



Licenciatura em Ciências da Nutrição

**Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes tipos de criação**

Artigo Científico Original Final

Elaborado por Rafael Matos Carlos

Aluno nº 201192416

Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Sousa

Barcarena

Novembro de 2015

Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes tipos de criação

Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes tipos de criação

Universidade Atlântica

Licenciatura em Ciências da Nutrição

**Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes tipos de criação**

Artigo Científico Original Final

Elaborado por Rafael Matos Carlos

Aluno nº 201192416

Orientadores: Dr.<sup>a</sup> Ana Cláudia Sousa

Barcarena

Novembro de 2015

Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes tipos de criação

Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes tipos de criação

**DECLARAÇÃO**

Nome

\_\_\_\_\_

Endereço electrónico: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Número do Cartão de Cidadão: \_\_\_\_\_

Título do Trabalho

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Orientador(es):

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Declaro que concedo à Universidade Atlântica uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, o presente trabalho, no todo ou em parte.

Retenho todos os direitos de autor relativos ao presente trabalho, e o direito de o usar futuramente

Assinatura

Universidade Atlântica, Barcarena \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes tipos de criação

O autor é o único responsável pelas ideias expressas neste relatório.

Por opção do autor este documento foi redigido sem obedecer ao acordo ortográfico.

Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes tipos de criação

## **Agradecimentos**

**À Catarina, minha companheira, pelo apoio prestado em todos os momentos, sobretudo nos mais difíceis. E à minha mãe, pela ajuda prestada financeiramente**

Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes tipos de criação

## Resumo

### **Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes sistemas de criação.**

Este projecto está a ser desenvolvido juntamente com o Centro de Química Estrutural do IST (Instituto Superior Técnico de Lisboa) nomeadamente com o grupo de lipidómica. É aqui relatado o trabalho laboratorial realizado com o fim de proceder à extracção da fracção lipídica do ovo e outras questões relacionadas com a análise a ser desenvolvida.

Os dados sobre a composição dos alimentos têm utilidades várias, sendo por isso importante que a composição dos alimentos, principalmente aqueles consumidos de forma abundante (como é o caso do ovo), seja estudada minuciosamente.

O aumento de produção que se tem vindo a registar aliado a um aumento da consciência, por parte do consumidor, acerca da proveniência dos alimentos que ingere, fazem dos tipos de criação de galinha (*Gallus gallus domesticus*) existentes, um tema de grande interesse nas ciências da nutrição.

Como alimento, o ovo apresenta um perfil interessante para uma dieta, mais do que adequada, óptima. Para além de uma fonte de proteína de alto valor biológico apresenta também dos valores mais elevados de vitamina D nos alimentos.

Uma questão que tem vindo a ganhar destaque na nutrição é a influência da dieta dos animais no perfil nutricional dos alimentos que deles originam. E consequentemente, como esses alimentos influenciarão a saúde do consumidor. Visto que a galinha poedeira possui (regulamentados) vários tipos de criação, trata-se do animal ideal para estudos desta natureza. Ainda por mais sendo um deles o tipo de criação “biológica” que tanto destaque tem ganho, não só na literatura científica como comercialmente.

O objectivo deste projecto será então analisar a composição lipídica de ovo provenientes dos quatro tipos de criação existentes, de acordo com o número correspondente referido na embalagem e no ovo (0- “biológico”, 1- “ao ar livre”, 2- “no

Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes tipos de criação

solo”, 3- “gaiolas melhoradas”). Essa análise será feita através de HPLC-MS (cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massa) com o intuito de investigar se a escolha deste tipo de alimentos é, para além de ética, nutricionalmente fundamentada.

Palavras-chave: ovos, composição lipídica, criação, extracção.

## **Abstract**

### **Lipid composition analysis of eggs from hens (*Gallus gallus domesticus*) from different rearing systems.**

This project is being developed in collaboration with the Centro de Química Estrutural of the IST (Instituto Superior Técnico of Lisbon) namely with the lipidomics group. Here is described the laboratory work that was done in order to extract the lipid fraction of the egg along with other analysis procedures still to be done.

Food composition data has various utilities. That being, it is important that food composition, especially that of the most consumed foods, is studied thoroughly.

The rise in egg production combined with the growth of consumer consciousness in respect to the origin of consumed foods, makes this topic one of great interest in the nutrition sciences.

