



**MATHEUS JULIEN FERREIRA BAZZANA**

**DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR  
DETERMINING LINOLEIC AND STEARIC ACID IN SHEEP  
SERUM SAMPLES**

**LAVRAS – MG  
2020**

**MATHEUS JULIEN FERREIRA BAZZANA**

**DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINING  
LINOLEIC AND STEARIC ACID IN SHEEP SERUM SAMPLES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adelir Aparecida Saczk

Orientadora

Prof. Dr. Cleber Nogueira Borges

Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2020**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Bazana, Matheus Julien Ferreira.

Development of an analytical method for determining linoleic  
and stearic acid in sheep serum samples / Matheus Julien Ferreira

Bazana. - 2020.

84 p. : il.

Orientador(a): Adelir Aparecida Saczk.

Coorientador(a): Cleber Nogueira Borges.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Ácidos Graxos. 2. LD-DLLME. 3. Quimiometria. I. Saczk,  
Adelir Aparecida. II. Borges, Cleber Nogueira. III. Título.

**MATHEUS JULIEN FERREIRA BAZZANA**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO  
DE ÁCIDO LINOLEICO E ESTEÁRICO EM AMOSTRAS DE SORO DE OVINOS**

**DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR DETERMINING  
LINOLEIC AND STEARIC ACID IN SHEEP SERUM SAMPLES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/Bioquímica, para a obtenção do título de Mestre

APROVADA em 19 de fevereiro de 2020

Dr. Keyller Bastos Borges

UFSJ

Dr<sup>a</sup>. Lidiany Mendonça Zacaroni Lima

UFLA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adelir Aparecida Saczk

Orientadora

Prof. Dr. Cleber Nogueira Borges

Coorientador

**LAVRAS – MG**

**2020**

*Aos meus pais, Marli e Luis pelo amor incondicional e por se doarem inteiros e renunciarem a seus sonhos, para que, muitas vezes, pudessem realizar os meus.*

*À minha irmã, Janaína, por sempre me apoiar.*

*A todas as pessoas que influenciaram, direta e indiretamente, para que eu pudesse concluir mais essa etapa*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela dádiva da vida, por tudo que tenho e sou e por mais uma etapa concluída.

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Química (DQI), pela oportunidade de realizar esse mestrado.

A Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao CNPq, FAPEMIG e CAPES - Código de Financiamento 001 pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

Aos Laboratórios de Analítica e Eletroanalítica (LAE-UFLA), de Gestão de Resíduos Químicos (LGRQ-UFLA) e ao Laboratório de Reprodução Animal (DZO-UFLA), por me fornecerem os subsídios necessários para o desenvolvimento do projeto.

À minha orientadora Adelir Aparecida Saczk, por ser minha referência como profissional e orientadora durante toda a graduação e pós-graduação. Por todo o ensinamento compartilhado. Pela confiança e pelos conselhos nas tomadas de decisão. Pelos anos de convivência, cumplicidade e amizade estabelecida.

Ao meu coorientador Cleber Nogueira Borges, pela disposição em me atender durante todo o desenvolvimento do projeto. Por todo o ensinamento em quimiometria, que foi desafiador e contribuiu significativamente para a minha formação.

Aos professores do Departamento de Química da UFLA, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos meus pais, Luiz e Marli, pelo amor incondicional e serem meus exemplos de vida. Por não medirem esforços e sempre estarem presentes em todos os momentos da minha vida. Por serem meu consolo e encorajamento.

A minha irmã Janaína, pelo amor e carinho. Por me ajudar em diversos momentos e me incentivar a estudar e ter um futuro melhor. Pelas conversas e risadas ao longo do meu crescimento.

Aos meus sobrinhos Lívia, Gustavo e Jade, pelos abraços e beijos cheios de carinho na volta pra casa, após um longo período. Por me tornar uma pessoa mais humana e especial. Por serem o motivo de eu nunca desistir diante das dificuldades.

Aos amigos do Laboratório de Analítica e Eletroanalítica, Gabriela, Juliana, Vitor, Carolina, Giovana, Luís, Maysa, Priscila e Tainá pelas conversas, momentos de descontração e pela ajuda em diversas questões.

A minha amiga e companheira de todas as horas Aline Guimarães (Foca), que foi o meu alicerce durante o mestrado. Por me acompanhar durante toda a jornada acadêmica e ajudar com diversas questões. Pelas conversas nos tempos vagos, pelos passeios e por estar presente nos momentos de tristeza e de alegria.

Aos meus amigos que estiveram comigo durante o mestrado, Mayra, Larissa, Natália, Crislaine, Richard, pelas conversas, risadas e apoio nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Marcelo, que nunca mediu esforços para estar ao meu lado. Que me apoiou e ajudou em diversos momentos durante o meu mestrado.

A todos que de uma alguma forma contribuíram para a conclusão de mais uma etapa em minha vida, os meus sinceros agradecimentos.

**MUITO OBRIGADO!**

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.” (Charlie Chaplin)*

## RESUMO GERAL

O preparo de amostra é uma etapa importante na extração dos analitos de matrizes complexas como as amostras biológicas. Os lipídios presentes nessas amostras podem ser encontrados associados a lipoproteínas, o que dificulta a determinação do perfil dos ácidos graxos nos organismos vivos. As técnicas tradicionais de análise como o método de Folch et al. (1957), apesar de ainda serem muito utilizadas, apresentam diversas desvantagens como a grande quantidade de solventes orgânicos utilizados, grande número de etapas, degradação dos compostos com insaturações e elevada toxicidade. Nesse sentido, as técnicas miniaturizadas são alternativas capazes de superar as inviabilidades dos métodos tradicionais. Dentre elas, tem-se a microextração líquido-líquido dispersiva de baixa densidade (LD-DLLME), que utiliza solvente de baixa densidade, menos tóxicos ao meio ambiente e em pequenas quantidades. Assim, o objetivo do trabalho foi desenvolver, validar e aplicar uma metodologia analítica para extração e determinação de ácido linoléico (AL) e esteárico (AE) em amostras de soro sanguíneo de ovinos. O método desenvolvido utilizou a LD-DLLME com etapa de esterificação e quantificação por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC/FID). A extração foi otimizada através do planejamento de misturas com o modelo polinomial de Scheffé. A inversa generalizada de Moore-Penrose foi aplicada ao modelo cúbico completo (MCC) de Scheffé, para determinar os três coeficientes  $d_{ij}$  concomitantemente possibilitando a interpretação química do modelo. A otimização avaliou as variáveis da LD-DLLME volume do meio de dispersão (solução salina de  $MgCl_2$  0,017%), volume do solvente extrator (tolueno) e volume do solvente de dispersor (metanol) e os resultados indicaram que a melhor condição de extração foi de 1400  $\mu L$  do meio de dispersão, 400  $\mu L$  de solvente extrator e 1200  $\mu L$  de solvente dispersor. O método proposto foi validado para extração do ácido linoleico (AL) e para o ácido esteárico (AE) com bases nas diretrizes do guia EURACHEM/2014. A avaliação do efeito de matriz (EM) para o método desenvolvido foi classificado como alto e assim, todas as avaliações quantitativas foram realizadas pelo método de adição de padrão. O desempenho do método demonstrou seletividade, sensibilidade e precisão adequadas para ser aplicado em amostras reais, apresentando uma recuperação média de 98,54% e 103,83% para o AL e para o AE respectivamente. A LD-DLLME mostrou-se superior ao método de Folch et al. (1957), até então utilizado na determinação de ácidos graxos em amostras de soro sanguíneo de ovinos. Através da análise em amostras reais pode-se inferir que o método desenvolvido é eficiente no monitoramento dessas substâncias no organismo de ruminantes.

**Palavras-chave:** Ácidos Graxos. LD-DLLME. Quimiometria. GC-FID. Método de Folch

## GERAL ABSTRACT

Sample preparation is an important step in the extraction of analytes from complex matrices such as biological samples. The lipids present in these samples can be found associated with lipoproteins, which makes it difficult to determine the profile of fatty acids in living organisms. Traditional analysis techniques such as the method of Folch et al. (1957), although they are still widely used, have several disadvantages such as the large amount of organic solvents used, large number of stages, degradation of compounds with unsaturation and high toxicity. In this sense, miniaturized techniques are alternatives capable of overcoming the impossibilities of traditional methods. Among them, there is the low density dispersive liquid-liquid microextraction (LD-DLLME), which uses low density solvent, less toxic to the environment and in small quantities. Thus, the objective of the work was to develop, validate and apply an analytical methodology for the extraction and determination of linoleic acid (AL) and stearic acid (AE) in sheep blood serum samples. The developed method used LD-DLLME with an esterification and quantification step by gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID). The extraction was optimized through the planning of mixtures with the Scheffé polynomial model. The generalized inverse of Moore-Penrose was applied to Scheffé's complete cubic model (MCC), to determine the three  $d_{ij}$  coefficients concomitantly enabling the chemical interpretation of the model. The optimization evaluated the variables of the LD-DLLME dispersion medium volume (0.017%  $MgCl_2$  saline), extractor solvent volume (toluene) and dispersant solvent volume (methanol) and the results indicated that the best extraction condition was 1400  $\mu L$  of the dispersion medium, 400  $\mu L$  of extractor solvent and 1200  $\mu L$  of dispersant solvent. The proposed method was validated for extraction of linoleic acid (AL) and for stearic acid (AE) based on the guidelines of the EURACHEM/2014 guide. The evaluation of the matrix effect (EM) for the developed method was classified as high and thus, all quantitative evaluations were performed using the standard addition method. The performance of the method demonstrated selectivity, sensitivity and precision adequate to be applied to real samples, showing an average recovery of 98.54% and 103.83% for the LA and LA respectively. LD-DLLME proved to be superior to the method of Folch et al. (1957), hitherto used in the determination of fatty acids in sheep blood serum samples. Through the analysis in real samples it can be inferred that the developed method is efficient in the monitoring of these substances in the body of ruminants.

**Keywords:** Fatty acids. LD-DLLME. Chemometrics. GC-FID. Folch Method.

## LISTA DE FIGURAS

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1 – Exemplos de conformação dos ácidos carboxílicos.....	18
Figura 2 – Sistema da biohidrogenação do ácido linoleico.....	20
Figura 3 – Estrutura química do ácido linoleico.....	20
Figura 4 - Estrutura química do ácido esteárico. ....	21
Figura 5 – Sistema de extração da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).....	26
Figura 6 - Representação do modelo ternário para o MCC com dez pontos experimentais. ...	36

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO 1

Figure 1 Chemical mixture composition and pseudomixture representations in ternary diagrams $z_1$ = Magnesium chloride aqueous saline solution 0.017% (m/v); $z_2$ = Toluene; $z_3$ = Methanol; $x_1$ , $x_2$ and $x_3$ = pseudomixtures which codify $z_1$ , $z_2$ and $z_3$ .....	55
Figure 2 Graphic representation of models. M1: model with terms $d_{12}$ and $d_{13}$ ; M2: models with terms $d_{12}$ and $d_{23}$ M3: model with terms $d_{13}$ and $d_{23}$ SS: Scheffé Supersaturated model; $\mu$ : arithmetic mean of the three models ( $M1 + M2 + M3/3$ ).....	57

#### ARTIGO 2

Figura 1 Superfície de resposta para o modelos SS de Scheffé. (a) pool de amostra de soro sanguíneo de ruminantes sem a suplementação de lipídios; (b) pool de amostras de soro sanguíneo de ruminantes com a suplementação de lipídio.....	70
Figura 2 Superfície de resposta média dos modelos SS de Scheffé apresentado na Figura 1..	71

## LISTA DE TABELAS

### PRIMEIRA PARTE

Tabela 1– Solventes extratores utilizados na DLLME e suas propriedade fisico químicas. ....	28
Tabela 2– Solventes dispersores utilizados na DLLME e suas propriedade físico-químicas. .	29
Tabela 3 – Características de cada modificação realizada na n-DLLME de acordo com o sistema de dispersão.....	31
Tabela 4 – Características de cada modificação realizada na n-DLLME de acordo com a densidade do solvente extrator .....	31
Tabela 5 - Trabalhos reportados na literatura para a DLLME e suas variações na análises de amostras de soro sanguíneo.....	33

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO 1

Table 1 Experimental Design (mixture proportions), pseudomixtures e LD-DLLME technique experimental response .....	51
Table 2 Matrix representation of terms (contrasts) of Scheffé full cubic model.....	52

#### ARTIGO 2

Tabela 1 Parâmetros analíticos de desempenho do método avaliado segundo a faixa linear, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), LOD e LOQ.....	72
Tabela 2 Resultados para a análise de variância ANOVA para os experimentos de repetibilidade.....	73
Tabela 3 Resultados para a análise de variância ANOVA para os experimentos de precisão intermediária.....	74
Tabela 4 Resultados de recuperação (%) para os três níveis de concentração referentes ao experimento de veracidade.....	75
Tabela 5 Concentração de AL e AE determinada para 5 pelo método de adição de padrão. ...	77

## LISTA DE SIGLAS

AA-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ar
$A_{\text{doadora}}$	Analito na fase doadora
AE	Ácido esteárico
$A_{\text{extratora}}$	Analito na fase extratora
AG	Ácidos graxos
AL	Ácido linoleico
ALA	Ácido $\alpha$ -linoleico
ANOVA	Análise de variância
$C_{\text{adicionada}}$	Concentração do analito adicionado
$C_{\text{analito}}$	Concentração do analito
CCT-DLLME	Armadilha de coluna fria com microextração líquido-líquido dispersiva
$C_{\text{doadora}}$	Concentração do analito na fase doadora
$C_{\text{extratora}}$	Concentração do analito na fase extratora
CPE	Extração em ponto nuvem
$C_{\text{real}}$	Concentração do analito na amostra real
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva
DLLME-SFOD	Microextração líquido-líquido dispersiva com solidificação da gota orgânica
DZO	Departamento de Zootecnia
EM	Efeito de matriz
ETM	Estearato de metila
$F_{\text{calculado}}$	Valor de F calculado pelo teste-F
$F_{\text{crítico}}$	Valor de F tabelado por distribuição de probabilidade
FE	Fator de enriquecimento
FO	Folch et al., (1957)
GC	Cromatografia gasosa
GC/FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização em chamas
$H_0$	Hipótese nula
$H_a$	Hipótese alternativa
HLLE	Extração líquido-líquido homogênea
IL-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva assistida em líquido iônico
$K_d$	Constante de equilíbrio
LD-DLLME	MicroextraçãoMicroextração líquido-líquido dispersiva de baixa

	densidade
LLE	Extração líquido-líquido
LM	Linoleato de metila
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MCC	Modelos cubico completo
MCE	Modelo cúbico especial
min	Minutos
ML	Modelo linear
MQ	Modelo quadrático
n-3	Ômega - 3
n-6	Ômega - 6
n-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva normal
$n_{\text{doadora}}$	Número de mols do analito na fase doadora
$n_{\text{extratora}}$	Número de mols do analito na fase extratora
OPE	Extração monofásica de lipídios
PUFAS	Ácidos graxos poli-insaturados
p-valor	Valor de probabilidade
$R^2$	Coefficiente de determinação
RE	Recuperação de extração
RR	Recuperação relativa
s	Segundos
SS	Super Saturado
tr	Tempo de retenção
USA-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por ultrassom
VA-DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva assistida por vórtex

## SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	16
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	17
2.1 Lipídeos.....	17
2.1.1 Ácidos graxos no organismo de ruminantes .....	19
2.2 Extração de lipídeos.....	21
2.2.1 Método de Folch et al (1957) .....	22
2.3 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) .....	23
2.3.1 Variáveis experimentais na DLLME .....	27
2.4 Classificações da DLLME .....	30
2.5 DLLME e suas variações na extração de analitos em amostras de soro sanguíneo ..	32
2.6 Quimiometria.....	33
2.6.1 Modelo de Scheffé.....	34
2.7 Validação de metodologia analítica.....	37
2.7.1 Seletividade .....	37
2.7.2 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) .....	37
2.7.3 Faixa de trabalho (linearidade).....	38
2.7.4 Sensibilidade analítica .....	39
2.7.5 Exatidão .....	39
2.7.6 Precisão .....	39
2.7.7 Incerteza de medição .....	40
2.7.8 Robustez.....	41
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS.....	47
Artigo 1 - Moore-penrose inverse generalized screening mixture design applied in low-density dispersive liquid-liquid microextratio.....	47
Artigo 2 - Microextração líquido-líquido dispersiva de baixa densidade na determinação de ácidos graxos em amostras de soro sanguíneo de ruminates por GC/FID.....	61

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO GERAL**

O preparo de amostra é uma etapa das análises laboratoriais que consiste na extração dos compostos de interesse e redução de possíveis interferentes químicos e metodológicos. Trata-se de um processo importante para se analisar amostras e quantificar compostos presentes em matrizes mais complexas, como as amostras biológicas. Essas amostras são compreendidas como: urina, saliva, suor, leite materno, respiração exalada, tecidos musculares, sangue total, plasma, soro, entre outras.

As amostras de sangue total, plasma e soro apresentam diversas complicações nas análises laboratoriais devido à presença de macromoléculas, como as lipoproteínas, capazes de associar diversos compostos em sua estrutura. Entre as substâncias associadas, os lipídios são os mais comumente encontrados, o que dificulta a determinação do perfil de ácidos graxos (AG) no organismo animal.

A determinação do perfil de AG no organismo de ruminantes é importante, uma vez que esses animais passam pelo processo de biohidrogenação, realizado por bactérias ruminais. Nesse processo, os ácidos graxos poli-insaturados (*polyunsaturated fattyacid* - PUFAs) sofrem sucessivos processos de isomerização, fazendo com que o ácido linoleico (AL, C18:2, cis-9 cis-12), principal responsável pelo desempenho reprodutivo desses animais, seja convertido em ácido esteárico (AE, C18:0) e outros intermediários de reação, que não realizam a mesma função.

Nesse sentido, a extração de lipídios para a determinação do perfil de AG em organismos animais requer uma sequência de etapas para a obtenção de uma amostra limpa e com quantidades significativas dos constituintes de interesse. As metodologias convencionais de extração de lipídios se baseiam em um processo de separação líquido-líquido, formado por um sistema bifásico constituído por três solventes (ternário) em diferentes proporções.

O método criado por Folchet al. (1957) foi desenvolvido para a extração de lipídeos em tecidos animais com a utilização de uma mistura de clorofórmio e metanol. A fração aquosa endógena das amostras constitui o sistema ternário de extração. O método separa os lipídios dos demais constituintes das amostras como, carboidratos, proteínas e água. No entanto, o procedimento possui desvantagens devido à utilização de grandes volumes de solventes tóxicos, longo tempo de extração, contaminantes não-lipídicos densos, elevado número de etapas e exige grande quantidade de amostra para extração.

Diante das desvantagens apresentadas, técnicas miniaturizadas começaram a ser aplicadas na extração de lipídios com a finalidade de diminuir a quantidade dos solventes utilizados e interferentes da matriz. A microextração líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction* - DLLME) apresenta potencial de aplicação nesse tipo de análise devido à formação de microgotas de solvente orgânico com elevada área superficial, favorecendo uma interação mais efetiva entre o solvente de extração e os lipídios livres em solução, exigindo menor tempo de análise e quantidades reduzidas de solventes orgânicos.

A rápida execução proporcionada pelas técnicas miniaturizadas contribuem para evitar a oxidação (degradação) dos componentes lipídicos, principalmente os insaturados, encontrados em quantidades significativas em tecidos animais. Apesar das características promissoras das técnicas miniaturadas, os sistemas líquido-líquido bifásicos são complexos e as proporções dos solventes utilizados devem ser determinadas de maneira precisa e com poucas análises.

Nesse sentido, a quimiometria é uma ferramenta que fornece métodos estatísticos e matemáticos, que podem diminuir a quantidade de análises e apresentar informações importantes para o entendimento do sistema químico. Um exemplo é o modelo polinomial de Scheffé, utilizado na modelagem de misturas constituídas por dois ou mais componentes. O modelo fornece parâmetros matemáticos que apresentam detalhes de uma superfície de resposta, a fim de prever o comportamento do sistema formado com a variação da proporção dos solventes.

