acid in natural and enriched chicken eggs by capillary zone electrophoresis. **Analytical Sciences**, v. 27, n. 5, 2011.

PRECHT, D; MOLKENTIN, J. Rapid analysis of the isomers of trans-octadecenoic acid in milk fat. **International Dairy Journal**, v. 6, n. 8–9, p. 791–809, 1996.

RISÉRUS, U. Trans fatty acids and insulin resistance. **Atherosclerosis Supplements**, v. 7, n. 2, p. 37–39, 2006.

ROMEU-NADAL, M. *et al.* Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder formulas. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 756–763, 2007.

SALMERÓN, J. *et al.* Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 6, p. 1019–1026, 2001.

SATO, R. T. *et al.* Rapid separation of free fatty acids in vegetable oils by capillary zone electrophoresis. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 3, p. 241–246, 2014.

SAVITZKY, A.; GOLAY, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. **Analytical Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1627–1639, 1964.

SAVORANI, F., TOMASI, G., ENGELSEN, S. B. icoshift: A versatile tool for the rapid alignment of 1D NMR spectra. **Journal of Magnetic Resonance**, v. 202, n. 2, p. 190–202, 2010.

SCRIMGEOUR, C. Chemistry of fatty acid. *In: SHAHIDI, F. Bailey's industrial oil and fat products*. Wiley, 2005.

SEMINÁRIO AGILENT, 2019. Fatty acids and FAME analysis using state of the art gas chromatography. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/public/agilent-webinar-june202019-FAME-analysis-gas-chromatography.pdf>. Acesso em 19 out 2020.

SKOOG, D. A. *et al.* Cromatografia Gasosa. *In: SKOOG, D. A. et al. Fundamentos de*

**Química Analítica.** Thomsom, 2005.

SOLIMAN, L. C. *et al.* Separation of dietary omega-3 and omega-6 fatty acids in food by capillary electrophoresis. **Journal of Separation Science**, v. 36, n. 20, p. 3440–3448, 2013.

SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Conceitos básicos em eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287–297, 2012.

SRIGLEY, C. T.; ORR-TOKLE, I. C. Presence of Fatty-Acid Ethyl Esters in Krill Oil Dietary Supplements. **Lipids**, v. 53, n. 7, p. 749–754, 2018.

TARDY, A. *et al.* Effects of *trans* MUFA from dairy and industrial sources on muscle mitochondrial function and insulin sensitivity. **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 7, p. 1445–1455, 2008.

TAVARES, M. F.M. Mecanismos de Separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5 p. 493–511, 1997.

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

TEHRANY, E. A.; SONNEVELD, K. Packaging and the Shelf Life of Milk Powders. *In*: ROBERTSON, G.L. **Food Packaging and Shelf Life, A Practical Guide**. CRC Press, 2009.

TRICON, S. *et al.* Effects of dairy products naturally enriched with cis- 9 , trans- 11 conjugated linoleic acid on the blood lipid profile in healthy. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 744–753, 2006.

VAZ, F. A. S.; OLIVEIRA, C. L. M; DE OLIVEIRA, M. A. L. Fundamentos de Eletroforese Capilar: uma abordagem por animações. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 732–737, 2015.

WANG, Y. *et al.* Trans-11 Vaccenic Acid Dietary Supplementation Induces Hypolipidemic Effects in JCR:LA-cp Rats. **The Journal of Nutrition**, v. 138, n. 11, p. 2117–2122, 2008.

WANG, Y. *et al.* Trans-11 Vaccenic Acid Reduces Hepatic Lipogenesis and Chylomicron Secretion in JCR : LA-cp rats. **he Journal of Nutrition**, v. 139, p. 2049–2054, 2009.

WILKINSON, I. M. S. **A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds**. Blackwell Scientific Publications, 1993.

WILLETT, W. C. *et al.* Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. **The Lancet**, v. 341, n. 8845, p. 581–585, 1993.