As food, the egg presents itself with an interesting profile for an optimum diet, rather than simply an adequate one. Not only is it a source of protein of high biological value as it constitutes one of the highest sources of vitamin D in foods. Although many of the benefits associated with the consumption of eggs, they represent various concerns to the consumer (namely: nutritional, bacteriological and ethic).

One subject of rising discussion in the field of nutrition is the impact of animal feed in the nutrition quality of products thereof. And consequently, the impact of those products in the consumer's health.

Having in mind that the laying hen has various (regulated) rearing systems, it is the perfect animal for studies of this nature. More so, considering that one of those is the organic system. A type of production of growing interest, not only in scientific terms but also commercially.

Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes tipos de criação

The aim of this study will be to analyze the lipid composition of eggs from the four rearing systems available, according to the specific number in the box and in the egg itself (0- “organic”, 1- “free-range”, 2- “Barn”,3- “Cages”).

This analysis will be made by HPLC-MS (High performance liquid chromatography coupled to Mass Spectrometry), with the purpose of investigating if the choice of this products is, not only ethical, but also nutritionally grounded.

Keywords: eggs; hens; rearing system; extraction methods

## Índice

Agradecimentos .....	v
Resumo .....	vi
Abstract .....	viii
Índice .....	x
Índice de figuras.....	xi
Índice de tabelas e/ou quadros .....	xiii
Lista de abreviaturas e siglas .....	xii
Introdução.....	1
Objectivo.....	12
Metodologia.....	12
Conclusão e discussão.....	18
Bibliografia.....	22

## Índice de figuras

Fig. 1 - Composição em macronutrientes do ovo inteiro cru.....	3
Fig. 2 - Informação disponível no ovo quanto à sua origem. ....	8
Fig. 3 - Imagens das galinhas poedeiras nos respectivos sistemas de criação (com exceção do “biológico”).....	11
Fig. 4 - Formação de duas fases distintas no Método Bligh & Dyer modificado.....	14
Fig. 5 - Formação de duas fases distintas no método de extração lipídica por MTBE.....	16
Fig. 6 - Diagrama em bloco de um sistema HPLC-MS.....	18
Fig. 7 - Rácio ómega-6/ómega-3 de ovos relatado em diferentes estudos.....	20

## Índice de tabelas

Tabela 1 - Características gerais dos vários sistemas de produção de ovos .....	6
Tabela 2 - Percentagem (%) de galinhas criadas nos principais sistemas de produção em Inglaterra e País de Gales em três diferentes momentos.....	10

## **Lista de abreviaturas e siglas**

EUA - Estados Unidos da América

TCA - Tabela de Composição dos Alimentos Portuguesa

VRN- Valor de Referência do Nutriente

DHA - Ácido Docosahexanóico

OGM - Organismos Geneticamente Modificados

USDA - United States Department of Agriculture

MTBE - *Methyl Tert-Butyl Ether* (éter metil terc-butílico)