Nessa perspectiva o objetivo desse trabalho foi desenvolver uma metodologia para a extração e quantificação de ácido linoléico (AL) e ácido esteárico (AE) em soro sanguíneo de ruminantes por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (*gas chromatography with flame ionization detector*- GC/FID), utilizando a técnica de microextração líquido-líquido dispersiva de baixa densidade (*Low-density dispersive liquid-liquid microextraction*- LD-DLLME). Em seguida, otimizar as condições de extração pelo modelo de mistura de Scheffé e validar o método desenvolvido seguindo as recomendações do guia EURACHEM/2014.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

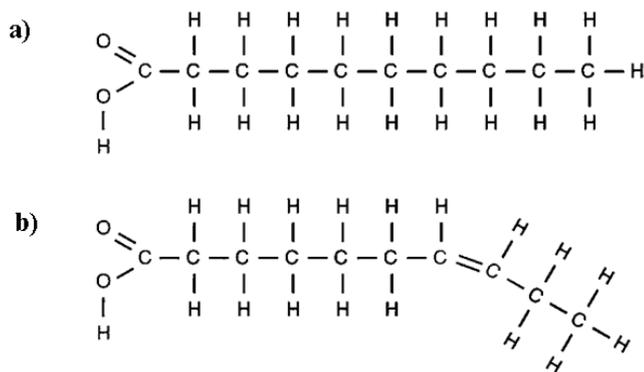
### **2.1 Lipídeos**

Os lipídios são um conjunto de biomoléculas insolúveis em água e facilmente reativas com substâncias de baixa polaridade, responsáveis por desenvolver uma série de atividades

celulares e armazenar energia na maioria dos seres vivos, além de transportar vitaminas (CARMO; CORREIA, 2009; MORRISON; BOYD, 1996; PERINI, 2010). São compostos bem definidos com relação à sua estrutura e grande parte dos lipídios encontrados em matrizes biológicas se apresenta na forma de ésteres de glicerol, ou seja, como triacilgliceróis. Essas substâncias são gorduras de origem animal ou óleos vegetais que, quando submetidos a um processo de hidrólise, produzem uma mistura de ácidos graxos (SOLOMONS; W.; FRYLHE, 2005).

Os AG são ácidos carboxílicos, pertencentes ao grupo dos lipídios, que possuem uma estrutura alongada, contendo de 4 a 36 átomos de carbono. Esses compostos podem ser saturados ou possuir instauração (ligações duplas), como apresentado na Figura 1, sendo que a maioria não possui ramificações, grupos hidroxila ou anéis em sua estrutura (LEHNINGER, 2006).

Figura 1– Exemplos de conformação dos ácidos carboxílicos.



- a) Representação de um ácido carboxílico saturado e sua estrutura. b) Representação de um ácido carboxílico insaturado e sua estrutura.

Fonte: do autor

AG com mais de uma instauração são chamados de poli-insaturados, (PUFAs). Os PUFAs são ácidos graxos essenciais, pois não podem ser produzidos bioquimicamente pelos mamíferos, havendo a necessidade de suplementação dos mesmos por meio da dieta (PERINI, 2010).

Estudos científicos relatam que os PUFAs pertencentes à família do ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6), quando suplementados em quantidades adequadas na dieta de mamíferos, podem auxiliar em inúmeras atividades biológicas como: crescimento, reprodução, visão e funções cerebrais (MARTIN, 2006; PERINI, 2010; WANG; HU, 2017; WOLF *et al.*, 2018).

Os n-3 são AG que possuem mais de uma ligação dupla, sendo que, a primeira ligação dupla ocorre no terceiro carbono metílico terminal. Essa classe de PUFAs é derivada de

plantas como o ácido eicosapentaenóico ou de animais como o ácido docosahexanóico, encontrado em peixes e outros frutos do mar (WANG; HU, 2017).

Os PUFAs pertencentes à família do n-6 são caracterizados pela presença de pelo menos duas duplas ligações, com a primeira ligação do sexto carbono terminal metílico, encontrados principalmente em óleos vegetais, nozes e semente. Entre os diversos PUFAs n-6 empregado na dieta de mamíferos os principais são o AL e ácido araquidônico (WANG; HU, 2017).

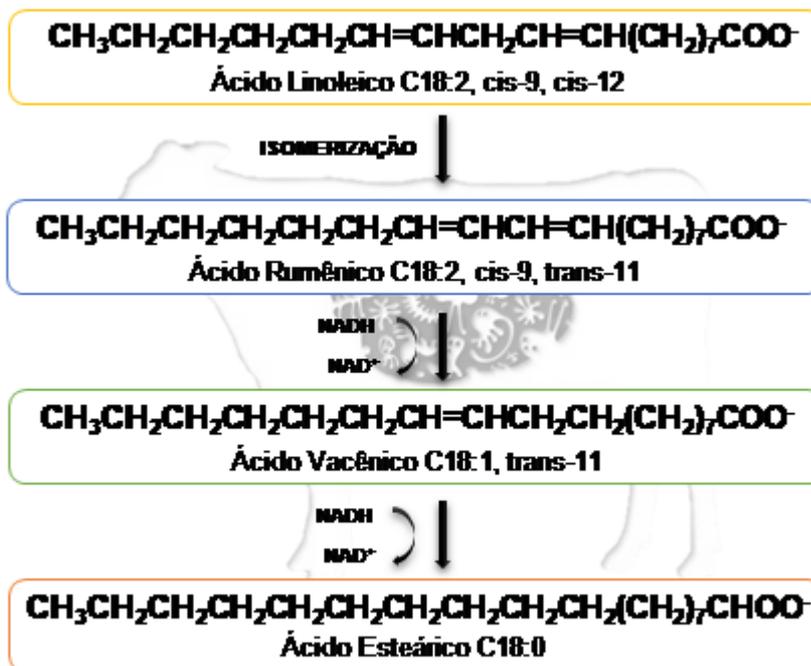
### **2.1.1 Ácidos graxos no organismo de ruminantes**

Na dieta de ruminantes os lipídios são essenciais, uma vez que são a principal fonte de AG para o organismo desses animais (DUTRA *et al.*, 2019). Quando fornecidos na dieta de ruminantes, os lipídios são hidrolisados, liberando diversos produtos no organismo desses animais, entre eles, AG de cadeia saturada e insaturada (KOZLOSKI, 2002).

A suplementação de AG tem como função o fornecimento de energia, que auxilia no processo metabólico desses animais, agregando benefícios aos produtos derivados e ao desempenho reprodutivo dos ruminantes (JENKINS; HARVATINE, 2014; YANTING *et al.*, 2019). No entanto, estratégias de alimentação são necessárias, uma vez que, grandes quantidades de AG no organismo podem prejudicar a fermentação ruminal e suprimir a ingestão de alimentos pelo sistema endócrino (CHALUPA *et al.*, 1986; OVERTON; WALDRON, 2004; YANTING *et al.*, 2019).

Um desafio encontrado no fornecimento de AG para ruminantes é o processo de biohidrogenação realizado pelas bactérias ruminais, em que AGs insaturados passam por processos de isomerização, que produz intermediários de reação insaturados principalmente a partir do AL (SANTOS *et al.*, 2008), como apresentado na Figura 2.

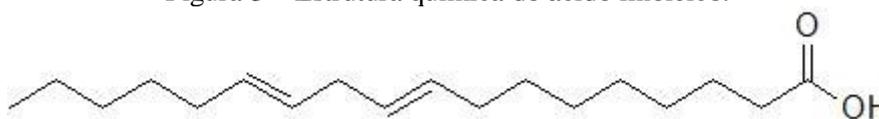
Figura 2 – Sistema da biohidrogenação do ácido linoleico.



Fonte: do autor

O AL (Figura 3) é um AG com duas insaturações, localizadas no carbono 9 e 12 da cadeia principal. Trata-se do principal PUFA do grupo dos n-6, presente em óleo de arroz, girassol, milho e soja, classificado como lipídio de reserva (CARMO; CORREIA, 2009; GREGORY, 2009; WANG; HU, 2017).

Figura 3 – Estrutura química do ácido linoleico.

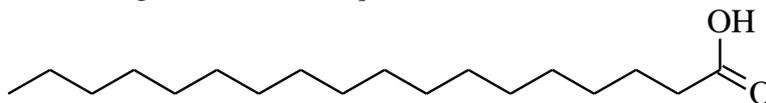


Fonte: do autor

Assim como outros PUFAS, o AL é responsável alterar o folículo ovariano e a função do corpo lúteo, por meio da quantidade de energia fornecida, realizando a síntese de precursores de hormônios, como esteroides e prostaglandinas, que influenciam significativamente no ambiente uterino, melhorando os resultados reprodutivos desses animais (DUTRA *et al.*, 2019; MATTOS; STAPLES; THATCHER, 2000; YANTING *et al.*, 2019). No entanto, devido ao processo de biohidrogenação, essa substância não é absorvida em quantidade significativa pelo organismo dos ruminantes, produzindo majoritariamente o AE e outros intermediários.

O AE (Figura 4) é um ácido graxo saturado com 18 átomos de carbono, sendo o principal componente gerado pelo processo de biohidrogenação ruminal. Estudos realizados por Wang, et al. (2002) mostram por meio de teste *in vitro* com fluido ruminal, que existe tendência decrescente na composição de ácido linoleico e aumento na concentração de AE em suplementações com óleo de linhaça ou linhaça moída (WANG *et al.*, 2002).

Figura 4 - Estrutura química do ácido esteárico.



Fonte: do autor

Assim, para que o AL chegue em quantidade significativa na corrente sanguínea e nos tecidos do animal, sem sofrer modificação em sua estrutura e desempenhe seu papel fisiológico, é necessário que o mesmo seja inserido na dieta em quantidade suficiente (WOLF *et al.*, 2018).

De acordo com as normas estabelecidas pela NRC (2001) a suplementação de lipídeos na dieta de ruminantes para que não ocorram prejuízos no processo de fermentação ruminal, não deve ser superior a 7% (NRC, 2001). A suplementação de grandes quantidades de s graxos na dieta desses animais prejudica o crescimento microbiano, processo de digestão de fibra e o consumo de matéria orgânica (JENKINS, 1993; JENKINS *et al.*, 2008; JENKINS *et al.*, 2009).

## 2.2 Extração de lipídeos

A extração de lipídios é um procedimento realizado em diversos tipos de matrizes, como: amostras de sangue, algas, alimentos, entre outros. Esse processo é realizado com a finalidade de determinar o perfil de todos os componentes lipídicos presentes ou apenas de uma classe desses compostos (LEE *et al.*, 2018).

Alguns métodos de extração de lipídios foram desenvolvidos e evoluíram ao longo dos anos a fim de extrair com maior precisão as substâncias presente em matrizes de extrema complexidade, permitindo sua aplicação em análises cromatográficas (FUKASAWA *et al.*, 2018; LEE *et al.*, 2018). Entre as matrizes complexas, o sangue apresenta certa particularidade por ser constituído pelo plasma e pelo soro, exigindo um preparo de amostra de qualidade para que os metabólitos com propriedades físico-químicas diferentes sejam extraídos e determinados de forma precisa e exata (SARAFIAN *et al.*, 2014). Outros fatores significativos que influenciam em uma extração lipídica eficiente são a coextração de

substâncias não lipídicas e a oxidação desses compostos, que pode ocorrer em processos de extração com longa duração (BRUM *et al.*, 2009).

A etapa de extração de lipídios seguida por derivatização é comum nas análises de AG, para transformá-los em ésteres metílicos através de reações de esterificação ou transesterificação. Essa etapa é necessária, pois, a transformação dos ácidos graxos em ésteres metílicos reduz o ponto de ebulição dessas substâncias e promove sua volatilização, necessária para melhorar a resolução dos picos em análises por cromatografia gasosa (*gas chromatography* - GC) (FIGUEIREDO *et al.*, 2016).

Alguns métodos de extração de lipídios foram desenvolvidos e evoluíram ao longo dos anos, a fim de extrair, com maior precisão, as substâncias presentes em matrizes de extrema complexidade. Entre os métodos utilizados os métodos de Bligh&Dyer, Soxhlet e Folch são os mais conhecidos (BRUM *et al.*, 2009).

Recentemente Pellegrino *et al.*, (2014) desenvolveu um método de extração para a pesquisa lipidômica em amostra de soro humano. Trata-se de uma extração monofásica de lipídios (*one-phase extraction*, OPE), que busca melhores índices de recuperação na análise simultânea de classes lipídicas diferentes. O método consiste na adição de 2000 µL de metanol (MeOH) com BHT (100 mg/L) em 100 µL de amostra de soro sanguíneo. As amostras são agitadas em vórtex e depois centrifugadas. O volume de 200 µL do sobrenadante é coletado, seco sob fluxo nitrogênio (N<sub>2</sub>) e armazenado para posteriores análises cromatográficas (PELLEGRINO *et al.*, 2014).

### **2.2.1 Método de Folch et al (1957)**

O método de Folch *et al.* (1957) é um método clássico de análise que realiza a extração de lipídios de tecidos animais utilizando uma mistura de clorofórmio e metanol em uma proporção de duas partes para uma, respectivamente. A água proveniente do tecido animal e a solução de cloreto de potássio 0,37% (m/v), adicionada ao meio de extração para promover a melhor separação das fases, faz com que um sistema ternário seja formado e auxilie na extração da fase lipídica (BRUM *et al.*, 2009).

A fase lipídica é separada pelo solvente de extração (clorofórmio) através de uma filtração em papel livre de gordura e posterior centrifugação. Um extrato contendo lipídios é obtido e armazenado para posteriores análises. Diferentes quantidades de solventes (clorofórmio e metanol) podem ser utilizadas, de acordo com o tipo e quantidade de tecido analisado (FOLCH; LEES; STANLEY, 1957).

A utilização de solventes com polaridades diferentes se deve às interações dos lipídios com membranas celulares e lipoproteínas. A utilização de um solvente polar (metanol) tem a finalidade de remover a associação existente entre essas substâncias e deixá-las livres em solução, sem que reações ocorram entre elas. O solvente apolar (clorofórmio) atua como um extrator dos lipídios já dissociados (BRUM *et al.*, 2009).

Apesar de ser uma técnica clássica de extração, o método de Folch apresenta algumas desvantagens, como o longo tempo de análise, toxicidade dos reagentes, possíveis coextrações ao longo do processo e utilização de quantidades excessivas de solventes orgânicos (TANG; ZHANG; LEE, 2016).

De maneira ideal, as técnicas de preparo de amostra devem ser de rápida e fácil execução, possuir baixo custo e serem compatíveis com o método instrumental de análise. Assim, cada vez mais, busca-se a simplificação e miniaturização das etapas, diminuindo a quantidade de amostra e de solventes orgânicos (SARAFRAZ, 2010).

### **2.3 Microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME)**

A DLLME foi desenvolvida por Rezaee *et al.* no ano de 2006, para a determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em amostras de água. A extração é realizada por um sistema ternário de solventes, semelhante ao da técnica de extração líquido-líquido homogênea (*homogeneous liquid-liquid extraction* – HLLE) e da extração em ponto nuvem (*cloud point extraction* – CPE) (REZAEI *et al.*, 2006).

Nesse método de extração, o solvente extrator é disperso na amostra aquosa usando um solvente dispersante, que promove a formação de gotículas finas de solvente extrator e que conseqüentemente adquirem uma elevada área superficial. Nesse sentido, a transferência de massas do analito para a fase extratora é aprimorada, o que torna a DLLME mais rápida que as demais técnicas de extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction* - LLE) (HE; CONCHEIRO-GUISAN, 2019).

O princípio da técnica se baseia no equilíbrio de partição do analito entre duas fases imiscíveis, uma doadora (amostra) e uma extratora (solvente extrator hidrofóbico). O que determina a solubilização do analito em qualquer uma das fases é a solubilidade relativa do sistema, uma vez que os analitos com característica apolar possuem a tendência de se solubilizar na fase acceptora composta por um solvente apolar (hidrofóbico), e os analitos com característica polare a se solubilizarem na fase doadora, composta por amostras aquosas de extrema polaridade (hidrofílico) (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015).

As moléculas com características polares possuem maior concentração de carga negativa em uma extremidade da nuvem eletrônica e maior concentração de carga positiva na extremidade oposta. Nas moléculas com características apolares a concentração de cargas está uniformemente distribuída ao longo da molécula. Assim, o equilíbrio resultante do sistema é determinado pela diferença de cargas elétrica entre as moléculas do analito da fase doadora (polar) e da fase aceptora (apolar) (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; HARRYS, 2017). O equilíbrio estabelecido no sistema de extração é representado pela Equação (1):



em que  $A_{doadora}$  representa os analitos presente na fase doadora e  $A_{extratora}$  os analitos presente na fase extratora.

Idealmente, a atividade do analito em ambas as fases à uma determinada temperatura é representado por uma constante de equilíbrio ( $K_d$ ) que consiste na Lei de Distribuição de Nernst (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Esta constante de equilíbrio é chamada de coeficiente de partição ou distribuição que pode ser representado pela Equação (2):

$$K_d = \frac{[A_{extratora}]}{[A_{doadora}]} \quad (2)$$

Nesse sentido, a DLLME é ideal para a extração de compostos com características lipofílicas ou que possuam  $K_d$  alterado pelo pH, no caso em que os analitos são ionizáveis (ZANG; ZHANG; WANG; WANG, 2015).

Para que a eficiência de extração da DLLME seja avaliada, alguns parâmetros analíticos foram adotados como: fator de enriquecimento (FE), recuperação de extração (RE) e recuperação relativa (RR) (REZAEI *et al.*, 2006; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010).

O FE é definido com a razão entre a concentração do analito na fase extratora ( $C_{extratora}$ ) e a concentração do analito na fase doadora ( $C_{doadora}$ ) com apresentado na Equação (3):

$$FE = \frac{C_{extratora}}{C_{doadora}} \quad (3)$$

O segundo parâmetro utilizado para certificar a eficiência de extração da DLLME é a RE, definida pela porcentagem do número de mols total do analito contido na fase doadora ( $n_{doadora}$ ) que foi extraído para a fase extratora ( $n_{extratora}$ ). Como o número de mols de uma substância é definido como o produto da concentração pelo volume total da solução, a RE pode ser inicialmente representada pela Equação (4)

$$RE = \frac{n_{sed}}{n_{doadora}} \cdot 100 = \frac{C_{extratora} \cdot V_{extratora}}{C_{doadora} \cdot V_{doadora}} \cdot 100 \quad (4)$$

em que  $V_{extratora}$  e  $V_{doadora}$  é o volume da fase extratora e doadora respectivamente.

Como o produto da  $C_{extratora}$  pela  $C_{doadora}$  é definido como o FE, assim, a Equação (4) pode ser reescrita como representado na Equação (5).

$$RE = \left( \frac{V_{extratora}}{V_{doadora}} \right) \cdot FE \cdot 100 \quad (5)$$

Em alguns casos a DLLME pode ser considerada uma técnica exaustiva, em que, a quantidade de analito contida na fase doadora é transferida completamente para a fase acceptora (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015). Nesse sentido a RR é definida como a razão entre a concentração do analito após a adição de uma concentração conhecida de solução padrão ( $C_{analito}$ ) menos a concentração de analito na amostra real ( $C_{real}$ ) pela concentração de padrão que foi adicionada sobre a amostra ( $C_{adicionada}$ ), representada pela Equação (6):

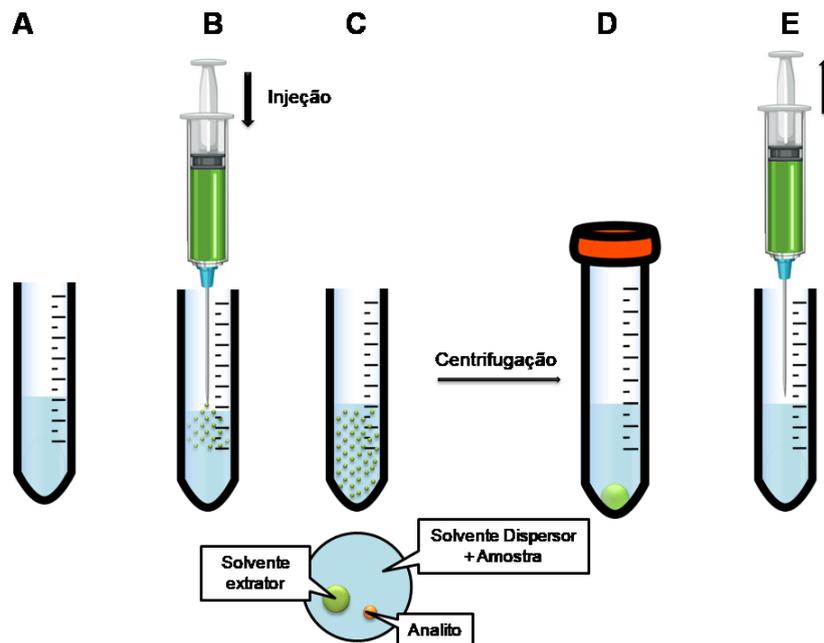
$$RR = \frac{C_{analito} - C_{real}}{C_{adicionada}} \cdot 100 \quad (6)$$

Nos casos em que a transferência do analito para a fase extratora é parcial, a DLLME é considerada uma técnica de equilíbrio, sendo a RR calculada segundo a Equação (7):

$$RR = \frac{K_d \cdot V_{acceptora}}{K_d \cdot V_{doadora} + V_{doadora}} \cdot 100 \quad (7)$$

Mesmo com diversos parâmetros para a determinação de sua eficiência a DLLME é realizada em duas etapas de simples execução, como apresentado na Figura 5.