WONG, Y. F.; SAAD, B.; MAKAHLEH, A. Capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection for the determination of cis/trans isomers of octadec-9-enoic acid and other long chain fatty acids. **Journal of Chromatography A**, v. 1290, p. 82–90, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; BROUWER, I. A. Effects of trans fatty acid intake on blood lipids and lipoproteins: a systematic review and meta-regression analysis. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Interim Summary of Conclusions and Dietary Recommendations on Total Fat & Fatty Acids From the Joint FAO/WHO Expert Consultation on Fats and Fatty Acids in Human Nutrition, 2008.

WU, J.; GE, Y.; QIN, W. Combination of running-buffer-mediated extraction and polyamidoamine- dendrimer-assisted capillary electrophoresis for rapid and sensitive determination of free fatty acids in edible oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 18, p. 4104–4111, 2014.



**APENDICE A – Súmula Curricular****ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS**

**AMORIM, TATIANE LIMA; DUARTE, LUCAS MATTOS; DA SILVA, ERICK MENDES, DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** Capillary electromigration methods for fatty acids determination in vegetable and marine oils: a review. *Electrophoresis*, 2020. DOI: 10.1002/(ISSN)1522-2683.

**AMORIM, TATIANE LIMA; OLIVEIRA, DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** Advances in Lipid Capillary Electromigration Methods to Food Analysis Within the 2010s Decade. *Food Analytical Methods*, vol 13, p. 1503-1522, 2020. DOI: 10.1007/s12161-020-01772-w.

**AMORIM, TATIANE LIMA; DUARTE, LUCAS MATTOS; GRANATO, ÁLISSON SILVA; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL; AMARANTE, GIOVANNI WILSON; DE LA FUENTE, MIGUEL ANGEL; GÓMEZ-CORTÉS, PILAR.** Screening method for determination of C18:1 *trans* fatty acids positional isomers in chocolate by <sup>1</sup>H NMR and chemometrics. *LWT-Food Science and Technology*, v. 131, p. 109689, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2020.109689.

**AMORIM, TATIANE LIMA; DUARTE, LUCAS MATTOS; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL; DE LA FUENTE, MIGUEL ANGEL; GÓMEZ-CORTÉS, PILAR.** Prediction of fatty acids in chocolates with emphasis on C18:1 *trans* fatty acids positional isomers using ATR-FTIR associated with multivariate calibration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 68, p. 10893-10901, 2020. DOI: 10.1021/acs.jafc.0c04316.

**AMORIM, TATIANE LIMA; DE LA FUENTE, MIGUEL ANGEL; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL; GÓMEZ-CORTÉS, PILAR.** Evaluation of delivery form of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids during quality control of fish oil supplements. *Brazilian Journal of Analytical Chemistry*, v. 7, p. 20-30, 2020. DOI: 10.30744/brjac.2179-3425.AR-19-2020.

**AMORIM, TATIANE LIMA; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** A Capillary Electrophoresis approach for major unsaturated fatty acids screening in milk. *International Dairy Journal*, v. 112, p. 104861, 2020. DOI: 10.1016/j.idairyj.2020.104861.

**DUARTE, LUCAS MATTOS; AMORIM, TATIANE LIMA; ADRIANO, LUIZ HENRIQUE CANTARINO; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** A CZE-UV Method for Saturated and Unsaturated Fatty Acids Determination in Hops. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, v. 78, p. 32-40, 2020. DOI: 10.1080/03610470.2019.1678377.

**DUARTE, LUCAS MATTOS; AMORIM, TATIANE LIMA; GRAZUL, RICHARD MICHAEL; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** Differentiation of aromatic, bittering and dual-purpose commercial hops from their terpenic profiles: an approach involving batch extraction, GC-MS and multivariate analysis. *Food Research International*, v. 138, p. 109768, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109768.

**AMORIM, TATIANE LIMA; DUARTE, LUCAS MATTOS; DOS SANTOS, HÉLIO F.; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** Screening method for simultaneous detection of elaidic and vaccenic *trans* fatty acid isomers by Capillary Zone Electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, v. 1048, p. 212-220, 2019. DOI: 10.1016/j.aca.2018.10.057.