ANAPO - Associação Nacional dos Avicultores Produtores de Ovos

PDCAAS - *Protein Digestibility Corrected Amino acid Score*

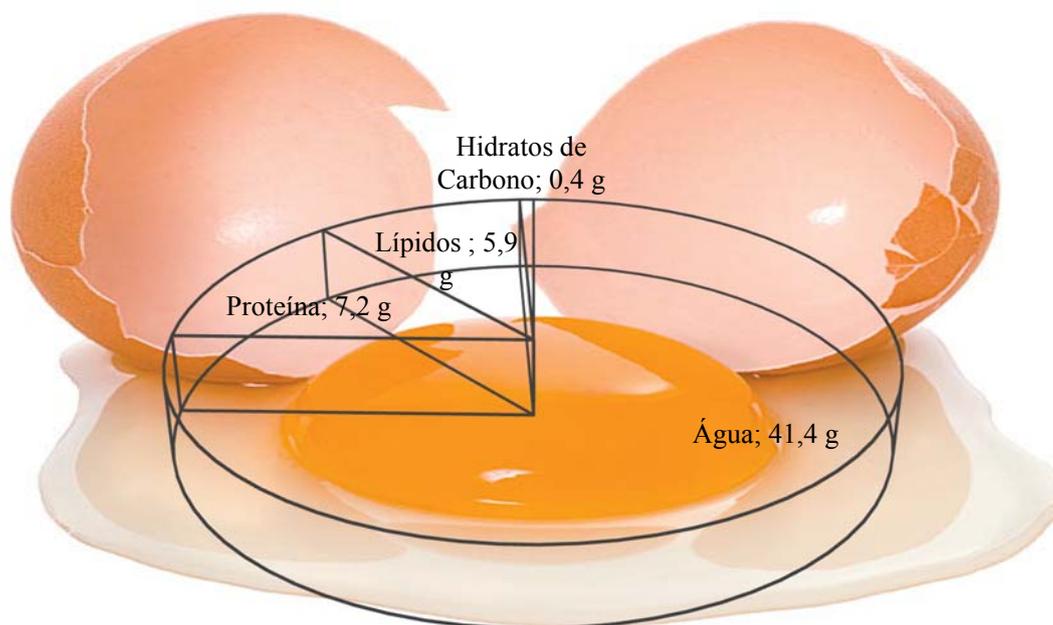
## 1. Introdução

Este projecto está a ser desenvolvido juntamente com o Centro de Química Estrutural do IST (Instituto Superior Técnico de Lisboa) nomeadamente com o grupo de lipidómica. Este grupo detém conhecimento e equipamento valiosíssimos, essenciais até, para a elaboração desta investigação. Talvez por isto, existam lá um número elevado de projectos a ser desenvolvidos. Isto faz com que o tempo definido para a elaboração do projecto final de licenciatura seja curto para que todas as questões a serem acordadas e desenvolvidas sejam concluídas. Aqui será relatado o trabalho laboratorial já realizado (aproximadamente 100 horas), para além daquele que ainda falta realizar.

Dados sobre a composição dos alimentos são de ampla relevância. Desde a epidemiologia, no que toca à relação alimento-doença (ou nutriente-doença), até ao aconselhamento nutricional (Almeida, Perassolo, Camargo, Bragagnolo, & Gross, 2006). Possibilitando nesta última, um maior rigor no registo alimentar e na elaboração de planos alimentares.

Os ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) são um dos alimentos mais produzidos e consumidos globalmente. Estimando-se que em 2015 a produção será na ordem das 72 milhões de toneladas (Nys et al, 2011), já o seu consumo *per capita per annum* ronda os 255 nos EUA e 186 em Portugal (“The World Egg Industry - a few facts and figures,” 2015).

Um ovo de tamanho médio (55 g) cru é constituído, segundo a Tabela da Composição dos Alimentos Portuguesa (TCA) (INSA, 2010), por aproximadamente 41,4 g de água, 7,2 g de proteína e 5,9 de lípidos, o que se traduz em aproximadamente 82 kcal. Apesar da TCA indicar 0 g de hidratos de carbono (provavelmente por arredondamento), a base de dados dos EUA (disponível *online* através do *site* nutritiondata.self.com) refere, mais pormenorizadamente, 0,4 g num ovo deste peso (Nutritiondata.self.com, 2014). (**Figura 1.**)



**Figura 1.** Composição em macronutrientes do ovo inteiro cru.

O ovo consiste também numa fonte económica de proteína (cerca de 0,16 € por 10 g de proteína) visto que meia dúzia custa um valor aproximado a 0,74€. Esta é uma proteína de alto valor biológico, apresentando um PDCAAS apenas inferior ao do leite (Schaafsma, 2000).

Este macronutriente é conhecido por ter um efeito pronunciado na saciedade pós-prandial (Holt, Miller, Petocz, & Farmakalidis, 1995) daí refeições que contenham este alimento tenham demonstrado uma menor variação plasmática de glucose e de insulina (devido também ao baixo índice glicémico do ovo) e levam a uma redução da ingestão energética nas refeições seguintes (Pombo-Rodrigues, Calame, & Re, 2011; Ratliff et al, 2010).

A sua possível acção protectora na sarcopenia e na diminuição do risco de diabetes tipo II, deve-se à elevada concentração de leucina no ovo (Nutritiondata.self.com, 2014) e ao papel que este aminoácido desempenha metabolicamente (Leenders & van Loon, 2011). Talvez também por isto, o ovo se apresenta como alimento de destaque em dietas onde se pretenda um aumento ou manutenção da massa magra, como é o caso dos atletas. Para além da leucina, o ovo contém os aminoácidos isoleucina e valina em considerável quantidade (1,5 g por ovo (Nutritiondata.self.com, 2014)), constituindo estes três, os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA), usados frequentemente por atletas na forma de suplemento alimentar (Negro et al, 2008).

Quanto aos lípidos, dos 5,9 gramas correspondentes a este macronutriente, a sua maioria são ácidos gordos monoinsaturados (2,1 g), 1,5 g correspondem a ácidos gordos saturados (principalmente ácido palmítico) e cerca de 1,2 g são ácidos gordos polinsaturados (INSA, 2010).