Figura 5 – Sistema de extração da microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME).



(A) A amostra aquosa é colocada em um tubo de fundo chato; (B) o solvente extrator e o solvente dispersante são injetados com o auxílio de uma seringa formando uma solução turva (C); (D) a mistura ternária é centrifugada; (E) o solvente extrator, contendo o analito, é recolhido com o auxílio de uma seringa;

Fonte: do autor

Na primeira etapa de extração, quantidades adequadas e previamente otimizadas do solvente extrator e do dispersante são injetados rapidamente na amostra aquosa contendo os analitos. Nessa etapa, uma turbulência é produzida no sistema, formando uma emulsão das gotículas finas de solvente extrator de elevada área superficial com a amostra (REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010). Esse processo de dispersão faz com que a cinética de extração seja mais eficiente devido à maior superfície de contato entre o solvente extrator e os analitos contidos na amostra (MANSOUR; KHAIRY, 2017).

A segunda etapa do processo de extração ocorre com a centrifugação do sistema de extração, para que a emulsão seja quebrada e ocorra a separação das fases (MANSOUR; KHAIRY, 2017). A fase contendo os analitos é sedimentada na parte inferior do tubo e pode ser recolhida e analisada pelo método analítico mais adequado (KISSOUDI; SAMANIDOU, 2018; REZAEE; YAMINI; FARAJI, 2010).

Desde o seu desenvolvimento, a DLLME passou a ser utilizada como técnica de extração em diversas áreas de segmento da química como: química analítica, química ambiental, bioquímica, toxicologia, entre outros (KISSOUDI; SAMANIDOU, 2018). Isso se

deve às vantagens dessa técnica, que inclui o curto tempo de execução, simplicidade de operação, baixo custo, alta recuperação do analito e alto fator de enriquecimento e perfil ambientalmente correto (KISSOUDI; SAMANIDOU, 2018; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; SHAMSIPUR *et al.*, 2014).

Mesmo apresentando muitas vantagens, algumas variáveis podem afetar a eficiência de extração da DLLME e necessitam de um processo de otimização de acordo com as características físico-químicas de cada analito.

### **2.3.1 Variáveis experimentais na DLLME**

A eficiência de extração da DLLME pode ser melhorada pela otimização de suas variáveis experimentais, como:

- Tipo e volume do solvente extrator

Na DLLME uma das variáveis de grande significância para o processo de extração é o tipo do solvente extrator empregado, selecionado de acordo com algumas propriedades físico-químicas, tais como, ser imiscível na fase doadora (amostra), extrair eficientemente os analitos e ser compatível com técnicas cromatográficas de análise (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; MANSOUR; KHAIRY, 2017; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010).

Na Tabela 1 estão listados alguns possíveis solventes extratores a serem utilizados na DLLME e suas respectivas propriedades físico-químicas.

Tabela 1– Solventes extratores utilizados na DLLME e suas propriedades físico químicas.

Solvente	Densidade (g cm <sup>-3</sup> , 20° C)	Solubilidade em água (g L <sup>-1</sup> , 20° C)	Temperatura de Fusão (°C)	Temperatura de Ebulição (°C)	Pressão de Vapor (mmHg, 20 °C)
1,2-Dicloroetano	1,25	8,7	-3,5	83,5-84,1	65
1-Butanol	0,81	77	-89	116-118	5
1-Clorobutano	0,89	0,5	-123	79	83
1-Octanol	0,83	0,3	-16	195	5
1-Undecanol	0,83	Insolúvel	13-15	129-131	0,006
Acetato de etila	0,90	85,3	-83	77	73
Benzeno	0,88	1,8	5,5	80,1	76
Brometo de benzila	1,44	Decompõe	-4	198	5,1
Ciclo-hexano	0,78	0,055	6	81	77
Clorofórmio	1,47	8	-63	61	158
Diclorometano	1,33	20	-95	40	356
Éter metil-terc-butílico	0,74	42	-108,6	55,3	201
Iso-octano	0,69	0,00056	-107	99	38
n-Heptano	0,68	0,05	-90,5	97-98	36
n-Hexano	0,66	0,0095	-94,3	69	120
Tetracloroeto de Carbono	1,59	0,8	-23	76,7	90
Tolueno	0,87	0,52	-95	110,6	22

Fonte: BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015

Na DLLME convencional, também conhecida como DLLME normal (n-DLLME), o solvente extrator possui densidade superior a 1,0 g cm<sup>-3</sup> (mais denso que a água). No entanto, devido à toxicidade de alguns solventes e baixa a eficiência no processo de dispersão, modificações foram propostas no método de extração, utilizando-se solventes com densidade inferior a 1 g cm<sup>-3</sup> e com menor toxicidade, o que proporcionou uma série de classificações da técnica (MANSOUR; KHAIRY, 2017), que será abordada em outra seção.

A eficiência do processo de extração também é significativamente afetado pelo volume do solvente extrator que pode variar entre 8 e 500 µL (CAMPILLO *et al.*, 2017). Esse fenômeno está relacionado ao FE, pois, com o aumento do volume do solvente extrator um maior volume de fase sedimentada será obtido após a centrifugação, ocorrendo à diminuição no FE, uma vez que a concentração do analito diminuirá em um volume maior de solvente. Nesse sentido o solvente extrator ideal deve apresentar altos valores para o FE, assim como, grandes volumes de fase sedimentada para posterior análise (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; VIÑAS *et al.*, 2014).

- Tipo e volume do solvente dispersor

A segunda variável experimental que apresenta influências significativas no processo de extração da DLLME é o solvente dispersor (ou dispersante), que pode ser selecionado de acordo com sua solubilidade tanto na fase extratora (apolar) quanto na fase aquosa (polar) (REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010; SAJID, 2018). Na Tabela 2 estão listados alguns possíveis solventes utilizados como dispersores na DLLME.

Tabela 2– Solventes dispersores utilizados na DLLME e suas propriedades físico-químicas.

Solvente	Densidade (g cm <sup>3</sup> , 20° C)	Solubilidade em água (g.L <sup>-1</sup> , 20° C)	Temperatura de Fusão (°C)	Temperatura de Ebulição (°C)	Pressão de Vapor (mmHg, 20 °C)
Tetra-hidrofurano	0,89	Solúvel	-108,5	65-66	176
1,4 Dioxano	1,03	Solúvel	12,00	101,5	31
1-propanol	0,80	Solúvel	-127,0	96,5-98	14
Metanol	0,79	Solúvel	-98,00	64,5	96
Etanol	0,79	Solúvel	-114,5	78,3	44
Acetona	0,79	Solúvel	-95,40	56,2	175
Acetonitrila	0,786	Solúvel	-45,70	81,6	73
2-propanol	0,786	Solúvel	-89,50	82,4	32

Fonte: BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015

O volume do solvente dispersor é o principal responsável pela formação da solução turva, composta pela amostra aquosa, solvente extrator e o próprio solvente dispersor. Nesse sentido, o grau de dispersão do solvente extrator na fase aquosa e a formação das microgotas são afetados pelo volume do solvente dispersor, o que conseqüentemente influencia na eficiência de extração da DLLME (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010).

Um segundo aspecto eminente do volume do solvente dispersor é sua contribuição para o aumento do volume da fase sedimentada. Assim, os volumes do solvente dispersor e extrator devem ser variados simultaneamente para que o volume da fase sedimentada seja constante (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; REZAEI; YAMINI; FARAJI, 2010).

- pH

O pH é uma variável que exerce uma papel crucial para a eficiência de extração de compostos ionizáveis, uma vez que, os analitos em sua forma não ionizada (ou protonada) são facilmente transferidos pra o solvente extrator (CAMPONE *et al.*, 2012).

- Força iônica

A força iônica é a variável que está diretamente relacionada com a separação das fases após a etapa de centrifugação da DLLME, promovida pela adição de um ou mais sais no amostra aquosa. A adição desses sais faz com que o volume da fase sedimentada aumente, devido a diminuição da solubilidade do solvente extrator em água (BORGES; FIGUEIREDO; QUEIROZ, 2015; CELANO *et al.*, 2019).

O fenômeno descrito é denominado “*salting-out*” que por definição, quando a concentração de sal em uma solução aquosa é muito elevada, a solubilidade de outras moléculas orgânicas com polaridade mais baixa diminui (TANG; WENG, 2013). A diminuição da solubilidade das moléculas orgânicas em meio aquoso acontece devido à formação de esferas de hidratação das moléculas de água em torno das moléculas do cátion do sal deixando-as menos disponíveis para interagir com os analitos (LORD; PAWLISZYN, 2000). Essas características do efeito *salting-out* faz com que os analitos precipitem ou se separem da solução (TANG; WENG, 2013).

#### **2.4 Classificações da DLLME**

Devido à infinidade de matrizes e a variabilidade de analitos com potencial de extração pela DLLME, modificações foram propostas no método de dispersão e na densidade dos solventes extratores (MANSOUR; KHAIRY, 2017). As modificações realizadas de acordo com o sistema de dispersão e suas principais características estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Características de cada modificação realizada na n-DLLME de acordo com o sistema de dispersão

Sigla	Características
<b>USA-DLLME*</b>	Na USA-DLLME, ondas de ultra-som são usadas para facilitar a etapa de dispersão do solvente extrator na amostra aquosa substituindo a agitação manual (MANSOUR; KHAIRY, 2017).
<b>VA-DLLME**</b>	NA VA- DLLME a dispersão do solvente extrator na amostra aquosa é realizada pela agitação em vortéx, formado solução turva (RAHMANI <i>et al.</i> , 2017), podendo ou não conter o solvente dispersor (MANSOUR; KHAIRY, 2017).
<b>AA-DLLME***</b>	A AA-DLLME é realizada recolhendo e injetando a amostra aquosa com os analitos juntamente com um pequeno volume de solvente extrator para uma seringa, até a formação de uma dispersão estável (KARAMI-OSBOO; MAHAM, 2018).

\*DLLME assistida por ultrassom (Ultrasoundassisted DLLME) \*\*DLLME assistida por vortéx (Vortex-assisted DLLME) \*\*\*DLLME assistida por ar (Air-assisted DLLME).

As modificações realizadas de acordo com a densidade do solvente extrator e suas principais características são apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Características de cada modificação realizada na n-DLLME de acordo com a densidade do solvente extrator

Sigla	Características
<b>IL-DLLME*</b> ( $\rho > 1 \text{ g cm}^{-3}$ )	O método convencional da IL-DLLME utiliza os líquidos iônicos como solvente extrator ou dispersor na etapa de extração. Os líquidos iônicos são sais orgânicos carregados, líquidos em temperatura ambiente e estáveis, selecionados de acordo com o cátion ou o ânion usado em sua preparação (TRUJILLO-RODRIGUEZ; ROCIO-BAUTISTA; PINO; AFONSO, 2013).
<b>LD-DLLME**</b> ( $\rho < 1 \text{ g cm}^{-3}$ )	A LD-DLLME utiliza solventes orgânicos de baixa densidade e mais seguros como: octanol, hexano, ciclohexano e outros (YANG <i>et al.</i> , 2019). Após a etapa de dispersão e terminação o solvente extrator com os analitos é recolhido na parte superior do tubo (MANSOUR; KHAIRY, 2017).
<b>DLLME-SFOD***</b> ( $\rho < 1 \text{ g cm}^{-3}$ )	A DLLME-SFO usa solventes de baixa densidade com baixos pontos de fusão ( $10 - 25 \text{ }^\circ \text{C}$ ) tais como 1-undecanol e 1-dodecanol (MANSOUR; DANIELSON, 2017). Após dispersão e separação de fases, o solvente extrator é solidificado usando uma caixa de gelo e então transferido por uma espátula ou fórceps (MANSOUR; KHAIRY, 2017).

\*DLLME assistida com líquido iônico (Ionicliquid-assisted DLLME). \*\*DLLME com solvente de baixa densidade (Lowdensitysolvent-DLLME). \*\*\*DLLME com solidificação da gota orgânica (DLLME withsolidified floating organicdroplet).

Mesmo com as diversas modificações já propostas, novos métodos continuam sendo criados para melhorar a eficiência de extração da DLLME. Os agentes ativos de superfície (surfactantes) foram utilizados, sendo que, sua utilização como solvente extrator ou dispersor depende das propriedades físico-químicas associadas ao mesmo. Surfactantes hidrofílicos são geralmente utilizados como solventes dispersores na chamada DLLME assistida por surfactante (*surfactante assisted DLLME*, AS-DLLME). Já os surfactantes hidrofóbicos são utilizados como solventes extratores na DLLME em ponto nuvem (*cloud-point DLLME*, CP-DLLME) (MANSOUR; KHAIRY, 2017).

## **2.5 DLLME e suas variações na extração de analitos em amostras de soro sanguíneo**

O preparo de amostras em matrizes biológicas, como sangue total, soro e plasma, são um desafio devido a vários compostos endógenos como as proteínas plasmáticas. As técnicas de preparo de amostras devem garantir a remoção dessas biomoléculas a fim de melhorar a eficiência de extração de substâncias como: proteínas, lipídios e açúcares (DE BOECK *et al.*, 2019).

Assim, a DLLME e suas variações são utilizadas no preparo de amostras em amostras de soro sanguíneo. Alguns trabalhos reportados na literatura são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Trabalhos reportados na literatura para a DLLME e suas variações na análises de amostras de soro sanguíneo.

<b>Técnica</b>	<b>Analito</b>	<b>Solvente extrator</b>	<b>Referência</b>
LD-DLLME	25 hidroxi-colocalciferol	1-octanol	(MOLLAHOSSEINI; KAMANKESH; MOHAMMADI, 2019)
TSIL-DLLME*	Cádmio	tiosalicilato de trioctil metil amônio	(KHAN <i>et al.</i> , 2018)
IL-DLLME	Cobre	hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio	(SAFAVI; MALEKI; ALIZADEH; FARJAMI, 2016)
IL-DLLME	Danazol	hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio	(GONG; ZHU, 2016)
IL-DLLME	Cobre	hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio	(ARAIN <i>et al.</i> , 2016)
DLLME	Fármacos imunossupressores	Clorofórmio	(CHEN <i>et al.</i> , 2016)
DLLME	Rivaroxaban	Clorofórmio	(CHENG; CHEN; CHANG, 2015)
DLLME	Parabenos	Triclorometano	(CARRASCO <i>et al.</i> , 2015)
DLLME	Benzofenonas	Triclorometano	(VELA-SORIA <i>et al.</i> , 2014)
USA- DLLME	Bactérias patogênicas	Clorofórmio	(ABDELHAMID; BHAISARE; WU, 2014)
IL-DLLME	5-hidroxiindóis	hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazólio	(HAYAMA <i>et al.</i> , 2013)
CCT-DLLME**	Curcumina	1-dodecanol	(SAFDARIAN; HASHEMI; NADERLOU, 2012)

\*Microextração líquido-líquido dispersiva usando líquidos iônicos para tarefa específica. (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Using a Task-Specific Ionic Liquid, TSIL-DLLME). \*\* Armadilha de coluna fria com microextração líquido-líquido dispersiva (cold column trapping in dispersive liquid-liquidmicro extraction, CCT)

É válido ressaltar que nenhum trabalho reportado na literatura utiliza a DLLME ou uma de suas variações para a determinação de lipídios em amostras de soro sanguíneo.

## 2.6 Quimiometria

Devido ao intenso desenvolvimento dos instrumentos de análises químicas, uma grande quantidade de dados começou a ser obtida rotineiramente em laboratório, com alta variedade de informações. Nesse sentido, métodos capazes de extrair informações precisas de

tamanha quantidade de dados começaram a ser desenvolvidos, impulsionando o campo das análises químicas (SZYMANSKA, 2018).

Na década de 70, as medições e cálculos realizados em função do desempenho de processos ou sistemas químicos passaram a ser entendidos como uma ciência chamada de quimiometria (NUNES *et al.*, 2012). A quimiometria tem como objetivo obter informações químicas por meio de métodos matemáticos ou estatísticos, que na maioria dos casos não é uma tarefa fácil, sendo necessário realizar cálculos extensos exigindo a utilização de *softwares* e computadores (KUMAR *et al.*, 2014; NUNES; *et al.*, 2012).

As ferramentas quimiométricas são aplicadas na otimização de métodos analíticos com a finalidade de diminuir a quantidade de experimentos, contribuindo para o menor consumo de reagente e de tempo. A otimização de um processo tem como objetivo melhorar o desempenho para se conseguir maiores benefícios. Nesse sentido, no desenvolvimento de métodos analíticos é necessária a aplicação de métodos de otimização, devido à grande quantidade de variáveis que podem influenciar na resposta analítica (BEZERRA *et al.*, 2016; KUMAR; BANSAL; SARMA; RAWAL, 2014)

Os métodos de otimização se caracterizam pelo conjunto de experimentos químicos, para condições de análise para se obter melhores respostas analíticas, com maior precisão, sensibilidade, menores limites de quantificação com o menor custo possível. Entre as diversas ferramentas quimiométricas o modelo de misturas, assim como outros, se destaca pela capacidade de otimização multivariada (BEZERRA *et al.*, 2016).

### 2.6.1 Modelo de Scheffé

O planejamento experimental para estudos de misturas é um caso específico, sendo que suas propriedades são determinadas pelas proporções de seus componentes e não por valores absolutos. A soma das proporções dos componentes de uma mistura deve sempre corresponder a 100%, podendo ser representada pelas Equações(8).

$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1 \quad (8)$$

sendo:  $0 < x_i < 1$

em que,  $x_i$  a proporção do  $i$ -ésimo componente e  $q$  o número de componentes da mistura.

A relação apresentada retira um grau de liberdade (q-1), estabelecendo que, com a proporção de dois componentes, é possível determinar a proporção do terceiro no caso de uma mistura ternária de solventes (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

Essa restrição sugere que novas metodologias sejam desenvolvidas para se adaptarem aos problemas envolvendo misturas. Nesse sentido, o modelo polinomial de Scheffé é o mais utilizado, pois deixa explícito todos os componentes representados como parâmetros do modelo, sendo conveniente para interpretações em termos químicos. Trata-se de uma reparametrização do modelo polinomial ordinário (CORNELL, 2011). Os parâmetros  $\beta_i$  e  $d_i$  capturam detalhes da superfície de resposta que podem ser interpretados como informações sobre a interação dos componentes da mistura investigada. A interpretação geral dos coeficientes é dada por:

- $\beta_i$ : indica o posicionamento (altura) da superfície, ou seja, as respostas esperadas para os componentes puros ( $x_i$ );
- $\beta_{ij}$ : termos binários indicam se há presença de curvaturas nas bordas indicando a sinergia ou antagonismo entre  $x_i$  e  $x_j$ ;
- $\beta_{123}$ : o valor do coeficiente para o termo cúbico especial pode indicar se há curvatura no centroide (pontos dentro da superfície);
- $d_{ij}$ : indica a inflexão das arestas entre os componentes entre  $x_i$  e  $x_j$  (CORNELL, 2011).

O modelo linear (ML) de Scheffé é forma mais simples de representar uma mistura de três componentes, em que, um plano se ajusta da melhor maneira, em relação a disposições dos pontos no espaço. Tal modelo é representado na Equação (9).

$$y_i = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i \quad (9)$$

Uma ampliação do ML é o modelo quadrático (MQ) de Scheffé, que contém mais termos associados a sua equação. O modelo quadrático pode modelar curvaturas nas arestas da superfície, ao contrário do modelo linear, que mantém suas arestas completamente retas (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). O MQ é representado pela Equação (10).

$$y_i = \sum_{i=1}^q \beta_i x_i + \sum_{i<j}^{q-1} \sum_j^q \beta_{ij} x_i x_j \quad (10)$$

O modelo cúbico especial (MCE) de Scheffé é um modelo mais amplo, que apresenta termos em sua equação, capaz de representar a curvatura da superfície de acordo com a disposição e informação que os dados experimentais apresentam. O MCE é representado pela Equação (11).