**AMORIM, TATIANE LIMA; DUARTE, LUCAS MATTOS; CHELLINI, PAULA ROCHA; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** A validated Capillary Electrophoresis method for fatty acid determination in encapsulated vegetable oils supplements. *LWT-Food Science and Technology*, v. 114, p. 108380, 2019. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108380.

**AMORIM, TATIANE LIMA; DE LA FUENTE, MIGUEL ANGEL; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL; GOMEZ CORTES, PILAR.** Lipid composition of Brazilian chocolates and chocolate products with special emphasis on their fat origin and *trans* C18:1 isomeric profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, p. 11210-11218, 2019. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b05603.

**AMORIM, TATIANE LIMA; PENA, MARIANA GAVIOLI DOS REIS; COSTA, FABIANO FREIRE; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL; CHELLINI, PAULA ROCHA.** A fast and validated Capillary Zone Electrophoresis method for the determination of selected fatty acids applied to food and cosmetic purposes. *Analytical Methods*, v. 11, p. 5607-5612, 2019. DOI: 10.1039/C9AY01917K.

**AMORIM, TATIANE LIMA; DUARTE, LUCAS MATTOS; DE LA FUENTE, MIGUEL ANGEL; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL; GÓMEZ-CORTÉS, PILAR.** Fast Capillary Electrophoresis method for determination of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids in marine oils omega-3 supplements. *Journal of Chromatography A*, v. 1613, p. 460641, 2019. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460641.

**DUARTE, LUCAS MATTOS; AMORIM, TATIANE LIMA; ADRIANO, LUIZ HENRIQUE CANTARINO; DE OLIVEIRA, MARCONE A. L.** Baseline separation of  $\alpha$  and  $\beta$  acids homologues and isomers in hop (*Humulus lupulus* L) by CD MEKC UV. *Electrophoresis*, v. 40, p. 1779-1786, 2019. DOI: 10.1002/elps.201900101.

**DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL; CHELLINI, PAULA ROCHA; AMORIM, TATIANE LIMA.** Simultaneous determination of rifampicin, isoniazid, pyrazinamide and ethambutol in fixed dose combination antituberculosis pharmaceutical formulations: a review. *Analytical Methods*, v. 10, p. 1103-1116, 2018. DOI: 10.1039/C7AY02686B.

**DUARTE, LUCAS MATTOS; AMORIM, TATIANE LIMA; CHELLINI, PAULA ROCHA; ADRIANO, LUIZ HENRIQUE CANTARINO; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** Sub-minute determination of rifampicin and isoniazid in fixed dose combination tablets by Capillary Zone Electrophoresis with Ultraviolet Absorption Detection. *Journal of Separation Science*, v. 41, p. 4533-4543, 2018. DOI: 10.1002/jssc.201800673.

**AMORIM, TATIANE LIMA; PORTO, BRENDA LEE SIMAS; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** Method optimization for *trans* fatty acid determination by CZE-UV under direct detection with a simple sample preparation. *Analytical Methods*, v. 9, p. 958-965, 2017. DOI: 10.1039/C6AY02906J.

**AMORIM, TATIANE LIMA; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** *Trans* fatty acid determination by Capillary Zone Electrophoresis: the state of the art and applications. *Analytical Methods*, v. 9, p. 2483-1494, 2017. DOI: 10.1039/C7AY00193B.

#### ARTIGOS SUBMETIDOS

**AMORIM, TATIANE LIMA; GRANATO, ÁLISON SILVA; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL; AMARANTE, GIOVANNI WILSON; DE LA FUENTE, MIGUEL ANGEL; GÓMEZ-CORTÉS, PILAR.** Lipid classification of fish oil omega-3 supplements by <sup>1</sup>H NMR and multivariate analysis.

**AMORIM, TATIANE LIMA; DE LA FUENTE, MIGUEL ANGEL; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL; GÓMEZ-CORTÉS, PILAR.** ATR-FTIR and Raman spectroscopies associated with chemometrics for lipid form evaluation of fish oil supplements: a comparative study.