No que toca a vitaminas e minerais, destaca-se a vitamina D, com 1,7 µg (INSA, 2010) (34% do VRN (CE, 2011) ). Para além de vitamina D<sub>3</sub> (colecalfiferol), o ovo possui também a sua forma parcialmente activada, 25-hidroxicolecalciferol, sendo inclusive a melhor fonte alimentar desta última (Browning & Cowieson, 2014). É também uma boa fonte de selénio, com cerca de 16 µg (Nutritiondata.self.com, 2014) (29 % do VRN) e fósforo, com 101 mg (INSA, 2010) (14% do VRN).

Destacam-se também a zeaxantina e a luteína, os principais carotenóides no ovo, fazendo parte de uma classe denominadas xantofilas (carotenóides que contêm um grupo hidróxilo) (Nys et al, 2011), estes são essenciais na saúde visual (Goodrow et al, 2006). Para além destas substâncias antioxidantes presentes na gema, também na clara existem compostos com esse potencial, nomeadamente a ovoalbumina e a lisozima (Nimalaratne, Lopes-Lutz, Schieber, & Wu, 2012).

A influência da dieta das galinhas, na composição de ácidos gordos dos respectivos ovos relatada por Beynen (Beynen, 2004), conduzem, por um lado, para uma reflexão acerca da qualidade da alimentação prestada aos animais que consumimos e o efeito dessa na composição nutricional dos alimentos provenientes desse animal. Por outro

lado, as implicações, a nível nutricional, que esses alimentos terão na saúde do consumidor. Particularmente quanto a uma questão que tem sido levantada, a do rácio de ácidos gordos ómega-6/ómega-3 da dieta humana actual (Simopoulos, 2006; Simopoulos, 2011; Simopoulos, 2008).

Apesar do consenso sobre o rácio óptimo ainda não ter sido atingido (Simopoulos, 2000), parece claro e consensual que o rácio actual de aproximadamente 16 está desproporcional e implicado em várias patologias, desde a obesidade à depressão (Simopoulos, 2006). Neste sentido vários autores decidiram estudar os diferentes sistemas de criação existentes e como estes influenciam a proporção de ácidos gordos nos ovos. Enquanto uns encontraram, em ovos de galinhas criadas em sistemas alternativos, ou que tivessem acesso a pasto, uma variação benéfica desta proporção, expressando-se num menor rácio ómega-6/ómega-3 anteriormente referido (Karsten, Patterson, Stout, & Crews, 2010; Mugnai et al., 2014; Simopoulos & Salem Jr, 1989) outros não o verificaram (Hidalgo, Rossi, Clerici, & Ratti, 2008; Matt, Veromann, & Luik, 2009; Samman et al., 2008). Esta variação deve-se em grande parte à concentração de DHA nos ovos, o principal ácido gordo ómega-3 neste alimento. Sendo que alguns estudos reportam valores na ordem dos 14 mg por ovo (Mugnai et al., 2014) outros chegam aos 80 (Karsten et al., 2010) ou até 105 mg por ovo (Artemis P Simopoulos & Salem Jr, 1989).

Para além dos ácidos gordos, também a vitamina D e o colesterol apresentam variações com o tipo de criação da galinha. Quanto à primeira, apesar da fortificação da ração das galinhas (Browning & Cowieson, 2014) ser uma melhor estratégia do que a exposição solar aquando da criação “ao ar livre” (Kühn, Schutkowski, Kluge, Hirche, & Stangl, 2014), esta última poderá ser mais económica para o produtor e apresentar benefícios extra resultantes do consumo de pasto e insectos (Lopez-Bote et al., 1998). Quanto ao colesterol, este parece superior em ovos de origem “biológica” (Matt et al., 2009; Mugnai et al., 2014).

Para além da questão nutricional, existe um aumento de consciência do consumidor com o bem-estar animal, aumentando assim a procura por sistemas de produção alternativos.

O custo de produção de ovos oriundos de galinhas criadas “ao ar livre” é cerca de 50% superior à produção convencional (“gaiolas melhoradas”) (Nys et al, 2011), o que se reflecte em igual dimensão no custo para o consumidor. Porém é o modo de produção biológica, o mais dispendioso dos quatro sistemas de produção existentes (“0-biológico”, “1- criação no solo”, “2- criação ao ar livre” e “3- criação em gaiolas melhoradas”).