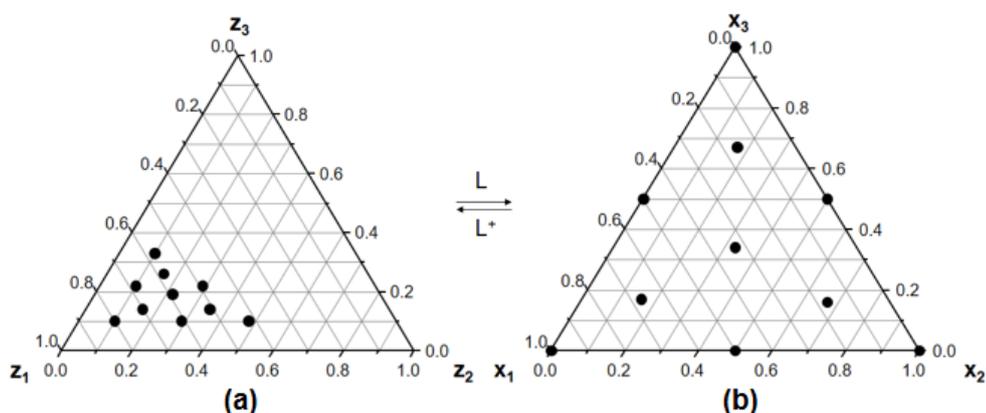
$$y_i = \sum_{i=1}^q \beta_1 x_1 + \sum_{i<j}^{q-1} \sum_j^q \beta_{ix} x_i x_j + \sum_{i<j}^{q-2} \sum_{j<k}^{q-1} \sum_k^q \beta_{ijk} x_i x_j x_k \quad (11)$$

O modelo cúbico completo (MCC) representado na Equação (12) é capaz de representar com maior precisão as inflexões ao longo de toda a superfície, sendo indicado para representar informações de misturas mais complexas, em que, ocorram interações entre os solventes utilizados (CORNELL, 2011).

$$y_i = \sum_{i=1}^{n=3} \beta_i x_1 + \sum_{i=1}^{n=3} \sum_{i>j}^{n=3} \beta_{ij} x_i x_j + \beta_{123} x_1 x_2 x_3 + \sum_{i=1}^{n=3} \sum_{j>i}^{n=3} d_{ij} x_i x_j (x_i - x_j) \quad (12)$$

O modelo polinomial de Scheffé analisa as diferentes proporções dos componentes da mistura, sendo ela binária, ternária ou com maior número de componentes. O modelo garante que o arranjo de pontos formado pelas combinações das proporções, fique igualmente espaçado no simplex. O arranjo dos pontos previsto pelo modelo polinomial de Scheffé é apresentado na Figura 6.

Figura 6- Representação do modelo ternário para o MCC com dez pontos experimentais.



(A) representação do espaço simplex; (B) representação do espaço pseudomistura para o MCC.

Fonte: do autor

O arranjo simplex da Figura 6(a) representa uma restrição do sistema químico de mistura com três componentes. Essa restrição do espaço químico é realizada em casos particulares, em que, misturas binárias e formulações dos componentes puros, não são capazes de compor o sistema em estudo. Nesse caso, somente misturas com proporções dos três componentes são representadas. O arranjo simplex da Figura 6 (b) trata-se da mesma região porém em termos de pseudo componentes, que por definição, são combinações dos componentes originais, que redefinem as coordenadas das misturas em relação ao espaço experimental a ser estudado (CORNELL, 2011).

## 2.7 Validação de metodologia analítica

### 2.7.1 Seletividade

No desenvolvimento de um método analítico a concentração das substâncias de interesse presentes em uma amostra é determinada indiretamente através de propriedade específicas e quantificáveis que as moléculas de tais substâncias possam apresentar quando submetidas a um método de análise. Nesse sentido, é fundamental que o sinal analítico gerado seja proveniente apenas desses analitos e não de outras substâncias quimicamente ou fisicamente similares, evitando-se assim, viés nos resultados de medição (FDA, 2019).

O parâmetro que avalia a correspondência de uma substância com o sinal analítico gerado devido à suas propriedades específicas é a seletividade, que por definição, é a extensão a qual o método analítico pode ser usado para determinar analitos particulares em misturas ou matrizes sem a interferência de outros componentes com características similares (EURACHEM, 2014; VESSMAN *et al.*, 2001).

As interferências nos métodos analíticos podem se comportar de forma sinérgica ou antagonica ao sinal correspondente a substância de interesse. Interferências “rotacionais” afetam o sinal analítico proporcionalmente a concentração do analito, alterando a inclinação da curva de calibração, mas não o intercepto. As interferências “translacionais” ou “fixas”, frequentemente referida como “de fundo” ou “de base” afetam a resposta analítica independente da concentração do analito na amostra, alterando o intercepto da curva de calibração, mas não a sua inclinação (EURACHEM, 2014).

Em análises cromatográficas, alguns cuidados são necessários para a fim de garantir uma boa resolução (separação) e pureza dos picos cromatográficos. Alguns testes podem ser realizados através de um detector de arranjo de fotodiodos ou espectrômetro de massas, capazes de demonstrar que o pico cromatográfico é referente a um único analito (BRASIL, 2011).

### 2.7.2 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção (*limit of detection* – LOD) é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada pelo método em um nível específico de confiança. A definição do limite de quantificação (*limit of quantification* – LOQ) refere-se ao nível em que o desempenho do método desenvolvido é aceitável para uma aplicação típica. A terminologia empregada para a definição desses conceitos é muito diversificada e varia de acordo com os setores que as utilizam. Nesse sentido, muitos laboratórios fazem a distinção entre o limite de

detecção do instrumento analítico utilizado na determinação das substâncias de interesse e o limite de detecção da curva analítica desenvolvida para o método. O LOD do instrumento analítico é dado pela análise de amostras, muitas vezes em branco, apresentadas diretamente ao equipamento ou através da relação entre o sinal proveniente do analito e o ruído do equipamento, sendo essa relação comumente chamada de “sinal-ruído”(EURACHEM, 2014).

O LOD e o LOQ baseado no sinal ruído do equipamento podem ser calculados segundo as Equações (15) e (16), respectivamente.

$$s_0 = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (13)$$

$$s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}} \quad (14)$$

$$LOD = 3 \times s'_0 \quad (15)$$

$$LOQ = 10 \times s'_0 \quad (16)$$

em que  $s_0$  é o desvio padrão de várias medidas de amostras com baixa concentração do analito (Equação 13),  $s'_0$  o desvio padrão bruto das mesmas análises (Equação 14),  $x_i$  é o valor individual de cada análise,  $\bar{x}$  é a média dos valores e  $n$  é o número de replicatas realizadas (EURACHEM, 2014).

O LOD e LOQ, também podem ser determinados de acordo com os parâmetros da curva analítica segundo Equações ((17) e (18).

$$LOD = 3,3 \frac{s}{S} \quad (17)$$

$$LOQ = 10 \frac{s}{S} \quad (18)$$

em que  $s$  pode ser determinado pelo desvio padrão do intercepto e  $S$  pelo coeficiente angular da curva analítica (INMETRO, 2010; RIBANI et al. 2004)

### 2.7.3 Faixa de trabalho (linearidade)

A faixa linear de trabalho ou linearidade é o intervalo de concentração proposto no método analítico, representado através de uma curva analítica, capaz de fornecer resultados com um valor aceitável de incerteza. O limite inferior da faixa linear de trabalho é determinado pelo LOQ e o limite superior é definido por concentrações, em que, a linearidade do método não é comprometida (EURACHEM, 2014). Considera-se que a linearidade foi

comprometida quando há um desvio superior a 5% em relação ao demais ponto da curva (SKOOG; HOLLER, 2006).

Semelhantemente ao LOD, a faixa linear de trabalho também pode ser determinada para o método analítico em desenvolvimento assim como para o instrumento analítico utilizado. A faixa linear de trabalho do método é determinada segundo a concentração de um analito em amostras laboratoriais em função da concentração do mesmo em amostras teste e a faixa linear de trabalho para o instrumento é obtida em termos de uma amostra teste de concentração conhecida em função do sinal apresentado pelo equipamento (EURACHEM, 2014).

#### **2.7.4 Sensibilidade analítica**

A sensibilidade analítica é definida como a mudança na resposta do instrumento que corresponde a mudança na quantidade medida, isto é, o gradiente da resposta ao longo da curva analítica do método desenvolvido (EURACHEM, 2014).

#### **2.7.5 Exatidão**

A veracidade, por definição, corresponde a determinação de um número infinito de resultados gerados pelo método analítico desenvolvido capaz de gerar um valor de referência. Como a obtenção de um número infinito de resultados através do método analítico é inviável e impossível, a exatidão do método não pode ser determinada. No entanto, a avaliação prática da veracidade é realizada em termos do viés de um conjunto de dados finito. Essa avaliação consiste na comparação do método desenvolvido com um método de referência adequado que pode ser realizado por: análise de materiais de referência, testes de recuperação utilizando amostras enriquecidas e comparação com resultados obtidos com outros métodos (EURACHEM, 2014).

A comparação entre os métodos pode ser realizada por testes de recuperação, determinada segundo a Equação (19).

$$R(\%) = \frac{x_{médio}}{x_{ref}} \times 100 \quad (19)$$

em que  $x_{médio}$  é o valor médio das respostas obtidas e  $x_{ref}$  é o valor de referência, esperado para aquele conjunto de experimentos.

#### **2.7.6 Precisão**

Ao desenvolver um método analítico, a replicação dos resultados é fundamental para que as estimativas das características de desempenho sejam confiáveis. Os testes que buscam

avaliar a replicação do método devem considerar todas as variações de condições experimentais encontradas durante o uso rotineiro do mesmo. Nesse sentido a precisão é o parâmetro analítico, que por definição, reporta a medida do quão próximo os resultados obtidos são um do outro. Ela é expressa através de parâmetros estatísticos que descrevem a disseminação dos resultados através do desvio padrão, que pode ser obtido através de medições repetidas adequadamente em condições específicas (EURACHEM, 2014).

A precisão encontra-se como um intermediário entre a repetibilidade, que avalia a variabilidade dos resultados de medição do método analítico quando um único analista opera o equipamento ao longo de um curto período de tempo, e a reprodutibilidade que avalia a variabilidade dos resultados entre laboratórios. Assim o objetivo da precisão é obter uma estimativa, capaz de incluir as fontes de variação provenientes de um laboratório sob as condições rotineiras de análise, com diferentes analistas, longos tempos de análise e com diferentes de equipamentos (EURACHEM, 2014).

Em alguns casos, a precisão não pode ser avaliada em diferentes laboratórios, nesse sentido, a precisão intermediária, descritas pela ISO 5725-3 estabelece diretrizes para que a validação do método em um mesmo laboratório seja coerente (EURACHEM, 2014).

Os ensaios de precisão podem ser avaliados por análise de variância (ANOVA), que tem como princípio comparar variações que ocorrem em um grupo (níveis de fatores). A análise dos dados pode apresentar uma hipótese nula ( $H_0$ ), que indica que não houve variação significativa entre os grupos, ou uma hipótese alternativa ( $H_a$ ), que indica varrições entre eles. O teste estatístico usado pela ANOVA é o teste-F, que consiste em comparar o valor de F ( $F_{\text{calculado}}$ ) com um valor de F tabelado ( $F_{\text{crítico}}$ ) ou através do valor de probabilidade (valor-p), de acordo com o nível de significância ( $\alpha$ ) adotado. Ambos as formas de análise direciona para rejeitar ou não a  $H_0$  em favor da  $H_a$  (EURACHEM, 2014; SKOOG; HOLLER, 2006).

### **2.7.7 Incerteza de medição**

A incerteza está relacionada a um resultado de medição, capaz de expressar uma faixa de valores que pode ser atribuídos a quantidade que está sendo medida. Ao se estimar a incerteza de uma quantidade medida, todos os processos operacionais realizados, devem ser levados em conta, sendo estes combinados de acordo com procedimentos bem estabelecidos. Inúmeras abordagens são descritas na determinação da incerteza em métodos químicos que levam em conta: a precisão global ao longo do método, incertezas provenientes dos métodos de referência, calibração de equipamentos e quaisquer outros fatores que levam a desvios dos valores verdadeiros de medida (EURACHEM, 2014).

### 2.7.8 Robustez

A robustez é a habilidade de um método analítico não ser afetado por pequenas e deliberadas variações em seus fatores. Ela fornece ao analista uma indicação da confiabilidade do método seu uso (EURACHEM, 2014). Um método é dito robusto quando se revela insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando em execução (BRASIL, 2011).

No desenvolvimento de qualquer método analítico, certas etapas exigem cuidados para que não ocorra o comprometimento de seu funcionamento. Assim, essas etapas devem ser identificadas e suas influências no desempenho do método avaliado por meio de um teste de robustez. Tal teste é realizado através de mudanças no método desenvolvido, buscando identificar as variáveis com efeitos mais significativos. Assim, durante a execução das etapas críticas do método há de se ter mais precaução, garantindo melhorias ao método desenvolvido (EURACHEM, 2014).

## 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELHAMID, H. N.; BHAISSARE, M. L.; WU, H. F. Ceria nanocubic-ultrasonication assisted dispersive liquid-liquid microextraction coupled with matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for pathogenic bacteria analysis. **Talanta**, 120, p. 208-217, 2014.

ARAIN, S. A.; KAZI, T. G.; AFRIDI, H. I.; ARAIN, M. S. *et al.* A new dispersive liquid-liquid microextraction using ionic liquid based microemulsion coupled with cloud point extraction for determination of copper in serum and water samples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 126, p. 186-192, 2016.

BEZERRA, M. A.; DOS SANTOS, Q. O.; SANTOS, A. G.; NOVAES, C. G. Simplex optimization: A tutorial approach and recent applications in analytical chemistry. **Microchemical Journal**, 124, p. 45-54, 2016/01/01/ 2016.

BORGES, K. B.; FIGUEIREDO, E. C. D.; QUEIROZ, M. E. C. **Preparo de amostras para análises de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: 2015. (LTC).

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Manual de garantia da qualidade analítica**. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília: MAPA/ACS 2011.

BRUM, S., A. A.; ARRUDA, L. F.; ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias primas de origem vegetal animal. **Química Nova**. 32: 849-854 p. 2009

CALDAS, S. S.; GONÇALVES, F. F. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**. 34: 1604-1611 p. 2011.

CAMPILLO, N.; VINAS, P.; SANDREJOVA, J.; ANDRUCH, V. Ten years of dispersive liquid-liquid microextraction and derived techniques. **Applied Spectroscopy Reviews**, 52, n. 4, p. 267-415, 2017.

CAMPONE, L.; PICCINELLI, A. L.; CELANO, R.; RASTRELLI, L. pH-controlled dispersive liquid-liquid microextraction for the analysis of ionisable compounds in complex matrices: Case study of ochratoxin A in cereals. **Analytica Chimica Acta**, 754, p. 61-66, Nov 2012.

CARMO, M. C. N. S.; CORREIA, M. I. T. D. The role of Omega-3 Fatty Acid in Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 279, p. 279-287 2009.

CARRASCO-CORREA, E. J.; VELA-SORIA, F.; BALLESTEROS, O.; RAMIS-RAMOS, G. Sensitive determination of parabens in human urine and serum using methacrylate monoliths and reversed-phase capillary liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1379, p. 65-73, 2015.

CELANO, R.; PICCINELLI, A. L.; CAMPONE, L.; RUSSO, M. Determination of selected pyrrolizidine alkaloids in honey by dispersive liquid-liquid microextraction and ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 67, n. 31, p. 8689-8699, 2019

CHALUPA, W.; VECCHIARELLI, B.; ELSER, A. E.; KRONFELD, D. S. *et al.* Ruminant Fermentation In Vivo as Influenced by Long-Chain Fatty Acids. **Journal of Dairy Science**, 69, n. 5, p. 1293-1301, 1986.

CHEN, P.-S.; CHENG, Y.-H.; LIN, S.-Y.; CHANG, S. Y. Determination of immunosuppressive drugs in human urine and serum by surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry with dispersive liquid-liquid microextraction. **Anal. Bioanal. Chem.**, 408, n. 2, p. 629-637, 2016.

CHENG, Y. H.; CHEN, W. C.; CHANG, S. Y. Rapid determination of rivaroxaban in human urine and serum using colloidal palladium surface-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, 29, n. 21, p. 1977-1983, 2015.

CORNELL, J. *Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data.* Wiley: Wiley Series in Probability and Statistics 2011.

DE BOECK, M.; MOREELS, L.; DEHAEN, W.; TYTGAT, J. Evaluation of the suitability of ionic liquid-based liquid-liquid microextractions for blood protein removal. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 164, p. 57-61, 2019.

DUTRA, P. A.; PINTO, L. F. B.; CARDOSO NETO, B. M.; GOBIKRUSHANTH. Flaxseed improves embryo production in Boer goats. **Theriogenology**, 127, p. 26-31, 2019.

EURACHEM, W. G. **The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.** 2nd ed. 2014.

FDA. **U.S. Food and Drug Administration. Transdermal drug.**, 2019. Disponível em: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/022699.txt>. Acesso em: 05/05/2019.

FIGUEIREDO, I. L.; CLAUS, T.; OLIVEIRA SANTOS JÚNIOR, O.; ALMEIDA, V. C. Fast derivatization of fatty acids in different meat samples for gas chromatography analysis. **Journal of Chromatography A**, 1456, p. 235-241, 2016.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissueS. **Journal of Biological Chemistry**, 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FUKASAWA, K.; NAKAJIMA, S.; GOTOH, M.; TANAKA, S.. Qualitative and quantitative comparison of cyclic phosphatidic acid and its related lipid species in rat serum using hydrophilic

interaction liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1567, p. 177-184, Sep 2018.

GONG, A.; ZHU, X. Miniaturized ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in a coupled-syringe system combined with UV for extraction and determination of danazol in danazol capsule and mice serum. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 159, p. 163-168, 2016.

GREGORY, R. M. E. A. Ácidos Graxos Poliinsaturados E Seus Efeitos No Desempenho Reprodutivo Da Vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**: 153–156 p. 2009.

HARRYS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 9 ed. Rio de Janeiro: 2017. (LTC).

HAYAMA, T.; YABUUCHI, Y.; IWAMATSU, T.; TAMASHIMA, E. Concerted derivatization and concentration method with dispersive liquid-liquid microextraction for liquid chromatographic analysis of 5-hydroxyindoles in human serum. **Talanta**, 117, p. 27-31, 2013.

HE, Y.; CONCHEIRO-GUISAN, M. Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. **Biomedical Chromatography**, 33, n. 1, Jan 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA (INMETRO). **Orientação de métodos de ensaios químicos DOQ-CGCRE-008**, Rio de Janeiro, 2010. 35 p.

JENKINS, T. C. Lipid metabolism in the rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 12, p. 3851-3863, 1993.

JENKINS, T. C. et al. Board-invited review: Recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 86, n. 2, p. 397-412, 2008.

JENKINS, T. C. et al. Managing milk fat depression: Interactions of ionophores, fat supplements, and other risk factors. In: Proceeding 20 TH Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. Gainesville, Florida. 2009.

JENKINS, T. C.; HARVATINE, K. J. Lipid Feeding and Milk Fat Depression. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, 30, n. 3, p. 623-642, 2014.

KARAMI-OSBOO, R.; MAHAM, M. Pre-concentration and Extraction of Aflatoxins from Rice Using Air-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. **Food Analytical Methods**, 11, n. 10, p. 2816-2821, 2018.

KHAN, N.; KAZI, T. G.; AFRIDI, H. I.; ARAIN, M. B. Determination of Cadmium in Human Serum and Blood Samples after Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Using a Task-Specific Ionic Liquid. **Analytical Letters**, 51, n. 5, p. 673-685, 2018.

KISSOUDI, M.; SAMANIDOU, V. Recent Advances in Applications of Ionic Liquids in Miniaturized Microextraction Techniques. **Molecules**, 23, n. 6, 2018.

KOZLOSKI, G. V. **Bioquímicos ruminantes**. 1 ed. Editora da UFSM 2002.

KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, G. S.; RAWAL, R. K. Chemometrics tools used in analytical chemistry: An overview. **Talanta**, 123, p. 186-199, 2014.