**DUARTE, LUCAS MATTOS; AMORIM, TATIANE LIMA; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** Fatty acids determination in hops (*Humulus lupulus* L.): a chromatographic approach associated with multivariate analysis.

**SATO, RENATA TAKABAYASHI; ALVES, JÚLIA BRUCE; AMORIM, TATIANE LIMA; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** A Capillary Electrophoresis method for free fatty acids screening and acidity determination in biodiesel.

**MARQUES, SCHÉROLIN O; LUCIANO, THAIS F; TRAMONTIN, NATÁLIA S; CAETANO, MATHEUS S; PIERI, BRUNO S; AMORIM, TATIANE LIMA; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL; MULLER, ALEXANDRE P.; DE SOUZA, CLAUDIO.** Avocado oil supplementation improves physiological and inflammatory parameters and oxidative stress in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice.

#### CAPÍTULOS DE LIVROS

**PENA, MARIANA GAVIOLI DOS REIS; AMORIM, TATIANE LIMA; OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL DE; TAVARES, GUILHERME DINIZ; COSTA, FABIANO FREIRE; CHELLINI, PAULA ROCHA.** Aproveitamento da semente de abóbora (*Cucurbita Moschata*) no desenvolvimento de creme hidratante esfoliante In: *Biomedicina e Farmácia: Aproximações* 2.1 ed.: Atena Editora, 2019, p. 53-67.

**OLIVEIRA, M. A. L.; VAZ, F. A. S.; DUARTE, L. M.; CHELLINI, P. R.; MARQUES, R.; SATO, R. T.; AMORIM, TATIANE LIMA.** Employment of the Chemometric Methods in Capillary Electrophoresis In: *Chemometrics: Methods, Applications and New Research*. 1 ed. Hauppauge, New York: Nova Science Publishers, 2017, v.1, p. 1-.

**DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL; CAMPOS, GUILHERME DE PAULA; DE SOUZA, JÉSSICA CORDEIRO QUEIROZ; NASCIMENTO, MARIA PATRÍCIA; LIMA, NERILSON MARQUES; MOREIRA, OLÍVIA BRITO DE OLIVEIRA; CHELLINI, PAULA ROCHA; AMORIM, TATIANE LIMA.** Recent trends in analysis of lipids, carbohydrates and proteins in food by capillary electrophoresis. *Capillary electrophoresis in food analysis*. Bentham Science, 2020.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO)

PENA, M. G. R.; **AMORIM, TATIANE LIMA**; OLIVEIRA, M. A. L.; TAVARES, Guilherme Diniz; COSTA, F. F.; CHELLINI, P. R. Aproveitamento da semente de abóbora (*Curcubita Morchata*) no desenvolvimento de creme hidratante esfoliante In: III Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas - SINCIFAR 2018, 2018, Belo Horizonte - Brasil. Anais do Simpósio Nacional em Ciências Farmacêuticas: SINCIFAR. , 2018.

CHELLINI, P. R.; NASCIMENTO, R. G.; SILVA FILHO, A. A.; MORAES, J.; BARRALES, F. M.; J Martinez; **AMORIM, TATIANE LIMA**; OLIVEIRA, M. A. L.; COSTA, F. F. Extração e caracterização de óleo essencial de sementes de abóbora (*Curcubita Moschata*) e estudos de bioatividade In: XI Congresso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos CIBIA 2017, 2017, Valparaíso - Chile. Anais do XI Congresso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. 2017.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHO E PALESTRA

**AMORIM, TATIANE LIMA**; DUARTE, LUCAS MATTOS.; CHELLINI, PAULA ROCHA; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL. “Desenvolvimento de um método rápido por Eletroforese Capilar para determinação de ácidos graxos em cápsulas de óleos de abacate, cártamo, primula e linhaça”, 2019. Evento: VI Congresso de Ciências Farmacêuticas de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

**AMORIM, TATIANE LIMA**; DUARTE, LUCAS MATTOS; DOS SANTOS, HÉLIO F.; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL. Simultaneous detection of elaidic and vaccenic trans fatty acids isomers by CZE-UV, 2019. Evento: 35<sup>th</sup> International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis; Corvallis, Oregon, EUA.