A produção e aquisição de produtos de origem biológica é uma das maiores tendências de mercado do nosso tempo (Allen & Kovach, 2000). Nos EUA foi estimado um valor de vendas próximo dos 27 mil milhões de dólares no ano de 2011, quase dez vezes mais do reportado em 1997 (Smith-Spangler et al, 2012). Em Portugal, só no ano de 2011 o aumento de área cultivada rondou os 60% (TVI24, 2012). Sendo que em 1998 a área destinada a agricultura biológica rondava os 0,3% e em 2011 esse número era próximo de 2,5 (PORDATA, 2015).

No que toca aos tipos de produção de ovos de galinha em Portugal e nos restantes estados membro da União Europeia, consideram-se dois grandes grupos (ANAPO, 2015):

- Sistema de gaiolas, tal como o nome indica, aqui as galinhas são criadas em pavilhões com baterias;
- Sistemas de produção no solo (ou alternativos), onde se incluem as “galinhas criadas no solo”, “galinhas criadas ao ar livre” e “modo de produção biológico”.

Cada um destes quatro tipos de criação de galinhas para obtenção de ovos possui características próprias (**Tabela 1.**) sendo inclusive denominados por um código na informação presente no ovo (**Figura 2.**).

**Tabela 1.** Características gerais dos vários sistemas de produção de ovos.

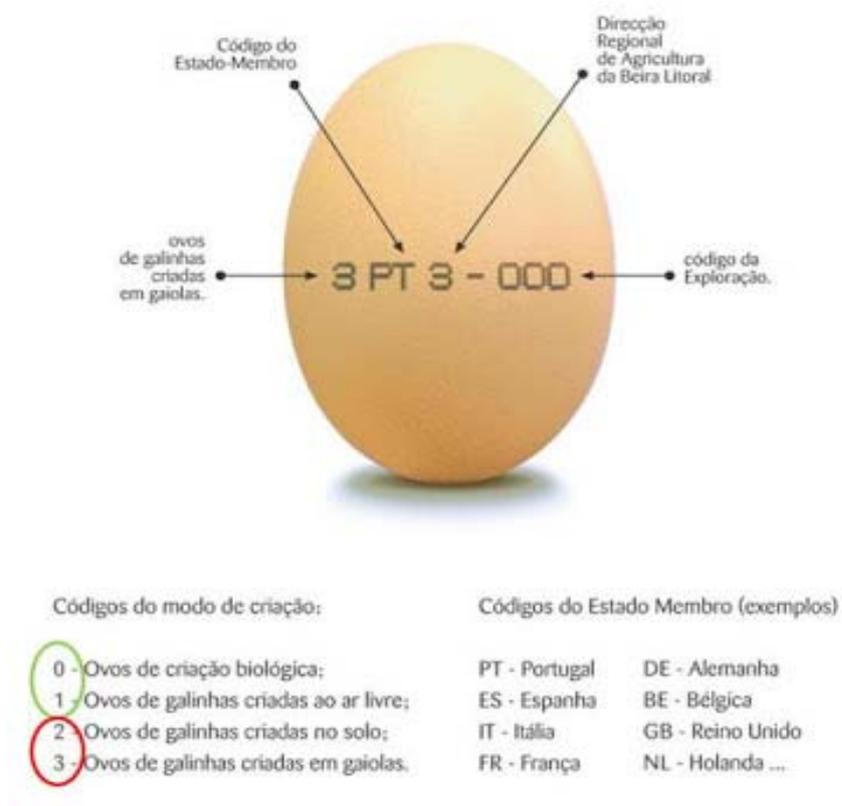
Código – Tipo de produção	Espaço mínimo por galinha (cm <sup>2</sup> )	Outras Características
0 – Produção biológica	1667 (ou 6 galinhas por m <sup>2</sup> )	Proibido enjaulamento; Exploração composta por galinheiros (para descanso e postura) e pátios; Acesso contínuo a espaços ao ar livre, o terreno a que as galinhas têm acesso deve estar essencialmente coberto de vegetação e não deve ser utilizado para outros fins; Proibido o uso de OGM*; Alimentação fornecida deve ser de produção biológica; Não permitida a utilização de medicamentos alopáticos de origem sintética; Minimizar operações que impliquem sistematicamente estados de <i>stress</i> , danos físicos, doenças ou sofrimentos;