- LEE, J. Y.; WANG, H.; PYRGIOTAKIS, G.; DELOID, G. M. Analysis of lipid adsorption on nanoparticles by nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 410, n. 24, p. 6155-6164, 2018.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. Tradução de W. R. Loodi e A. A. Simões. 4 ed. São Paulo: 2006.
- LORD, H.; PAWLISZYN, J. Microextraction of drugs. **Journal of Chromatography A**, 902, n. 1, p. 17-63, Dec 2000.
- MANSOUR, F. R.; DANIELSON, N. D. Solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction as a green analytical tool. **Talanta**, 170, p. 22-35, 2017.
- MANSOUR, F. R.; KHAIRY, M. A. Pharmaceutical and biomedical applications of dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 1061, p. 382-391, 2017.
- MARTIN, C. A. E. A. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: Importância e ocorrência em alimentos.: **Revista de Nutrição**. 19: 761-770 p. 2006.
- MATTOS, R.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. **Reviews of Reproduction**, 5, n. 1, p. 38-45, 2000.
- MOLLAHOSSEINI, A.; KAMANESH, M.; MOHAMMADI, A. Central composite design for dispersive liquid-liquid microextraction of 25-hydroxy-cholecalciferol in human serum. **Journal of Chromatographic Science**, 57, n. 6, p. 575-581, 2019.
- MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. **Química Orgânica. 13 ed.** Lisboa: Calouste Gulbenkian: 1996.
- NETO, B. D. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Editoras da Unicamp - Campinas, SP. 2001.
- NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. National Research Council. Washington, DC: National Academy Press, 2001.
- NUNES, C. A.; FREITAS, M. P.; PINHEIRO, A. C. M.; BASTOS, S. C. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 23, n. 11, p. 2003-2010, 2012-11-30 2012.
- OVERTON, T. R.; WALDRON, M. R. Nutritional management of transition dairy cows: Strategies to optimize metabolic health. **Journal of Dairy Science**, 87, n. SUPPL. 1, p. E105-E119, 2004.
- PELLEGRINO, R. M.; DI VEROLI, A.; VALERI, A.; GORACCI, L. LC/MS lipid profiling from human serum: A new method for global lipid extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 406, n. 30, p. 7937-7948, 2014.
- PERINI, J. A. D. L. E. A. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. 23: 1075-1086 p. 2010.
- RAHMANI, M.; KAYKHAI, M.; SAFARI, Z.; ANSARI, O. Comparison of Air-Assisted, Vortex-Assisted and Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for the Determination of BTEX Compounds in Water Samples Prior to GC-FID Analysis. **Chromatographia**, 80, n. 1, p. 109-117, 2017.

REZAEI, M.; ASSADI, Y.; HOSSEINIA, M. R. M.; AGHAEI, E. *et al.* Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, 1116, n. 1-2, p. 1-9, May 2006. Article.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, 1217, n. 16, p. 2342-2357, 2010.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 771-780, Sep./Oct. 2004.

SAFAVI, A.; MALEKI, N.; ALIZADEH, S.; FARJAMI, F. Development of an ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction combined with graphite furnace atomic absorption spectrometry method for highly selective and sensitive determination of copper. **Sensor Letters**, 14, n. 8, p. 769-774, 2016.

SAFDARIAN, M.; HASHEMI, P.; NADERLOU, M. In-line cold column trapping of organic phase in dispersive liquid-liquid microextraction: Enrichment and determination of curcumin in human serum. **Journal of Chromatography A**, 1244, p. 14-19, 2012.

SAJID, M. Dispersive liquid-liquid microextraction coupled with derivatization: A review of different modes, applications, and green aspects. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, 106, p. 169-182, Sep 2018.

SANTOS, J. E. P.; BILBY, T. R.; THATCHER, W. W.; STAPLES, C. R. Long Chain Fatty Acids of Diet as Factors Influencing Reproduction in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, 43, n. SUPPL.2, p. 23-30, 2008.

SARAFIAN, M. H.; GAUDIN, M.; LEWIS, M. R.; MARTIN, F. P. Objective set of criteria for optimization of sample preparation procedures for ultra-high throughput untargeted blood plasma lipid profiling by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, 86, n. 12, p. 5766-5774, 2014.

SARAFRAZ, Y. E. A. Liquid-phase microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**. 29: 1-14 p. 2010.

SHAMSIPUR, M.; JOUYBARI, T. A.; BARATI, A.; MAHMOUDI, M. A manual shaking-enhanced, ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of betamethasone and dexamethasone: optimization using Response surface methodology. **Analytical Methods**, 6, n. 13, p. 4542-4550, 2014.

SKOOG, W.; HOLLER, C. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana ed. São Paulo-SP: 2006.

SOLOMONS; W., T.; FRYLHE, C. B. **Química Orgânica**. 8 ed. Rio de Janeiro.: 2005.

SZYMANSKA, E. Modern data science for analytical chemical data - A comprehensive review. **Analytica Chimica Acta**, 1028, p. 1-10, Oct 2018.

TANG, S.; ZHANG, H.; LEE, H. K. Advances in Sample Extraction. **Analytical Chemistry**. 88: 228-249 p. 2016.

TANG, Y. Q.; WENG, N. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. **Bioanalysis**. 2 2013.

TRUJILLO-RODRIGUEZ, M. J.; ROCIO-BAUTISTA, P.; PINO, V.; AFONSO, A. M. Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, 51, p. 87-106, 2013.

VELA-SORIA, F.; BALLESTEROS, O.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; BALLESTEROS, L. A new method for the determination of benzophenone-UV filters in human serum samples by dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Talanta**, 121, p. 97-104, 2014.

VESSMAN, J.; STEFAN, R. I.; VAN STADEN, J. F.; DANZER, K. Selectivity in analytical chemistry - (IUPAC Recommendations 2001). **Pure and Applied Chemistry**, 73, n. 8, p. 1381-1386, 2001.

VIÑAS, P.; CAMPILLO, N.; LÓPEZ-GARCÍA, I.; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, M. Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. A critical review Microextraction Techniques. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 406, n. 8, p. 2067-2099, 2014.

WANG, D. D.; HU, F. B. Dietary Fat and Risk of Cardiovascular Disease: Recent Controversies and Advances. **Annual Review of Nutrition**, Vol 37, 37, p. 423-446, 2017.

WANG, J. H.; SONG, M. K.; SON, Y. S.; CHANG, M. B. Addition effect of seed-associated or free linseed oil on the formation of cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid and octadecenoic acid by ruminal bacteria in vitro. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, 15, n. 8, p. 1115-1120, 2002.

WOLF, C.; ULBRICH, S. E.; KREUZER, M.; BERARD, J. Differential partitioning of rumen-protected n-3 and n-6 fatty acids into muscles with different metabolism. **Meat Science**, 137, p. 106-113, 2018.

YANG, Y.; LIU, Z. H.; CHEN, H.; LI, S. Q. Low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by HPLC-ICP-MS for speciation analysis of phenylarsenics in lake water. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, 99, n. 1, p. 87-100, 2019.

YANTING, C.; MA, G.; HARRISON, J. H.; BLOCK, E. Effect of stearic or oleic acid on milk performance and energy partitioning when fed in diets with low and high rumen-active unsaturated fatty acids in early lactation. **Journal of Animal Science**, 97, n. 11, p. 4647-4656, 2019.

ZANG, X. H.; ZHANG, G. J.; WANG, C.; WANG, Z. Recent developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. **Chinese Journal of Chromatography**, 33, n. 2, p. 103-111, 2015.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

### ARTIGO 1

#### **MOORE-PENROSE INVERSE GENERALIZED SCREENING MIXTURE DESIGN APPLIED IN LOW-DENSITY DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION**

Matheus Julien Ferreira Bazzana<sup>1</sup>, Adelir Aparecida Saczk<sup>1</sup>, Letícia Rodrigues Faria<sup>2</sup>, João Pedro Campos<sup>2</sup>, Nadja Gomes Alves<sup>2</sup>, Cleber Nogueira Borges<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras – MG, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 – MG, Brasil

\*Corresponding author. Tel: +55 35 3829 9794

*Email:* cleber.borges@ufla.br (BORGES, C. N.)

In this paper, we propose the application of Moore-Penrose generalized inverse in order to determine Scheffé full cubic model, and concurrently determine the three coefficients  $d_{ij}$ . The previously determined model has allowed the chemical interpretation of Scheffé's mixture model, making it possible to optimize the LD-DLLME extraction technique in order to determine linoleic acid in sheep serum samples.

## **ABSTRACT**

The modification in the nutritional composition of the ruminant diet causes meaningful alterations in the fatty acids (FAs) structure supplemented due to the action of rumen microorganisms. The modification in the FAs structure alters the role which these play in the ruminant metabolism. The Folch method (1957) is the most often used to determine fatty acids in these animals' tissues and presents certain disadvantages such as the great volume of solvent and low mass transfer from the analyte to the extracting phase. Thus, we tested the LD-DLLME as an alternative method to determine these substances. In this paper, we used a simplex-augmented mixture design – to which we applied Scheffé's polynomial in modeling, and we used Moore-Penrose generalized matrix inverse due to the possibility of concurrently determining value estimates of coefficients of the parameters which represent cubic terms – allowing the chemical interpretation of the LD-DLLME best extraction condition for linoleic acid in ruminant serum samples.

**Keywords:** mixture design, miniaturized technique, linoleic acid, ruminants, blood serum.

## **1. INTRODUCTION**

The modification in the eating practices of ruminants, such as cattle and sheep, allows great alterations in the composition of nutrients in these animals' organisms due to the rumen microbial action<sup>1;2</sup>. Fatty acids are the substances which suffer most modifications in their structure due to the action of these microorganisms. The linoleic acid (LA) is an example which, when submitted to a rumen microbial action mechanism, originates positional isomers, which do not produce the same effect in the development of oocytes and embryos<sup>3</sup>. Recording and assessing the effects of nutritional modifications in this substance profile for each animal is complicated and expensive, which allows the development of alternative analytical methods<sup>4</sup>.

The fatty acid extraction and purification are traditionally carried out through the Folch method (1957)<sup>5</sup>, which, despite widely used, has disadvantages such as low transfer rate from the sample analytes, long extraction time and high organic solvent consumption<sup>6</sup>. In this sense, the liquid phase microextraction techniques (LPME) are alternative pretreatment methods which are simple, easy to perform, and sensitive to analytepreconcentration<sup>7</sup>.

Among the LPME techniques, low density dispersive liquid-liquid microextraction (LD-DLLME) is an alternative technique derived from dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), which presents advantages such as its fast execution, low cost, high enrichment values, simple operation and

environmental viability <sup>8</sup>. It comprehends a ternary solvent mixture with the potential to nonpolar substance extraction.

In chemical systems involving mixtures, Cornell (2011)<sup>9</sup> determines that the experimentally obtained response depends on the proportions between the mixture components and not on the amount which the mixture presents itself as. One of the most adopted mathematical models for chemical mixture modeling is Scheffé's canonical polynomial model.

Despite being convenient for response surface interpretations, Scheffé polynomial model presents a few inconveniences, such as loss of direct interpretation of model parameter coefficients, corresponding one-to-one to the mixture components. In mathematical terms, Scheffé's model introduces interdependence between all the parameters. This implies that, in full cubic models, the coefficients  $d_{ij}$  cannot be simultaneously determined.

In order to determine a solution that better fits a system of linear equations, Moore-Penrose generalized inverse can be used to calculate a single solution <sup>10</sup>.

This way, the aim of the paper is using Moore-Penrose generalized matrix inverse to obtain simultaneously the best estimate of all coefficients  $d_{ij}$ , by means of response surfaces (models). The coefficient estimate will help with the chemical interpretations of a mixture system developed to optimize LD-DLLME applied in serum samples of ruminants which had their diet modified with linoleic acid supplementation.

## 2. THEORY AND METHOD

### 2.1 Chemical System of Mixture Variables

The main characteristics of a ternary chemical mixture system are: the sum of mixture variables ( $x_i$ ) representing the chemical compounds constituted in this mixture must be equal to 1 (or 100%); the value of each individual component must be in the range of 0 and 1 (or of 0 and 100%) <sup>11,12</sup>. The equations 1 and 2 represent, in mathematical terms, these characteristics:

$$\sum_{i=1}^{n=3} x_i = 1 = 100\% \quad (1)$$

$$0 < x_i < 1 \text{ or } 100\% \quad (2)$$

Thus, the chemical mixture system domain corresponds to a simplex space, so denominated by mathematical terminology.

### 1.1 Scheffé Mixture Model

Scheffé's canonical polynomial model is one the most often used for mixture modeling. Equation 3 represents Scheffé cubic model for a ternary system.

$$y_i = \sum_{i=1}^{n=3} b_i \cdot x_i + \sum_{i=1}^{n=3} \sum_{j>i}^{n=3} b_{ij} \cdot x_i \cdot x_j + b_{123} \cdot x_1 \cdot x_2 \cdot x_3 + \sum_{i=1}^{n=3} \sum_{j>i}^{n=3} d_{ij} \cdot x_i \cdot x_j \cdot (x_i - x_j) \quad (3)$$

Scheffé's canonical model reparametrizes the ordinary polynomial model to explicitly place all the mixture components represented as parameters of the model, thus, making it convenient for interpretations in chemical terms <sup>9</sup>.

The restrictions presented in Equations 1 and 2 imply that a given response ( $y_i$ ), modeled in function of the mixture components ( $x_i$ ), cannot be attributed to a single component in dealing with binary or ternary mixtures. That is, the response ( $y_i$ ) is intrinsically determined by the composition as a whole, or yet, in mathematical terms, the restrictions impose a linear dependence between the variables.

Scheffé polynomial model does not have the intercept (differently from conventional experiment designs). The information which this constant term would describe is implicitly redirected to other terms in the mixture components and consequently cannot be interpreted as additional effects to a constant mean value. This model does not remove the collinearities between the  $x_i$  variables. Scheffé's model can satisfactorily represent surfaces which do not contain very rugous topology all over the domain and, if this complexity exists on the surface, the prediction values can present considerable residues. Even so, Scheffé's model is a useful and convenient approximation for chemical product interpretation.

Scheffé's model terms capture surface details which can be interpreted as information on the interactions between the components of the investigated mixtures. The coefficient interpretation is as follows <sup>9</sup>:

- $b_i$ : indicates the surface positioning (height), that is, it is the expected responses for the pure components ( $x_i$ );
- $b_{ij}$ : binary terms indicate if curvatures are present on the edges, indicating synergy or antagonism between  $x_i$  and  $x_j$ ;
- $b_{123}$ : the coefficient value for the special cubic term can indicate if there is curvature in the centroid (points inside the surface);
- $d_{ij}$ : the full cubic indicates the present inflexion in the edges between the components  $x_i$  and  $x_j$ .

## 1.2 Singularity in Mixture Design

The experimental design and the experimental responses (chromatographic peak areas) are presented in Table 1.

**Table 1** Experimental Design (mixture proportions), pseudomixtures e LD-DLLME technique experimental response

N°	$z_1$ (%)	$z_2$ (%)	$z_3$ (%)	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$y$ (u.a)
1	80	10	10	1.00	0.00	0.00	631
2	42	48	10	0.00	1.00	0.00	622
3	57	10	33	0.00	0.00	1.00	2544
4	61	29	10	0.50	0.50	0.00	2224
5	68.5	10	21.5	0.50	0.00	0.50	1652
6	49.5	29	21.5	0.00	0.50	0.50	3539
7	59.67	22.67	17.67	0.33	0.33	0.33	4056;2863
8	69.83	16.33	13.83	0.66	0.17	0.17	4773;4037
9	50.83	35.33	13.83	0.17	0.66	0.17	4127;4093
10	58.33	16.33	25.34	0.17	0.17	0.66	7910;7470

$z_1$  = Magnesium chloride aqueous saline solution 0.017% (m/v);  $z_2$  = Toluene;  $z_3$  = Methanol;  $x_1, x_2$  and  $x_3$  = pseudomixtures which codify  $z_1, z_2$  and  $z_3$ ;  $y$  = chromatographic peak areas

The model expressed in matrix form by Equation 3 is presented in Table 2.

**Table 2** Matrix representation of terms (contrasts) of Scheffé full cubic model

$l_1$	$l_2$	$l_3$	$l_{12}$	$l_{13}$	$l_{23}$	$l_{123}$	$q_{12}$	$q_{13}$	$q_{23}$
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
1/2	1/2	0	1/4	0	0	0	0	0	0
1/2	0	1/2	0	1/4	0	0	0	0	0
0	1/2	1/2	0	0	1/4	0	0	0	0
1/3	1/3	1/3	1/9	1/9	1/9	1/27	0	0	0
4/6	1/6	1/6	1/36	1/9	1/9	1/54	1/18	1/18	0
1/6	4/6	1/6	1/9	1/36	1/9	1/54	-1/18	0	1/18
1/6	1/6	4/6	1/9	1/9	1/36	1/54	0	-1/18	-1/18

$l_1=x_1$ ;  $l_2=x_2$ ;  $l_3=x_3$ ;  $l_{12}=x_1 \cdot x_2$ ;  $l_{13}=x_1 \cdot x_3$ ;  $l_{23}=x_1 \cdot x_2 \cdot x_3$ ;  $q_{12}=x_1 \cdot x_2 \cdot (x_1 - x_2)$ ;  $q_{13}=x_1 \cdot x_3 \cdot (x_1 - x_3)$  and  $q_{23}=x_2 \cdot x_3 \cdot (x_2 - x_3)$

The coefficient value estimates of all these parameters cannot be determined by Ordinary Least Squares (OLS), implemented in a conventional way, given the interdependence (collinearity) between the  $x_i$  components. Specifically, the model (Equation 3) coefficients ( $d_{ij}$ ), which multiply the parameters named as full cubic (according to terminology used by Scheffé and described by the contrasts in the last three columns in Table 2), cannot be concurrently determined<sup>9</sup>, because, in accordance with Equations 4, 5 and 6:

$$\mathbf{D} = [\mathbf{q}_{12} \quad \mathbf{q}_{13} \quad \mathbf{q}_{23}] \tag{4}$$

$$\det(D^+ D) = 0 \tag{5}$$

$$\kappa(D^+D) \approx +\text{Inf} \quad (6)$$

that is, the crossed product determinant value in matrix D, formed by all full cubic terms, is 0 exactly (as seen in the lines and columns numbered from 8 to 10 in Table 2).

In mathematical terms, we can say that it is a singular matrix, that is, not invertible. Likewise, the condition number  $\kappa$  (which is virtually equal to +Inf, except for errors in arithmetic approximations in fluctuating point operations) informs that the matrix is poorly conditioned. If this matrix is a linear system representation, we consider that there may possibly be infinite solutions. That said, the OLS method does not apply to these cases. This implies that the coefficients  $d_{ij}$  cannot be concurrently defined.

### 1.3 Least squares via Moore-Penrose generalized matrix inverse

In order to go around this restriction established in the previously presented item, a possible alternative would be using Moore-Penrose generalized matrix inverse to implement the least square solution <sup>10</sup>. The application of Moore-Penrose inverse considers a linear system <sup>13</sup>, as presented in Equations 7, 8 and 9:

$$y = M \cdot b + \varepsilon \quad (7)$$

$$b = M^+ \cdot y + \tau \quad (8)$$

$$\tau = [I - M^+ \cdot M] \cdot \omega \quad (9)$$

In which:

- $y$ : is a matrix column with the responses;
- $M$ : is the matrix representation of Scheffé full cubic model;
- $b$ : is the vector containing the coefficient values of Scheffé model parameters;
- $\varepsilon$ : is the residual component not explained by the model;
- $I$ : is the identity matrix;
- $M^+$ : is Moore-Penrose generalized matrix inverse (the superscript + shows this specification);

- $\omega$ : is an arbitrary vector (which indicates the possibility of an infinite number of equivalent solutions for the linear system).

A possible implementation for obtaining Moore-Penrose matrix inverse is by using Singular Value Decomposition (SVD) in matrix  $M$  (which represents Sheffé's model in matrix form) according to Equations 10 and 11:

$$M = U \Sigma V^T \quad (10)$$

$$M = V \Sigma^+ U^T \quad (11)$$

where:

- $U$  e  $V$ : are the singular vector matrixes on the left and singular vectors on the right, respectively;
- $\Sigma$ : is a rectangular diagonal matrix with real non-negative numbers in the diagonal, called by singular values;
- $\Sigma^+$ : has its elements in the diagonal, being the reciprocal of the elements in the diagonal  $\Sigma$ .

With this solution, we find it possible to obtain the best approximation for all estimates of coefficient values for the represented parameters, vector  $\mathbf{b}^{10}$ . And, by extension, it has the most convenient interpretations from a point of view in Chemistry, since the coefficients  $d_{ij}$  can be, at least approximately, concurrently estimated.