**AMORIM, TATIANE LIMA**; DUARTE, LUCAS MATTOS.; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL. A fast alternative method for simultaneous DHA and EPA determination in fish oil by Capillary Zone Electrophoresis with Direct Ultraviolet Detection, 2018. Evento: XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

PENA, M. G. R.; **AMORIM, TATIANE LIMA**; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL; TAVARES, G. D.; COSTA, F. F.; CHELLINI, P. R. Aproveitamento da semente de abóbora (*Cucurbita moschata*) no desenvolvimento de creme hidratante esfoliante, 2018. Evento: III Simpósio em Ciências Farmacêuticas – SINCIFAR; Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

**AMORIM, TATIANE LIMA**; PORTO, BRENDA LEE SIMAS; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL. Method optimization for trans fatty acid determination by CZE-UV under direct detection with a simple sample preparation, 2018. Evento: 34<sup>th</sup> International Symposium on Microscale Separations and Bioanalysis, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

**AMORIM, TATIANE LIMA**; DUARTE, L. M.; DOS SANTOS, HÉLIO F.; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL. Screening method for simultaneous detection of elaidic and vaccenic trans fatty acid isomers by capillary zone electrophoresis, 2018. Evento: III Jornadas Científicas CIAL Forum; Madrid, Comunidad de Madrid, Espanha.

**AMORIM, TATIANE LIMA; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** Separation investigation of elaidic and vaccenic *trans* fatty acids isomers by CZE-UV, 2018. Evento: 41<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.

**DUARTE, LUCAS MATTOS; AMORIM, TATIANE LIMA; ADRIANO, LUIZ HENRIQUE CANTARINO; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** Total separation of  $\alpha$  and  $\beta$ -acids homologues in Hop (*Humulus Lupulus L.*) by CD-MEKC-UV, 2018. Evento: XXXII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

**CHELLINI, PAULA ROCHA; NASCIMENTO, R. G.; SILVA FILHO, A. A.; MORAES, J.; BARRALES, F. M.; J MARTINEZ; AMORIM, TATIANE LIMA; DE OLIVEIRA, MARCONE AUGUSTO LEAL.** Extração e caracterização de óleo essencial de sementes de abóbora (*cucurbita moschata*) e estudos de bioatividade, 2017. Evento: XI Congresso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos; Valparaiso, Chile.

**AMORIM, TATIANE LIMA; PORTO, BRENDA LEE SIMAS; DE OLIVEIRA, MARCONE, AUGUSTO LEAL.** Method optimization for *trans* fatty acid determination by CZE-UV under direct detection with a simple sample preparation, 2017. Referências adicionais: Evento: US-Brasil Workshop on Biosensors and 5<sup>th</sup> Bioanalytical School, Santo André, São Paulo, Brasil.

**AMORIM, TATIANE LIMA; PORTO, BRENDA LEE SIMAS; DE OLIVEIRA, MARCONE, AUGUSTO LEAL.** Method optimization for *trans* fatty acid determination by CZE-UV under direct detection with a simple sample preparation, 2017. Evento: 46<sup>th</sup> World Chemistry Congress, 40<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49<sup>th</sup> General Assembly. São Paulo, São Paulo, Brasil.

#### PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

Apresentação de Poster na 41<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2018, Foz do Iguaçu/Brasil. Separation investigation of elaidic and vaccenic *trans* fatty acids isomers by CZE-UV.

Apresentação de Poster na III Jornadas Científicas CIAL Forum, 2018, Madrid/Espanha. Screening Method for Simultaneous Detection of elaidic and vaccenic *trans* fatty acid isomers by capillary zone electrophoresis.

Apresentação de Poster no 46<sup>th</sup> World Chemistry Congress, 40<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química and IUPAC 49<sup>th</sup> General Assembly, 2017, São Paulo/Brasil. Method optimization for *trans* fatty acid determination by CZE-UV under direct detection with a simple sample preparation.

Participação no I Workshop do Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Juiz de Fora, 2020. Juiz de Fora/Brasil.