1 – Produção ao ar livre	1111 (ou 9 galinhas por m <sup>2</sup> )	Proibido enjaulamento; Exploração composta por galinheiro (para descanso e postura) e pátios; Acesso contínuo a espaços ao ar livre, o terreno a que as galinhas têm acesso deve estar essencialmente coberto de vegetação e não deve ser utilizado para outros fins;
2 – Produção no solo	1111 (ou 9 galinhas por m <sup>2</sup> )	Proibido enjaulamento; Um chão construído de modo a poder suportar de forma adequada cada uma das garras anteriores de cada pata.
3 – Produção em gaiolas	750	Altura mínima da gaiola para além da altura sobre a superfície utilizável de 20 cm em qualquer dos pontos; Corredores com uma largura mínima de 90 cm entre os blocos de gaiolas e um espaço de, pelo menos, 35 cm entre o chão do edifício e as gaiolas dos blocos inferiores de forma a facilitar a inspeção, instalação e retirada das aves.

---

Adaptado de: Associação Nacional dos Avicultores Produtores de Ovos (ANAPO) e Decreto-Lei n.º 72-F/2003 de 14 de Abril.

Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes tipos de criação



**Figura 2.** Informação disponível no ovo quanto à sua origem. Fonte: Associação Nacional dos Avicultores Produtores de Ovos (ANAPO).

O Decreto-Lei n.º 72-F/2003 de 14 de Abril (DL 72-F,2003) transpõe para ordem jurídica nacional a Directiva n.º 1999/74/CE (CE, 1999) que vem distinguir três sistemas de criação (todos os referidos anteriormente menos o modo de produção biológica). Este documento consegue assim uniformizar as condições de produção de ovos para todos os estados-membros.

Quanto ao modo de produção biológica, este está previsto em dois Regulamentos (Reg. (CE) n.º 1804/1999 (CE, 1999) e Reg. (CE) n.º 2092/91 (CE, 1991)).

Na União Europeia as condições de criação das galinhas parecem estar bem definidas. Ao contrário de outros países onde a informação e legislação sobre os tipos de criação é escassa, estando essa questão mais assente em certificações externas do que em legislações nacionais. Isto é o caso do *National Organic Program do United States Department of Agriculture* (USDA, 2015) que define as normas para produção de ovos biológicos, sendo estas semelhantes ao existente na União Europeia (Rakonjac et al, 2014). Similarmente ao que acontece nos EUA com a USDA, na Austrália existe a certificação *Australian Certified Organic* ou a *Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals*. Ambas apresentam padrões a serem seguidos para respectiva aprovação. Porém, enquanto em Portugal existe o Decreto-Lei já referido, nesse país da Oceânia a principal organização de defesa dos animais, a “*Animals Australia*”, refere que não existem nesse país critérios solidamente definidos e com rigor legal para diferenciar os sistemas de produção (Animals Australia, 2015). Este factor acaba por comprometer a investigação semelhante a este projecto, realizada nesse país com base nos ovos disponíveis comercialmente. Como é o caso do trabalho de Samman e colegas (Samman et al, 2008).

Nas últimas décadas a produção aviária sofreu uma maior intensificação na produção do que qualquer outra vertente de produção animal (Cooper, Leifert, & Niggli, 2007). Isto é possível de ver pelo trabalho de Tolan e colegas (Tolan et al, 1974) realizado em 1974, onde se vislumbra um aumento na produção do sistema em gaiolas no Reino Unido.

A criação neste tipo de sistema é caracterizada por um espaço confinado, ventilação e iluminação artificial, sendo as galinhas submetidas a variados produtos de higiene e manutenção (Rakonjac et al, 2014).

**Tabela 2.** Percentagem (%) de galinhas criadas nos principais sistemas de produção em Inglaterra e País de Gales em três diferentes momentos.

Sistema de criação	1956	1962-1963	1970-71
“Ao ar livre”	43,8	21,0	5,8
“Em gaiolas”	14,8	27,0	84,6
“No solo”	41,4	52,0	9,6

Adaptado de Tolan *et al* (Tolan et al, 1974).

No entanto desde há algum tempo a esta parte, o número de galinhas criadas em sistemas alternativos na Europa começou a evoluir, de 10 milhões em 1991 para 39 milhões em 2012. Sendo de esperar que este número aumente (Schoeters & Hoogenboom, 2006).

Um dos factores que contribui para o aumento dos sistemas de produção alternativos foi a proibição, por parte da União Europeia (CE, 1999), das gaiolas tradicionais e a obrigatoriedade, a partir do dia 1 de Janeiro de 2012, de se usar gaiolas “melhoradas”.