## 1.4 Data source

### 1.4.1 Experimental Responses

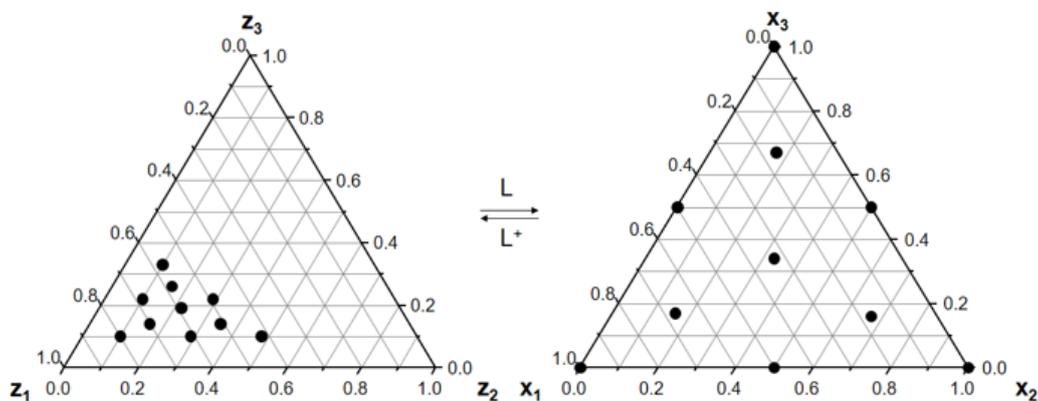
The experimental responses used in this study, shown in Table 1, are the chromatographic peak areas ( $y$ ) of a linoleic acid extraction method optimization in ruminant serum samples using Low-Density Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (LD-DLLME). The serum samples used were obtained from lambs supplemented with lipids. We submitted these samples to the LD-DLLME process, seeking a better proportion of each solvent used in the linoleic acid extraction, and so they are  $z_1$

(magnesium chloride saline aqueous solution 0.017% m/v),  $z_2$  (toluene) and  $z_3$  (methanol). The obtained extracts were analyzed in gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID).

### 1.4.2 Experimental Design

The determination of the experimental analysis conditions of the LD-DLLME technique for the extraction of linoleic acid from ruminant serum was investigated by means of a previous experimental screening, which directed the analysis conditions for a more restricted chemical space in the extraction process optimization.

In the optimization, the proportions of components  $z_1$ ,  $z_2$  and  $z_3$  were varied 80 – 42%, 48 – 10% and 33 – 10%, respectively. Once the proposed experimental domain does not allow pure solvent conditions or binary mixtures, the chemical space which comprehends the proportions  $z_1$ ,  $z_2$  and  $z_3$  was codified in a pseudomixture space  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  (Figure 1). The established extraction conditions for the optimization are presented in Table 1. The proposed experiments in the optimization were carried out in a random order so that we could minimize tendencies of the LD-DLLME process.



**Figure 1** Chemical mixture composition and pseudo mixture representations in ternary diagrams  $z_1$  = Magnesium chloride aqueous saline solution 0.017% (m/v);  $z_2$  = Toluene;  $z_3$  = Methanol;  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  = pseudo mixtures which codify  $z_1$ ,  $z_2$  and  $z_3$ .

### 1.5 Extraction Method

The LD-DLLME is a miniaturized technique derived from dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), in which the extracting solvent is dispersed in the aqueous sample using a dispersing

solvent, which promotes the formation of extraction solvent thin droplets and which consequently acquires an elevated superficial area. In this sense, the analyte mass transfer to the extraction phase is enhanced, which makes the DLLME faster than the other liquid-liquid extraction (LLE) techniques <sup>14</sup>. Differently from DLLME, the extraction solvent used in LD-DLLME has a smaller density than pure water, which makes it possible to collect easily from the extraction phase in the upper part of the extraction system.

In the proposed system for the LD-DLLME process optimization, the components  $x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$  that codify  $z_1$ ,  $z_2$  and  $z_3$  represent, in the extraction system:

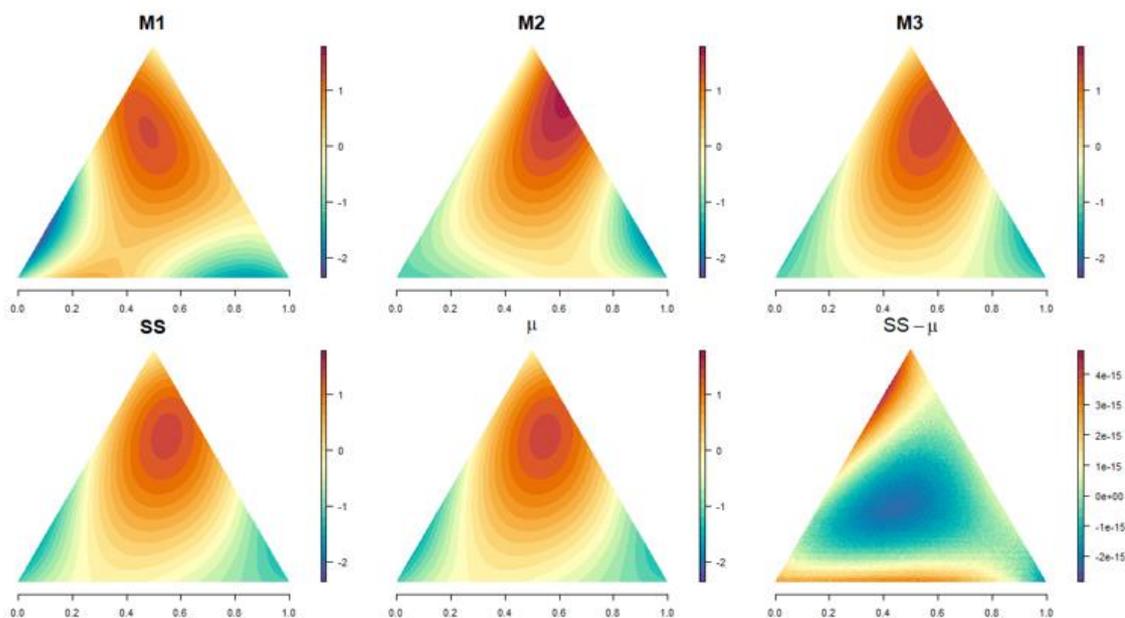
- $x_1$ : dispersion medium in the sample (saline solution);
- $x_2$ : extraction solvent (toluene);
- $x_3$ : dispersing solvent (methanol).

In the proposed procedure, 100  $\mu$ L of a ruminant blood serum sample were used and the system total volume is equivalent to 3.0 mL. The composition of the mixtures assessed for the linoleic acid extraction from the samples are shown in Table 1.

## **2 RESULTS AND DISCUSSION**

### **2.1 Scheffé's Supersaturated Method**

The obtained polynomial models were named M1, M2, M3, Supersaturated (SS),  $\mu$  and SS –  $\mu$ , and are presented in Figure 2.



**Figure 2** Graphic representation of models. M1: model with terms  $d_{12}$  and  $d_{13}$ ; M2: models with terms  $d_{12}$  and  $d_{23}$  M3: model with terms  $d_{13}$  and  $d_{23}$  SS: Scheffé Supersaturated model;  $\mu$ : arithmetic mean of the three models ( $M1 + M2 + M3/3$ ).

Once the coefficients  $d_{ij}$  for the Scheffé full cubic model cannot be simultaneously determined, as previously shown, the model M1 is composed solely by coefficients  $d_{12} - d_{23}$ . Likewise, models M2 and M3 are composed of coefficients  $d_{12} - d_{23}$  and  $d_{13} - d_{23}$ , respectively.

The application of Moore-Penrose generalized matrix inverse through SVD is presented by the SS model, in which the information of terms  $d_{12}$ ,  $d_{13}$  and  $d_{23}$  are concurrently represented. The graphic representation with the three coefficients brings a region into evidence and well outlined in the pseudomixture system, which makes chemical interpretations easier in the proposed system for LD-DLLME.

The mean surface,  $\mu$ , and the linear combination of surfaces M1, M2 and M3 are represented in Figure 2, proving that the Moore-Penrose generalized inverse can be applied in the solution of these types of system which have linear interdependence (once the difference between SS and  $\mu$  is 0, according to the model  $SS - \mu$  (Figure 2)).

## 2.2 Chemical Assessment

Assessing the ternary diagram SS, shown in Figure 2, we can observe a region of more intense coloring located in the upper part on the left of the diagram. In the pseudo mixture system codified in

$x_1$ ,  $x_2$  and  $x_3$ , this region indicates that component  $x_3$  exerts the greatest influence in the linoleic acid extraction from the sheep serum samples, followed by components  $x_2$  and  $x_1$ .

According to the LD-DLLME extraction principles, the results found are coherent. The proportion between the components  $x_3$  ( $z_3$  = methanol) and  $x_2$  ( $z_2$  = toluene) is approximately 2:1 respectively, which befits the assessed extraction technique. Greater  $x_3$  proportions, which corresponds to the dispersing solvent ( $z_3$ ), promotes greater contact between the analyte and the extraction solvent represented by  $x_2$ . A lower  $x_2$  proportion favors analyte preconcentration, increasing the analytical signal.

Likewise,  $x_1$  ( $z_1$  = saline solution  $MgCl_2$  0.017% m/v), which is found in a smaller proportion, is convenient to disperse  $x_2$  and efficiently extract the analyte from the sample. In this sense, the proposed chemometrical method was viable to determine the optimal condition for linoleic acid extraction through LD-DLLME, once it can be carried out in a wide range of solvent proportion according to the analyte specificities and the matrix which contains it.

### **3 CONCLUSION**

With the application of Moore-Penrose generalized inverse to the generated full cubic models, it was possible to concurrently determine the coefficients  $d_{ij}$  and represent them in a single SS model.

The simultaneous representation of all coefficients has enabled a better chemical interpretation of the analysis conditions. The response surface of the SS model was able to indicate with acceptance the optimal linoleic acid extraction through LD-DLLME.

### **4 ACKNOWLEDGMENTS**

The present paper was made possible with the support of *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* – Brazil (CNPq), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* – Brazil (CAPES) – financecode 001 and *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais* (FAPEMIG) – Brazil. The authors also thank *Laboratório de Gestão de Resíduos Químicos da Universidade Federal de Lavras* (LGRQ-UFLA), *Laboratório de Analítica e*

*Eletroanalítica da Universidade Federal de Lavras (LAE-UFLA) and Laboratório de Reprodução Animal (LRA-UFLA) for offering the facilities and equipment for the realization of this paper.*

## 5 REFERENCES

- <sup>1</sup> Butler, G, et al. Differing responses in milk composition from introducing rapeseed and naked oats to conventional and organic dairy diets. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019. doi=10.1038/s41598-019-44567-8
- <sup>2</sup> \_\_\_\_\_. Fat composition of organic and conventional retail milk in northeast England. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 1, p. 24-36, 2011. doi=10.3168/jds.2010-3331.
- <sup>3</sup> Dutra, PA, et al. Flaxseed improves embryo production in Boer goats. **Theriogenology**, v. 127, p. 26-31, 2019. doi=10.1016/j.theriogenology.2018.12.038
- <sup>4</sup> Delgado, B, et al. Whole rumen metagenome sequencing allows classifying and predicting feed efficiency and intake levels in cattle. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019. doi=10.1038/s41598-018-36673-w
- <sup>5</sup> Folch, J, Lees, M, Stanley, GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957. <http://www.jbc.org/content/226/1/497.long>. Accessed December 20, 2019.
- <sup>6</sup> Castro-Gómez, MP, et al. Total milk fat extraction and quantification of polar and neutral lipids of cow, goat, and ewe milk by using a pressurized liquid system and chromatographic techniques. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p. 6719-6728, 2014. doi = 10.3168/jds.2014-8128
- <sup>7</sup> Carabajal, M, et al. Applications of liquid-phase microextraction procedures to complex samples assisted by response surface methodology for optimization. **Microchemical Journal**, v. 152, 2020. doi=10.1016/j.microc.2019.104436
- <sup>8</sup> Bedassa, T, Gure, A, Megersa, N. Low Density Solvent Based Dispersive Liquid. Liquid Microextraction and Preconcentration of Multiresidue Pesticides in Environmental Waters for Liquid Chromatographic Analysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, n. 10, p. 1199-1206 2015. doi = 10.1134/S1061934815100184
- <sup>9</sup> Cornell, J. **Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data**. Wiley: Wiley Series in Probability and Statistics 2011.
- <sup>10</sup> Penrose, R, Todd, JA. On best approximate solutions of linear matrix equations. **Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society**, v. 52, n. 1, p. 17-19, 1956. doi=10.1017/S0305004100030929
- <sup>11</sup> Neto, BDB, Scarminio, IS, Bruns, RE. **Como fazer experimentos - Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editoras da Unicamp - Campinas, SP. 2001.

- <sup>12</sup> Lawson, J, Willden, C, Mixture experiments in R using mixexp. *Journal of Statistical Software*, v. 72, 2016. doi=10.18637/jss.v072.c02
- <sup>13</sup> James, M. The generalised inverse. **The Mathematical Gazette**, v. 62, n. 420, p. 109-114, 1978. doi = 10.1017/S0025557200086460.
- <sup>14</sup> He, Y, Concheiro-Guisan, M. Microextraction sample preparation techniques in forensic analytical toxicology. **Biomedical Chromatography**, v. 33, n. 1, Jan 2019. doi = 10.1002/bmc.4444

## ARTIGO 2

### **MICROEXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA DE BAIXA DENSIDADE NA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO DE OVINOS POR GC/FID**

Matheus Julien Ferreira Bazzana<sup>1</sup>, Cleber Nogueira Borges<sup>1</sup>, Letícia Rodrigues Faria<sup>2</sup>, Nadja Gomes Aleves<sup>2</sup>, Adelir Aparecida Saczk<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras - MG, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 – MG, Brasil

\*Corresponding author. Tel: +55 35 38291876, fax: +55 35 38291812

*E-mail:* adelir@ufla.br (SACZK, A. A.)

ORCID: 0000-0003-3241-389X

Artigo de acordo com as normas da revista **Analytical and Bioanalytical Chemistry**

## Resumo

Nesse trabalho a microextração líquido-líquido dispersiva de baixa densidade (LD-DLLME) com posterior etapa de esterificação, foi proposta para a determinação de ácido linoleico (AL) e ácido esteárico (AE) em amostras de soro sanguíneo de ruminantes. A metodologia desenvolvida teve como objetivo extrair e esterificar de forma rápida e eficiente ambos os ácidos graxos com subsequente análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chamas (GC/FID). A otimização do método de extração foi realizada com o modelo polinomial de Scheffé para misturas de três componentes. O método foi validado segundo os parâmetros estabelecidos pelo guia EURACHEM/2014. A condição ótima de extração para a LD-DLLME foi de 1400 µL do meio de dispersão (MgCl<sub>2</sub> 0,017%), 400 µL de solvente extrator (tolueno) e 1200 µL de solvente dispersor (metanol). O desempenho do método demonstrou seletividade, sensibilidade e precisão adequadas para ser aplicado em amostras reais, apresentando uma recuperação média de 98,54% e 103,83% para o AL e para o AE, respectivamente. A LD-DLLME mostrou-se superior ao método de Folch et al. (1957), até então utilizado na determinação de ácidos graxos em amostras de soro sanguíneo de ruminantes. Por meio das análises em amostras reais pode-se inferir que o método desenvolvido é eficiente no monitoramento dessas substâncias no organismo de ruminantes.

**Palavras-chave:** ácido linoleico; ácido esteárico, quimiometria; técnica miniaturizadas de extração;

## Introdução

Os ácidos graxos (AG) são substâncias fundamentalmente suplementadas na dieta de ruminantes devido a melhorias no metabolismo, fornecimento de energia e desempenho reprodutivo desses animais, principalmente no período da lactação<sup>1; 2; 3; 4</sup>. A suplementação desses lipídios acontece por meio da forragem com cereais e oleaginosas, que são ricas em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS)<sup>5; 6</sup>.

O fornecimento de PUFAS na dieta de ruminantes proporciona a síntese de prostaglandinas, que são responsáveis por melhorar o ambiente uterino para o desenvolvimento de oócito e embriões<sup>7; 8; 9</sup>. O baixo fornecimento de PUFAS para esses animais provocam inibições em seu crescimento, problemas de saúde e ovulação. Esse quadro é convertido pelo fornecimento de ácido linoleico (AL, C18,2 cis-9 cis-12) e ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA, C18:3, cis-9, cis-12, cis-15) uma vez que os mamíferos não sintetizam esses AG naturalmente<sup>8</sup>.

Devido ao processo de biohidrogenação do AL reações consecutivas de isomerização acontecem no rumem desses animais, tendo como produto majoritário o ácido esteárico (AE, C18:0)<sup>5; 10; 11</sup>. Assim, a suplementação de AL é um processo importante, uma vez que essa

substância não é absorvida em quantidades adequadas por esses animais<sup>8</sup>. Sendo assim, monitorar e avaliar a modificação dessa substância no organismo desses animais é um processo complicado e dispendioso, o que viabiliza o desenvolvimento de métodos alternativos de análise<sup>12</sup>.

O método de Folch et al., (1957)<sup>13</sup> (FO) ainda é o mais utilizado na extração e purificação desses composto em amostras biológicas. Trata-se de um método de extração líquido-líquido, que apresenta como característica o elevado consumo de solventes potencialmente tóxicos, baixa transferência do analito para a fase extratora e grande consumo de tempo <sup>14; 15</sup>.

Nos últimos anos, o desenvolvimento de métodos miniaturizados cresceu significativamente por atender os requisitos da química verde. Entre as técnicas miniaturizadas desenvolvidas, a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) se difundiu rapidamente devido a sua simplicidade de operação, boa relação custo-benefício, alto fator de pré-concentração, alta eficiência de extração e baixo consumo de solvente orgânico e amostra <sup>16</sup>.

Ao longo de seu desenvolvimento e consolidação a DLLME passou por extensas modificações com relação ao tipo de solvente de extração, solvente de dispersão e dispositivos de extração <sup>16</sup>. Exemplo disso é a microextração líquido-líquido dispersiva de baixa densidade (LD-DLLME) que utiliza solventes menos densos que a água para se adaptar as características do analito e da matriz de estudo<sup>17</sup>.

Nesse sentido, o objetivo do trabalho foi otimizar e validar um método de extração utilizando a LD-DLLME com posterior etapa de esterificação para a determinação de AL e AE em amostras de soro sanguíneo de ovinos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID). O intuito do estudo foi avaliar a eficiência do método na extração de ambos os ácidos graxos em amostras de soro de cordeira com alimentação tradicional e com suplementação de lipídios proveniente de grão de soja tostada, quebrada e moída. Os resultados obtidos foram comparados, pelos critérios de veracidade, com o método de FO tradicionalmente utilizado nesse tipo de análise.

## **Materiais e Métodos**

### **Preparo das amostras e consentimento informado**

As coletas de sangue foram realizadas por punção da veia jugular das ovelhas, em tubos sem anticoagulante (Nova Jersey, Estados Unidos). Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm durante 15 min em *ependorf* de 2,0 mL. O soro sanguíneo foi recolhido e armazenado a -20 °C até análise.

As amostras foram cedidas pelo Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia (DZO) da Universidade Federal de Lavras (UFLA- Lavras, Brasil), previamente aprovadas pelo comitê de ética no projeto “Restrição alimentar e suplementação lipídica: efeitos sobre a Idade à puberdade e desenvolvimento folicular ovariano em cordeiras da raça Santa Inês”, no CEUA/UFLA sob o número de protocolo CEUA/UFLA 085/13.

### **Reagentes**

Foram utilizados os seguintes reagentes: tolueno grau HPLC da MERCK (Darmstadt, Alemanha). Metanol (MeOH) grau HPLC, clorofórmio (99,5%), carbonato de potássio, ( $K_2CO_3$  99%) e cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ , 99%) da Sigma Aldrich (Missouri, EUA). Cloreto de acetila (99,9%) da Acros (New Jersey, EUA). Os padrões de ácido linoleico (AL - 99,9%), ácido esteárico (AE - 99,9%), linoleato de metila (LM - 99,9%) e estearato de metila (ETM - 99,9%) foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA). Água ultrapura (Tipo I) foi obtida do sistema Milli Q (Millipore, Bedford, EUA).

### **Soluções padrão**

As soluções estoque de ácidos graxos e dos ésteres de ácidos graxos utilizadas na LD-DLLME foram preparadas em tolueno com uma concentração de 1,0 mmol L<sup>-1</sup>. As soluções de trabalho foram preparadas por diluição em tolueno a partir da solução estoque, obtendo-se uma concentração de 0,1 mmol L<sup>-1</sup>.

As soluções estoque de ácidos graxos e de ésteres de ácidos graxos utilizadas no método de FO foram preparadas com uma solução de clorofórmio/metanol 2:1 v/v com uma

concentração de 1,0 mmol L<sup>-1</sup>. As soluções de trabalho foram preparadas por diluição na solução de clorofórmio/metanol 2:1 v/v, obtendo-se uma concentração de 0,1 mmol L<sup>-1</sup>.

Todas as soluções preparadas foram armazenadas em frasco ambar sob uma temperatura de -20 °C.

#### **Método de extração por LD-DLLME**

Em um tubo de vidro foi adicionado 100 µL soro sanguíneo de ruminante e em seguida o volume de 1400 µL de solução salina de cloreto de magnésio 0,017% (m/v), dissolvendo a amostras. Foram adicionados simultaneamente 1200 µL de metanol e 400 µL de tolueno como uma seringa e as fases obtidas foram separadas por centrifugação (5min, 3000 rpm). O extrato da fase superior foi transferido para um frasco de vidro com capacidade de 15 mL e esterificado.