As galinhas de criação “ao ar livre” como o nome indica, devem ter acesso a espaços exteriores e que estes estejam maioritariamente cobertos por vegetação, devendo existir pelo menos 1 m<sup>2</sup> de espaço por galinha nessa zona (Schoeters & Hoogenboom, 2006).

Esse acesso a luz solar e a espaços amplos traduz-se numa melhor saúde e menor *stress* ambiental para o animal (Lay et al, 2011). Este sistema poderá também beneficiar a

Análise da composição lipídica de ovos de galinha (*Gallus gallus domesticus*) oriundos de diferentes tipos de criação

dieta das galinhas, visto que têm ao seu dispor (para além da sua ração normal) erva, insectos, minhocas, entre outros.

Conclui-se então que o enjaulamento das galinhas impede o normal comportamento destes animais, enquanto na criação ao “ar livre” estas mostram sinais típicos de calma e conforto (Miao, Glatz, & Ru, 2005).



1- Ao ar livre



2- No solo



3- Gaiolas melhoradas

**Figura 3.** Imagens das galinhas poedeiras nos respectivos sistemas de criação (com excepção do “biológico”).Fonte: Associação Nacional dos Avicultores Produtores de Ovos (ANAPO, 2015).

O modo de criação biológico na Europa, que no ano 2000 viu a sua produção chegar aos 1,3 % do total de ovos produzidos (Schoeters & Hoogenboom, 2006), é semelhante ao de criação ao ar livre mas com restrições no que toca à alimentação, medicação e outros factores. Por exemplo, as galinhas devem ter acesso ao exterior durante todo o ano e a alimentação deve ser de origem biológica certificada (Schoeters & Hoogenboom, 2006), Estando proibido o uso de suplementos sintéticos ou outras substâncias desta natureza (Minelli et al, 2010).

## 2. Objectivo

Com este projecto pretende-se determinar a composição lipídica de ovos (classe A tamanho M), provenientes dos quatro tipos de criação disponíveis comercialmente. Utilizando para essa análise o método HPLC-MS. Estes ovos irão ser adquiridos em várias superfícies comerciais da zona de Lisboa, Portugal. Este projecto tem como objectivo primário investigar se a escolha de ovos oriundos de sistemas é, para além de ética, nutricionalmente fundamentada.

De forma a responder eficazmente a essa questão, existem alguns compostos presentes na fracção lipídica do ovo que são de especial interesse. São eles: o ácido palmítico, o principal ácido gordo saturado no ovo; o DHA, principal ácido gordo ómega-3, e rácio ómega-6/ómega-3. Sendo que, caso seja possível, pretende-se também analisar outros componentes presentes na fracção lipídica (vitaminas D e E, e colesterol).

## 3. Metodologia

De forma a proceder à análise da composição lipídica de um alimento, é necessário a extracção da fracção lipídica deste, separando-a o melhor possível da restante matriz. Para essa extracção existem dois métodos clássicos, reportados pela primeira vez há mais de 50 anos atrás. O método Bligh & Dyer (Bligh & Dyer, 1959) e o método de Folch (J. Folch, Lees, & Slone Stanley, 1957), porém apenas o primeiro se destinava originalmente a alimentos. No seu trabalho, Bligh & Dyer referem mesmo que o seu método não só exigia menos volume de solventes como era mais rápido que o de Folch.

Estes métodos baseiam-se nas diferenças de densidade entre os solventes. Dado que o clorofórmio apresenta maior densidade relativamente à mistura de água/metanol, são formadas duas fases. Estando na fase inferior a fase orgânica (onde estão contidos os lípidos) (Matyash, Liebisch, Kurzchalia, Shevchenko, & Schwudke, 2008).

Para analisar apenas a concentração de lípidos num alimento (ou outra matriz) existe a extracção de Soxhlet. Esta utiliza solventes a temperaturas relativamente elevadas o que o torna inadequado para amostras onde se pretende a mínima oxidação dos componentes lipídicos existentes.