#### **Método de Folch**

O método de extração comparativo utilizado foi o de FO aplicado em amostras de soro sanguíneo, como descrito por Pelegrino et al., (2014)<sup>19</sup>. As extrações foram realizadas em Eppendorf de 5,0 mL utilizando 100 µL de soro sanguíneo de ruminantes. O volume 2000 µL de uma solução de clorofórmio/metanol 2:1 v/v foi adicionado ao tubo contendo o soro. As amostras foram agitadas em vórtex (30s) e incubadas por 1 h em temperatura ambiente. Após a incubação 400 µL, de NaCl (0,9%) foram adicionados e as amostras foram agitadas em vórtex (30s). A mistura de solventes foi separada por centrifugação (5 min, 3000 rpm) e a fase superior foi descartada. A etapa de clean-up da fase inferior foi realizada adicionado 400 µL de uma solução de NaCl (0,9%)/MeOH/CHCl<sub>3</sub> 48:47:3 v/v/v/. A mistura de solventes foi centrifugada (5 min, 3000 rpm) e a fase superior foi descartada. A etapa de clean-up do foi realizada duas vezes. Do extrato obtido, 200 µL foram evaporados sob fluxo de N<sub>2</sub> e esterificados. O extrato esterificado foi armazenado sob temperatura de -20 °C até análise cromatográfica em GC/FID.

### **Método de esterificação**

O método de esterificação utilizado foi adaptado de Rodríguez-Palmero et al., (1998)<sup>18</sup>. Ao extrato, foi adicionado 100 µL de metanol e 100 µL de cloreto de acetila. O frasco foi devidamente vedado e levado a banho-maria por 30 min sob uma temperatura de 60 °C. Após o tempo de esterificação, a solução foi neutralizada com a adição de 1,0 mL de carbonato de potássio 6,0% (m/v). O recipiente foi centrifugado (5 min, 3000 rpm) e a fase orgânica foi transferida para um *vial* com *insert* de vidro. O extrato esterificado foi armazenado sob temperatura de -20 °C até análise cromatográfica em GC/FID.

O volume do agente esterificante foi previamente ajustado de acordo com a massa média dos extratos obtidos.

### **Instrumentação**

As análises cromatográficas foram realizadas em um GC/FID Agilent, 7890A (Wilmington, USA) equipado com uma coluna analítica HP-5 (Santa Clara, USA) com dimensões de 30 m x 0,32 mm ID x 0,25 mm e composição da fase estacionária de 5% difenil-polidimetilsiloxano. As amostras foram injetadas por um injetor Split/Splitless em modo Split usando taxa de divisão 1:20 (v/v) com a temperatura do injetor à 250 °C e do detector à 275 °C. O volume de injeção foi de 1,0 µL. A programação de temperatura da coluna foi de 80 °C, aumentado 10 °C por minuto até a temperatura de 250 °C. Essa temperatura foi mantida por 1 minuto e posteriormente aumentada em 7 °C por minuto até a temperatura de 350 °C, totalizando 29 minutos de corrida. O gás de arraste utilizado foi o hélio (He) a uma vazão constante de 1,1 mL min<sup>-1</sup>.

### **Planejamento experimental**

O planejamento experimental foi realizado de acordo com o método proposto por Bazzana et al., (2020). As variáveis experimentais avaliadas foram as proporções do meio de dispersão ( $z_1$ -solução salina de MgCl<sub>2</sub> 0,017%, v/v), do solvente extrator ( $z_2$  – tolueno) e do solvente dispersor ( $z_3$  – metanol). Na otimização do processo de extração as proporções dos

componentes  $z_1$ ,  $z_2$  e  $z_3$  foram variadas de 80 – 57%, 48 – 10% e 33 – 10%, respectivamente, em um conjunto de dez experimentos<sup>20</sup>. Todos os ensaios foram realizados com um volume de 100,0  $\mu\text{L}$  de amostra e volume total do sistema ternário de solventes da LD-DLLME foi de 3,0 mL. Uma vez que o domínio experimental da LD-DLLME não permite condições com solvente puro ou misturas binárias, o *espaço químico* que compreende as proporções  $z_1$ ,  $z_2$  e  $z_3$  foi codificado em espaço de *pseudo-mistura* em  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ . Os experimentos foram realizados avaliando somente a resposta analítica para o AL em dois *pools* de amostras de soro sanguíneo de ruminantes, um proveniente de animais que não receberam a suplementação de lipídeos e outro de animais que receberam a suplementação. As superfícies de resposta do modelo Super Saturado (SS) de Scheffé, para cada uma das amostras, foram obtidas e a média de ambas as superfícies foi construída. A melhor condição de extração para a LD-DLLME foi determinada a partir da superfície de resposta média, buscando condições representativas para ambos os tipos de amostra (com e sem suplementação lipídica) no *espaço químico*.

O Anexo 1, apresenta os experimentos realizados na escolha dos solventes utilizados na técnica de extração por LD-DLLME.

#### **Parâmetro analítico de desempenho para validação do método**

O guia de validação Eurachem/2014 foi utilizado para avaliar o desempenho do método analítico desenvolvido. Os parâmetros analíticos de desempenho avaliados foram: seletividade, linearidade, sensibilidade analítica, exatidão, precisão, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). Todo o processo de validação foi realizado com mesmo *pool* de soro sanguíneo de ruminantes com baixa concentração dos analitos, uma vez que não é possível a obtenção da matriz isenta dos mesmos.

A seletividade do método foi avaliada segundo o tempo de retenção ( $t_r$ ) de ambos os analitos e do efeito de matriz (EM). A linearidade foi avaliada através da curva analítica construída pelo método de adição de padrão. Os extratos da matriz foram fortificados com solução de

trabalho de linoleato de metila (LM) e estearato de metila (ETM), realizadas em seis níveis de concentração ( $0,0, 2,0 \times 10^{-3}, 4,0 \times 10^{-3}, 6,0 \times 10^{-3}, 8,0 \times 10^{-3}, 1,0 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$ ) em triplicata para ambos os ácidos graxos avaliados. A concentração de  $0,0 \text{ mmol L}^{-1}$  corresponde o extrato com baixas concentrações do analito sem a adição de padrão.

A regressão foi realizada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (OLS), o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o intervalo linear para os ácidos graxos estudados foram determinados.

O EM para cada um dos ácidos graxos foi determinado para avaliar a influência dos co-extrativos da matriz que causam o aumento ou a diminuição da resposta analítica. O EM foi determinado pela comparação entre as a curva analítica com correspondência de matriz e da curva analítica de padrão em solvente apresenta na Equação 1:

$$EM = \frac{b_m - b_s}{b_s} \quad (1)$$

em que  $b_m$  é a inclinação da curva analítica com correspondência de matriz e  $b_s$  é a inclinação da curva analítica de padrão em solvente.

A determinação da veracidade do método desenvolvido foi avaliada por meio da análise de amostras utilizando o método proposto (LD-DLLME) e o método de referência (FO). A recuperação dos analitos foi determinada por ambos os métodos em três níveis de fortificação com soluções trabalho de AL e AE ( $2,0 \times 10^{-3}, 6,0 \times 10^{-3}, 1,0 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$ ) em sextuplicata segundo a Equação 2.

$$R(\%) = \frac{x_{\text{médio}}}{x_{\text{ref}}} \times 100 \quad (2)$$

em que  $x_{\text{médio}}$  é o valor médio das respostas obtidas e  $x_{\text{ref}}$  é o valor de referência baseado na resposta obtida para aquela determinada concentração no construção da curva analítica pelo método de adição de padrão.

A precisão do método foi avaliada segundo a repetibilidade e a precisão intermediária. A repetibilidade foi conduzida em único dia por dois analistas diferentes, no qual, amostras

contendo uma pequena concentração do analito, foram fortificadas com solução de trabalho de AL e AE em três níveis de concentração ( $n=3$ ) e submetidas ao processo de extração e esterificação. Os ensaios foram realizados em sextuplicata e os níveis de fortificação correspondem a concentração de  $2,0 \times 10^{-3}$ ,  $6,0 \times 10^{-3}$ ,  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$  da curva analítica. A precisão intermediária foi avaliada em três dias consecutivos de análises realizadas pelo mesmo analista nos mesmo níveis de concentração utilizados no ensaio de repetibilidade. Os dados obtidos foram avaliados pela análise de variância (ANOVA) de acordo com as especificações do guia EURACHEM/2014.

O LOD e o LOQ foram calculados a partir do desvio padrão bruto ( $s'_0$ ), calculado segundo as Equações 3 e 4, de dez análises replicatas de amostras de soro com baixa concentração do analito. Para o LOD foi adotado  $3 \times s'_0$  e para o LOQ foi adotado  $10 \times s'_0$ .

$$s_0 = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3)$$

$$s'_0 = \frac{s_0}{\sqrt{n}} \quad (4)$$

### **Análise das amostras reais**

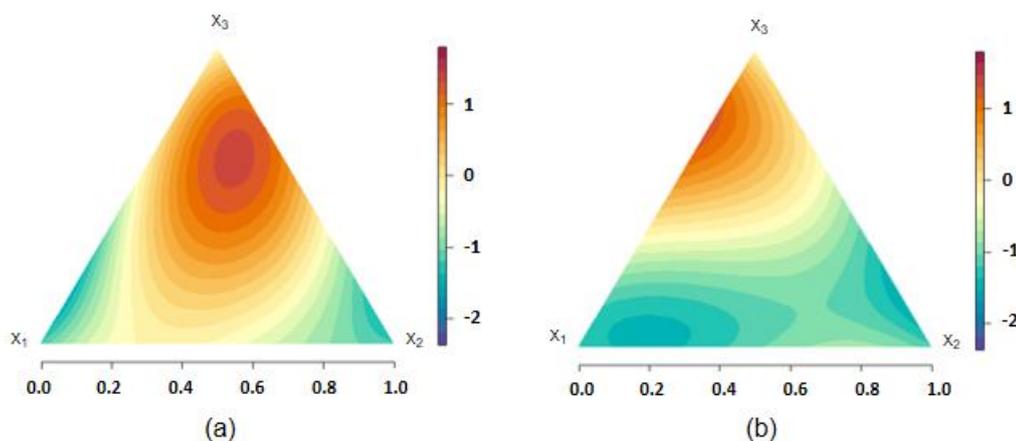
Foram analisadas 5 amostras de soro sanguíneo de ruminantes, sendo que, duas das amostras não passaram pelo processo de suplementação lipídica e três delas foram submetidas ao processo de suplementação com soja grão tostada e moída. Os ácidos graxos foram extraídos pela LD-DLLME. O método de adição de padrão foi utilizado para a construção das curvas analíticas para cada uma das amostras em três níveis ( $n = 3$ ) de concentração ( $2,0 \times 10^{-3}$ ,  $6,0 \times 10^{-3}$  e  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mmol L}^{-1}$ ). A extrapolação das curvas foi realizada para a determinação da concentração real de AL e AE em cada uma das amostras analisadas.

## **Resultados e discussão**

### **Planejamento experimental**

Os resultados obtidos por meio do planejamento de misturas de Schffé para o AL são apresentados na Figura , no qual pode-se observar diferenças na topologia da superfície de

resposta do modelo SS de Scheffé para os pools de amostras sem a suplementação de lipídios Figura 1(a) e com a suplementação de lipídio Figura 1(b).



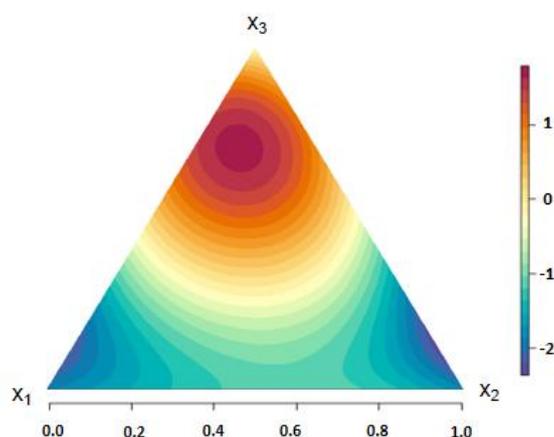
**Figura 1** Superfície de resposta para o modelos SS de Scheffé. (a) *pool* de amostra de soro sanguíneo de ruminantes sem a suplementação de lipídios; (b) *pool* de amostras de soro sanguíneo de ruminantes com a suplementação de lipídio.

Analisando a Figura 1(a) foi possível observar que a superfície de resposta do modelo SS de Scheffé apresenta uma coloração mais intensa na parte superior a direita. No sistema de *pseudo-mistura* codificado em  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ , essa região indica que a maior proporção do componente  $x_3$  exerce a maior influência na extração do AL nas amostras de soro de ruminantes sem a suplementação de lipídios, seguido pelo componente  $x_2$  e  $x_1$ . De forma semelhante, a Figura 1(b) apresenta uma coloração mais intensa na parte superior, porém a esquerda indicando que maior proporção do componente  $x_3$  também exerce maior influência na extração do AL nas amostras de soro com a suplementação de lipídios, seguido pelos componentes  $x_1$  e  $x_2$ .

É válido ressaltar que o sistema de *pseudo-mistura* não define as proporções finais em que os solventes serão empregados na LD-DLLME, uma vez que, tal sistema é conveniente somente para facilitar as interpretações quimiométricas. As proporções e consequentemente os volumes finais serão interpretados pelo *sistema químico*.

A superfície referente a amostra de soro sem a suplementação lipídica apresentado na Figura 1(a) descreve uma região de máximo bem definida, compreendida dentro do domínio experimental avaliado. Já a Figura 1(b) descreve uma região de máximo próxima aos limites do domínio experimental estudado. Isso se deve a possíveis co-extrativos da matriz, provenientes da suplementação lipídica que os animais de estudo foram submetidos.

O modelo SS de Scheffé médio apresentado na Figura 2 foi construído a partir dos modelos da Figura 1. Trata-se de uma superfície representativa para os diferentes tipos de amostras analisadas.



**Figura 2** Superfície de resposta média dos modelos SS de Scheffé apresentado na Figura 1 .

Analisando-se a superfície de resposta para o modelo SS de Scheffé apresentado na Figura 2 foi possível constatar que a coloração de maior intensidade, que representa o ponto de máximo, se encontra na parte superior do simplex. O sistema de *pseudo-mistura* codificado em  $x_1$ ,  $x_2$ , e  $x_3$  indica que o metanol exerce maior influência na extração do ácido linoleico nas amostras de soro. Em todos os casos apresentados o solvente dispersor (metanol) apresenta maior influência no método de extração. Isso pode estar relacionado à sua capacidade de promover a melhor dispersão do solvente de extração ao longo de todo o meio de dispersão, o que conseqüentemente aumenta a pré-concentração do analito <sup>21; 22</sup>.

Para a determinação da melhor proporção de cada um dos solventes empregados na LD-DLLME o sistema de pseudo-mistura ( $x_1$ ,  $x_2$ , e  $x_3$ ) foi reconvertido no sistema químico ( $z_1$ ,  $z_2$  e  $z_3$ ) e o ponto de máximo apresentado na Figura 2 foi determinado em termos de proporção e consequentemente pelo volume de cada um. A melhor proporção de solvente para a extração de ácido linoleico nas amostras de soro de ruminantes foi de 46,70% de  $z_1$ , 13,30% de  $z_2$  e 40,00% de  $z_3$ , que corresponde a 1400  $\mu$ L de solução salina de  $MgCl_2$  0,017% (v/v), 400  $\mu$ L de tolueno e 1200  $\mu$ L de metanol. As mesmas condições de análise foram adotadas para a extração do AE, uma vez que, a estrutura e a forma disponível no organismo animal são semelhante a do AL.

### Desempenho do método

Na Tabela 1 estão apresentados os parâmetros analíticos de desempenho referentes à linearidade, efeito de matriz (EM), coeficiente de determinação ( $R^2$ ), LOD e LOQ, obtidos para método analítico desenvolvido. Para ambos os ácido graxos os valores de regressão linear ( $R^2$ ) foram maiores que 0,990 no intervalo de trabalho avaliado.

**Tabela 1** Parâmetros analíticos de desempenho do método avaliado segundo a faixa linear, coeficiente de determinação ( $R^2$ ), LOD e LOQ.

Analito	EM (%)	Níveis	Inclinação	Intercepto	$R^2$	LOD (mmol L <sup>-1</sup> )	LOQ (mmol L <sup>-1</sup> )
AL (C18:2)	50,21	6	7840	4,0E+06	0,998	8,30E-05	2,76E-04
AE (C18:0)	60,55	6	47148	1,0E+07	0,999	5,78E-06	1,93E-05

O efeito de matriz pode indicar a ampliação ou a supressão do sinal analítico devido a concomitantes da matriz em que se encontra o analito. O EM pode ser classificado como: (a) EM fraco, quando os valores estiverem entre -20% e +20%; (b) EM médio, quando os valores obtido se encontram entre -50% e -20% e entre +20% e +50% e (c) EM forte, quando os valores obtidos se encontram abaixo de -50% ou acima de +50% <sup>23;24</sup>.

De acordo com o valores apresentados na Tabela 1, ambos os analitos apresentaram efeito de ampliação do sinal analítico. Nos dois casos o EM determinado foi classificado como forte

(considerando uma faixa entre -50% e +50%). Nesse sentido todos os experimentos quantitativos foram avaliados pela curva analítica matrizada.

Os valores estimados de LOD e LOQ para cada uma das curvas analíticas (Tabela 1) apresentam limites extremamente baixos. Esses valores são factíveis de serem determinados, uma vez que, a abordagem utilizada foi a repetição de 20 análises do extrato diluído, com concentração extremamente baixa dos analitos.

Por meio da inclinação obtida para cada uma das curvas analíticas, foi possível constatar que o método desenvolvido é mais sensível para o AE quando comparado ao AL. Os mesmo níveis de fortificação foram usados em ambas as curvas. Assim, os valores apresentados na Tabela 1 para a inclinação, indicam que uma menor variação na concentração de AE proporciona um maior aumento na resposta analítica quando comparado ao ácido linoleico, que possui um menor valor de inclinação.

Os ensaios de precisão e exatidão foram realizados e avaliados por meio da análise de variância ANOVA. Os resultados dos ensaios de repetibilidade estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** Resultados para a análise de variância ANOVA para os experimentos de repetibilidade.

Fonte de Variação	AL (C18:2)			AE (C18:0)		
	gl	QM	Valor-p	gl	QM	p-valor
Analista	1	4,12E-07	0,303	1	9,44E-08	0,767
Concentração	2	1,43E-04	4,84E-22	2	2,37E-04	8,56E-19
Interação	2	1,09E-07	0,750	2	6,47E-07	0,547
Resíduos	30	3,76E-07		30	1,05	

gl = graus de liberdade; QM = quadrado médio; p-valor = probabilidade de significância.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2 para ambos os ácidos graxos, é possível constatar que para a análise realizada no mesmo dia com analistas diferentes o p-valor para a interação é maior que nível de significância adotado ( $p > 0,05$ ). Isso indica que a interação dos analistas com as concentrações analisadas em cada uma das fortificações, não apresentaram variações significativas.

A análise realizada entre cada uma das três concentrações, apresentou um p-valor menor do que o nível de significância exigido ( $p < 0,05$ ) para ambos os analitos. Esse resultado é esperado, uma vez que, a concentração em cada um dos níveis de fortificação não é a mesma. Assim, esse fator não compromete a análise dos dados, pois tal variação é intrínseca ao conjunto de dados analisados.

O p-valor determinado para a análise entre os dados de cada analista se apresentou maior do que o nível de significância adotado ( $p > 0,05$ ), indicando que não houve variação significativa nos dados de cada analista. Isso implica que o método analítico desenvolvido é reprodutível em um curto intervalo de tempo, mesmo com a troca de analistas.

Uma vez que a troca de analistas não apresentou variações significativas, a análise de variância ANOVA para a precisão intermediária foi realizada considerando como variáveis somente os dias de análise e a concentração das fortificações realizadas em três níveis. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3** Resultados para a análise de variância ANOVA para os experimentos de precisão intermediária.

Fonte de Variação	AL (C18:2)			Ácido Esteárico (C18:0)		
	gl	QM	Valor-p	gl	QM	p-valor
Dias	2	3,36E-07	0,375	2	2,17E-07	0,767
Concentração	2	2,07E-04	1,91E-33	2	3,74E-04	8,56E-19
Interação	4	1,14E-07	0,849	4	5,58E-07	0,547
Resíduos	45	3,36E-07		45	1,38E-06	

gl = graus de liberdade; QM = quadrado médio; p-valor = probabilidade de significância.

Os resultados apresentados na Tabela 3, indica que para ambos os analitos, a interação apresentou um p-valor maior que o valor de significância adotado ( $p > 0,05$ ). Assim, foi possível constatar que a interação dos dias de análise com a concentração das três fortificações realizadas não apresentaram variações significativas. Semelhantemente aos resultados de repetibilidade, a concentração dos níveis de fortificação são diferentes, portanto, o p-valor menor que o nível de significância adotado ( $p < 0,05$ ) indicou que há variação entre

os dados obtidos entre as concentrações, sendo essa, um condição intrínseca do conjunto de dados analisados.

A análise dos dados obtidos em cada um dos dias apresentou um p-valor maior que o de significância adotado ( $p > 0,05$ ). Assim, constata-se que não houve variações significativas entre os dados obtidos nos três diferentes dias de análise. Nesse sentido, foi possível inferir que o método desenvolvido para a extração de ambos os ácidos é reproduzível em diferentes dias de análise.

A Tabela 4 mostra os valores de recuperação calculados em três níveis de concentração para o AL e para o AE pela LD-DLLME e pelo método de FO, referentes aos experimentos de veracidade.

**Tabela 4** Resultados de recuperação (%) para os três níveis de concentração referentes ao experimento de veracidade  $\pm$  desvio padrão

Analito	Concentração I (0,002 mmol L <sup>-1</sup> )		Concentração II (0,006 mmol L <sup>-1</sup> )		Concentração III (0,01 mmol L <sup>-1</sup> )		Recuperação Média (%)	
	Recuperação (%)		Recuperação (%)		Recuperação (%)			
	LD-DLLME	FO	LD-DLLME	FO	LD-DLLME	FO	LD-DLLME	FO
AL	108,82	94,30	92,08	86,86	94,43	93,50	98,54 $\pm$ 9,05	91,55 $\pm$ 4,08
AE	99,25	82,18	108,02	107,13	104,22	84,72	103,83 $\pm$ 4,39	91,34 $\pm$ 13,73

Comparando os resultados obtidos para cada um dos métodos nos três níveis de concentração apresentados na Tabela 4, a maior recuperação média obtida foi para a LD-DLLE na análise do AL e do AE, com valores de 98,54% e 103,83%, respectivamente. Em todas as concentrações avaliadas pela LD-DLLME, a recuperação de ambos os ácidos graxos foram superior a 92,08% e inferiores a 108,82%, atendendo os requisitos estipulados pela EURACHEM/2014 que determina que os valores de recuperação devem estar entre 80 - 120%.

Os valores de recuperação determinado pelo método de Folch foram inferior aos determinados para a LD-DLLME em todas as concentrações avaliadas. Os resultado

encontrados foram superiores a 82,18% e inferiores a 108,02% e também atendem os requisitos estipulados pela EURACHEM/2014.

Os resultados obtidos podem ser explicados parcialmente, uma vez que o soro sanguíneo de ruminante é um matriz muito complexa e com um teor elevado de proteínas, que no método de FO cria uma camada espessa entre a fase extratora inferior e fase aquosa, o que dificulta o processo de separação das fases e contribui para a menor recuperação<sup>19</sup>. Na LD-DLLE, o solvente extrator, de menor densidade, se encontra na fase superior e pode ser coletado com facilidade.

Resultados semelhante foram encontrados por Pellegrino et al., (2014) para o método de FO em amostras de soro sanguíneo humano, com recuperações que variaram de 70,5% - 106,2% na extração de lipídios de diversas classes<sup>19</sup>.

Um segundo fator determinante é a solubilidade em água do solvente extrator utilizado nos métodos, uma vez que o clorofórmio apresenta solubilidade de 8,0 g L<sup>-1</sup>, à 20 °C, enquanto o tolueno apresenta solubilidade de 0,52 g L<sup>-1</sup>, à 20 °C. Nesse sentido, a eficiência de extração do método de FO pode ser inferior ao da LD-DLLME na extração de composto mais apolares, corroborando com os resultados obtidos.

Através da comparação dos valores de recuperação determinados, pode-se inferir que o método desenvolvido (LD-DLLME) foi eficiente e equiparável ao método padrão de extração de lipídios em matrizes biológica (FO), podendo ser aplicado para a finalidade proposta.

### **Amostras reais**

Os resultados obtidos para a análise das amostras reais estão apresentados na Tabela 5. As amostras a e b são de animais que não foram submetidas ao processo de suplementação lipídica e as amostras c, d e e são de animais que passaram por esse processo.

**Tabela 5** Concentração de AL e AE determinada para 5 pelo método de adição de padrão.

Analito	Amostra	Concentração (mmol L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
AL (C18:2)	a	0,00525	0,998
	b	0,00211	0,998
	c	0,0319	0,997
	d	0,0419	0,998
	e	0,0146	0,997
AE (C18:0)	a	0,00469	0,999
	b	0,01200	0,993
	c	0,20200	0,997
	d	0,06799	0,994
	e	0,12287	0,998

Ao avaliar as concentrações reais obtidas para cada uma das amostras (Tabela 5) pode-se constatar que os animais que não passaram pelo processo de suplementação de lipídios apresentaram uma menor concentração de AL e AE quando comparadas às amostra de animais que passaram por esse processo. Nesse sentido, foi possível afirmar que o método desenvolvido (LD-DLLME) foi eficiente para ambos os tipos de amostras analisadas. O coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) obtido em todas as curvas analíticas foram superiores a 0,99 (R<sup>2</sup>>0,99) evidenciando boa linearidade.

Através dos valores de concentração encontrados para o AL e para o AE é possível constatar que ambas aumentaram simultaneamente. Nesse sentido, pode-se inferir que, o processo de biohidrogenação ruminal continua acontecendo de forma extensiva, porém, a suplementação fornecida foi eficiente no aumento da disponibilidade do AL no organismo desses animais.

### **Conclusão**

O método desenvolvido utilizando a LD-DLLME com posterior etapa de esterificação, possibilitou a determinação de AL e AE em amostras de soro sanguíneo de ovinos

eficientemente por GF/FID. A otimização dos volumes empregados na extração, apresentaram valores condizentes com os princípios da técnica de extração, que visa a redução do volume de solvente orgânicos potencialmente tóxicos. O desempenho do método demonstrou adequada seletividade, sensibilidade e precisão para ser aplicado em amostras reais. A linearidade foi satisfatória uma vez que as curvas matrizadas tiveram comportamento linear para ambos os compostos. O método proposto apresenta potencial para aplicação no monitoramento de AL e seu intermediário (AE) proveniente do processo de biohidrogenação ruminal.

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram não ter conflito de interesse.

### **Agradecimentos**

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) - Brasil. Os autores também agradecem ao Laboratório de Gestão de Resíduos Químicos da Universidade Federal de Lavras (LGRQ-UFLA), Laboratório de Analítica e Eletroanalítica da Universidade Federal de Lavras (LAE-UFLA) e Laboratório de Reprodução Animal (LRA-UFLA) pela concessão das instalações e equipamentos para a realização deste trabalho.

### **Referências bibliográficas**

- <sup>1</sup> YANTING, C. et al. Effect of stearic or oleic acid on milk performance and energy partitioning when fed in diets with low and high rumen-active unsaturated fatty acids in early lactation. **Journal of Animal Science**, v. 97, n. 11, p. 4647-4656, 2019.
- <sup>2</sup> JENKINS, T. C.; HARVATINE, K. J. Lipid Feeding and Milk Fat Depression. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 30, n. 3, p. 623-642, 2014.
- <sup>3</sup> PALMQUIST, D. L.; JENKINS, T. C.; JOYNER, A. E. Effect of Dietary Fat and Calcium Source on Insoluble Soap Formation in the Rumen. **Journal of Dairy Science**, v. 69, n. 4, p. 1020-1025, 1986.

- 4 STAPLES, C. R.; BURKE, J. M.; THATCHER, W. W. Influence of Supplemental Fats on Reproductive Tissues and Performance of Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 3, p. 856-871, 1998.
- 5 SAVOINI, G. et al. Effects of fat supplementation in dairy goats on lipid metabolism and health status. **Animals**, v. 9, n. 11, 2019.
- 6 CLAPHAM, W. M. et al. Fatty acid composition of traditional and novel forages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 26, p. 10068-10073, 2005.
- 7 DUTRA, P. A. et al. Flaxseed improves embryo production in Boer goats. **Theriogenology**, v. 127, p. 26-31, 2019.
- 8 SANTOS, J. E. P. et al. Long Chain Fatty Acids of Diet as Factors Influencing Reproduction in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. SUPPL.2, p. 23-30, 2008.
- 9 CHILDS, S. et al. Effect of level of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on systemic and tissue fatty acid concentrations and on selected reproductive variables in cattle. **Theriogenology**, v. 70, n. 4, p. 595-611, 2008.
- 10 BUCCIONI, A. et al. Lipid metabolism in the rumen: New insights on lipolysis and biohydrogenation with an emphasis on the role of endogenous plant factors. **Animal Feed Science and Technology**, v. 174, n. 1-2, p. 1-25, 2012.
- 11 BAUMAN, D. E.; LOCK, A. L. Concepts in lipid digestion and metabolism in dairy cows. **Tri-State Dairy Nutrition Conference, Proceedings**, 2006.
- 12 DELGADO, B. et al. Whole rumen metagenome sequencing allows classifying and predicting feed efficiency and intake levels in cattle. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.
- 13 FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.
- 14 FARAJI, M.; YAMINI, Y.; GHOLAMI, M. Recent Advances and Trends in Applications of Solid-Phase Extraction Techniques in Food and Environmental Analysis. **Chromatographia**, v. 82, n. 8, p. 1207-1249, 2019.
- 15 WEN, Y. et al. Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 59, p. 26-41, 2014.
- 16 LI, G.; ROW, K. H. Utilization of deep eutectic solvents in dispersive liquid-liquid micro-extraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 120, 2019.
- 17 BEDASSA, T.; GURE, A.; MEGERSA, N. Low Density Solvent Based Dispersive Liquid. Liquid Microextraction and Preconcentration of Multiresidue Pesticides in

- Environmental Waters for Liquid Chromatographic Analysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, n. 10, p. 1199-1206, 2015.
- 18 RODRÍGUEZ-PALMERO ET AL. **Comparison of two methods for the determination of fatty acid profiles in plasma and erythrocytes.** *Journal of Chromatography. A.* 793: 435–440 p. 1998.
- 19 PELLEGRINO, R. M. et al. LC/MS lipid profiling from human serum: A new method for global lipid extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, n. 30, p. 7937-7948, 2014.
- 20 BAZZANA, M. J. F. et al. Moore-penrose inverse generalized screening mixture design applied in low-density dispersive liquid-liquid microextraction. artículo submetido a **Journal of Chemometrics**, 2020.
- 21 REZAEI, M. et al. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1-2, p. 1-9, May 2006. ISSN 0021-9673.
- 22 REZAEI, M.; YAMINI, Y.; FARAJI, M. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2342-2357, Apr 2010. ISSN 0021-9673.
- 23 HU, Z. et al. Simultaneous determination of multiclass illegal dyes with different acidic–basic properties in foodstuffs by LC-MS/MS via polarity switching mode. **Food Chemistry**, v. 309, 2020.
- 24 BESIL, N. et al. Matrix Effects and Interferences of Different Citrus Fruit Coextractives in Pesticide Residue Analysis Using Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 23, p. 4819-4829, Jun 2017.

## ANEXO 1

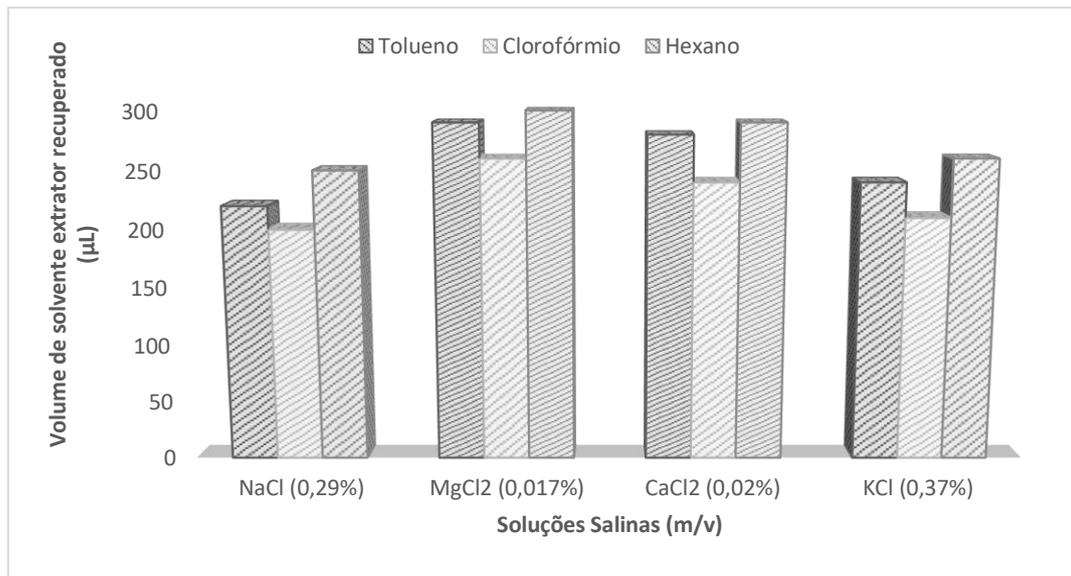
### Escolha do solvente extrator, dispersor e meio de extração

A natureza do solvente extrator e do meio de dispersão foi avaliada para a microextração líquido-líquido dispersiva de baixa densidade (LD-DLLME). O solvente metanol foi escolhido previamente como solvente de dispersão, uma vez que, o mesmo será utilizado como agente esterificante no processo de esterificação, evitando assim, um possível processo de secagem do extrato.

Os solventes extratores avaliados foram tolueno, clorofórmio e hexano. As soluções de cloreto de sódio 0,29% (m/v), cloreto de magnésio 0,017% (m/v), cloreto de cálcio 0,02% (m/v) e cloreto de potássio 0,37% (m/v) foram avaliadas como meio de dispersão, baseado nas soluções utilizadas na etapa de *clean-up* do método de Folch et al. (1957).

Na avaliação da natureza dos solventes utilizados na LD-DLLME foram utilizados 100 µL de amostras de soro sanguíneo de ruminante. Ao tubo contendo a amostra, foram adicionados 2,0 mL de solução salina. Em seguida, foram adicionados simultaneamente 300 µL do solvente extrator e 600 µL de solvente dispersor. A mistura foi separada por centrifugação (5 min, 3000 rpm). A fase orgânica foi coletada e o volume recolhido foi anotado. O total de 12 experimentos foram realizados.

A interação de cada uma das soluções salinas com cada um dos solvente de extração foi avaliada de acordo com o volume de solvente extrator recuperado. Os dados obtidos são apresentado na Figura 1.

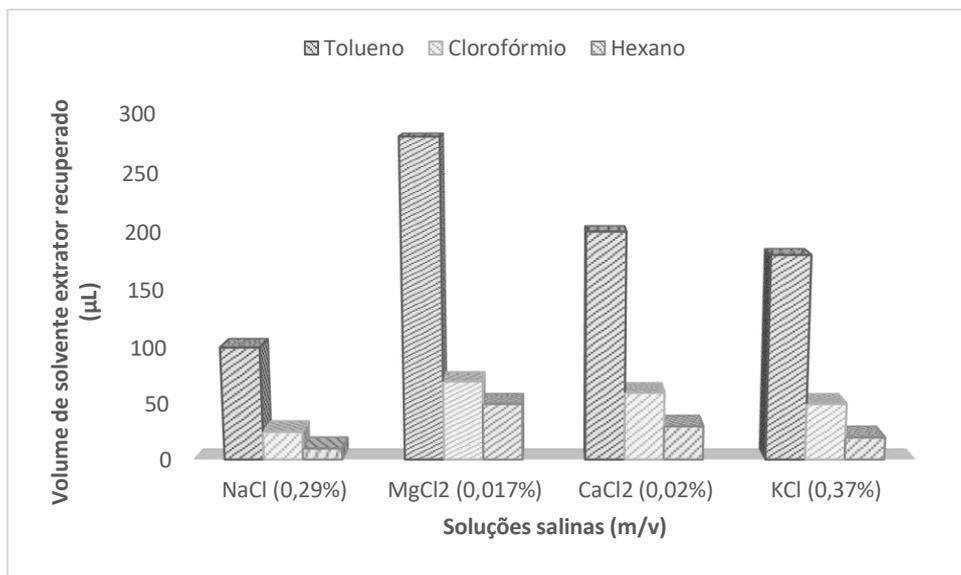


**Figura 1** de cada solvente extrator recuperado de acordo com cada solução salina.

Os resultados apresentados na Figura 1 indicam que durante o processo de extração, uma pequena quantidade de solvente extrator foi perdida. Pode-se constatar, que quantidades maiores de solvente extrator foi recuperada nos experimentos em que as soluções de MgCl<sub>2</sub> (0,017 m/v) e CaCl<sub>2</sub> (0,02%) foram utilizadas como meio de dispersão. A análise visual do extratos evidenciaram um melhor separação e limpidez da fase orgânica. Isso se deve ao efeito *salting-out*, que promove a melhor separação e *clean-up* da fase orgânica contendo os analitos. Resultado extremamente semelhantes aos encontrados são apresentados por Madeira et al., (2020), no estudo do efeito *salting-out* de albumina eletro-positivas, em que, os cátions Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> apresentam maior influência para esse fenômeno.

Por se tratar de uma matriz muito complexa com diversos interferentes, a determinação exata dos fatores que contribuíram para uma maior recuperação, limpidez e separação das fases não é factível devido à grande quantidade de variáveis envolvidas. No entanto para o propósito do trabalho, as constatações obtidas são suficientes.

Após a etapa de extração, o extrato recolhido foi submetido ao processo de esterificação. Os volumes recuperados para cada solvente de extração são apresentados na Figura 2.



**Figura 2** Volume de cada solvente extrator recuperado de acordo com cada solução salina após o processo de esterificação e neutralização da amostra.

Ao final do processo de esterificação, parte do volume dos solventes extratores foi perdida como apresentado pelos dados da Figura 2. Essa perda está relacionada com a pressão de vapor desses solventes. Os solventes hexano e o clorofórmio possuem pressão de vapor de 120 mmHg (20 °C) e 158 mmHg (20 °C) respectivamente, assim, quando submetidos ao processo de esterificação sob temperatura de 60 °C, grande parte desses solventes particionam-se para o “*headspace*”, do recipiente.

Diante dos resultados apresentados, solução de cloreto de magnésio 0,017% (m/v) foi selecionada como meio de dispersão e devido a estabilidade térmica no processo de esterificação, o tolueno foi selecionado como solvente extrator para o desenvolvimento da LDS-DLLME.

## Referências

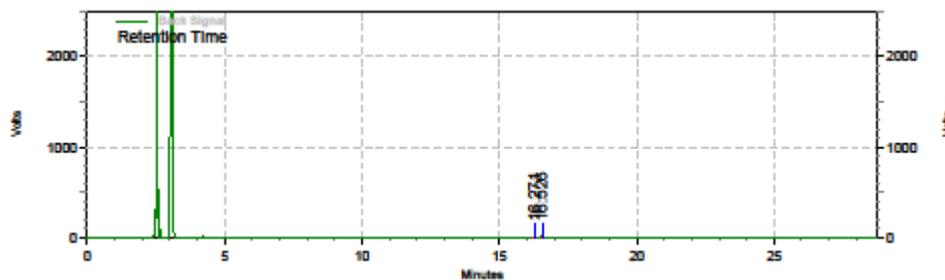
- FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957. ISSN 0021-9258.
- MADEIRA, P. P.; FREIRE, M. G.; COUTINHO, J. A. P. Distinct roles of salt cations and anions upon the salting-out of electro-positive albumin. **Journal of Molecular Liquids**, v. 301, 2020.

## ANEXO 2

### Relatório da análise cromatográfica por LD-DLLME

No relatório apresentado na Figura 1, tem-se o cromatograma da análise por GC/FID realizada pra uma das amostras de soro sanguíneo de ruminantes.

**Figura 1** – Relatório de análise cromatográfica realizada por GC/FID.



#### Back Signal Results

Retention Time	Area	Area %	Height	Height %
16.271	28290	20.84	18168	21.96
16.526	107486	79.16	64557	78.04
Totals		135776	82725	100.00

Por meio da Figura 1, foi possível constatar o tempo de retenção para o AL e para o AE, sendo de 16,271 min e 16,526 min, respectivamente. A intensidade relativa para o AL foi de 20,84% e para o AE foi de 79,16% para essa amostra.