De seguida pode-se observar o protocolo usado para a elaboração do método Bligh & Dyer modificado (tal como referido por Schreiner (Schreiner, 2006)) no laboratório de química da Universidade Atlântica e seguidamente a formação das duas fases referidas anteriormente (**Figura 4.**)

Protocolo do método Bligh & Dyer modificado:

1. Adicionar 1 ml de água destilada a 1 g de gema;
2. Depois de agitar, adicionar ao tubo de ensaio 2 ml de clorofórmio e 4 ml de metanol;
3. Levar ao agitador durante 90 segundos e de seguida adicionar mais 2 ml de clorofórmio;
4. Agitar durante mais 30 segundos e adicionar 2 ml de água destilada;
5. Agitar novamente (5 segundos) e de seguida centrifugar a 1100 rpm durante 10 min;
6. Recuperar a fase inferior;
7. Lavar a fase superior com 4 ml de clorofórmio (introduzir no tubo de ensaio);
8. Centrifugar novamente;
9. Recuperar a fase inferior;
10. Repetir passos 7,8 e 9 para assegurar a máxima extracção;
11. Introduzir a fase inferior num balão de fundo redondo;
12. Remover os solventes (clorofórmio, metanol e água) através do evaporador rotativo (40 °C), evitando usar pressões inferiores a 330 mbar até que os solventes tenham visualmente desaparecido (de forma a evitar a formação de espuma);
13. Reduzir a pressão para 190 mbar de forma a remover mais eficazmente os solventes;

14. Redissolver em 5 ml de acetona.



**Figura 4.** Formação de duas fases distintas no Método Bligh & Dyer modificado.

Durante as décadas que viriam, estes dois métodos seriam usados e citados sempre que alguma investigação exigia a extracção de lípidos para posterior análise da sua composição. Até que em 2008, Matyash e colegas (Matyash et al, 2008) apresentam um método de extracção que obriga ao uso de *methyl tert-butyl ether* (MTBE) ou em português, éter metil terc-butílico. Este método requer a adição de metanol e MTBE (1,5:5, v/v) à amostra, sendo a separação de fases induzida pela adição de água.

Ao contrário das técnicas de Folch e Bligh & Dyer, nesta técnica a fase orgânica apresenta-se como fase superior (dada a baixa densidade do solvente), o que facilita a extracção. Para além disso, o MTBE apresenta um perfil de utilização muito mais seguro do que o clorofórmio, este último apresenta elevada toxicidade e potencial carcinogénico (Ruch, Klaunig, & Schultz, 1986). Matyash e colegas reportam com este método uma extracção mais eficiente, assim como adequabilidade para análise de espectrometria de massa, que é o que se pretende neste projecto.

Dadas as inúmeras vantagens deste método em relação aos métodos clássicos, neste trabalho a extracção da fracção lipídica da gema de ovo irá ser realizada com base no método de extracção com MTBE.

Segue-se o protocolo desenvolvido com base no descrito por Matyash e colegas (Matyash et al, 2008) e de seguida a formação de ambas as fases neste método (**Figura 5.**), este também realizado no laboratório de química da Universidade Atlântica:

Protocolo para extracção lipídica da gema do ovo por MTBE:

1. Adicionar 1,5 mL de metanol a um tubo de ensaio de plástico com 0,2 g de gema de ovo;
2. Tapar o tubo de ensaio com uma tampa de teflon;
3. Levar o tubo ao vortex;
4. Adicionar 5 ml de MTBE à mistura;
5. “Incubar” a mistura durante cerca de 1 hora à temperatura ambiente num agitador (=shaker);
6. Adicionar 1,25 mL de água e centrifugar a amostra a 1000 g durante 10 min;
7. A fase orgânica (superior) é obtida e a outra fase (inferior) recuperada usando 2 mL de MTBE/metanol/água (10/3/2,5 v/v/v);
8. Combinando a parte extraída e recuperada procede-se à secagem numa centrifugadora em vácuo.



**Figura 5.** Formação de duas fases distintas no método de extracção lipídica por MTBE.

A fase seguinte (ainda não efectuada devido ao descrito na nota introdutória), consiste na preparação da amostra e posterior análise por HPLC-MS (cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massa). HPLC, como o nome indica, é uma técnica cromatográfica em que a fase móvel é composta por um solvente líquido (Skoog, 2013).

Dada a elevada pressão utilizada, o equipamento de HPLC é mais complexo e dispendioso comparativamente a outros tipos de cromatografia (Skoog, 2013). Trata-se, segundo alguns autores (Teale, 2006), da técnica mais versátil para análise de ácidos gordos apresentando um elevado potencial para este efeito (McDonald & Mossoba, 1997). No entanto a cromatografia gasosa continua a ser a mais usada, por ser, em termos globais, a melhor técnica para a separação, quantificação e identificação de ácidos gordos (Teale, 2006).

Do ponto de vista analítico, existem vários factores a ter em conta. Desde a técnica de injeção da amostra à temperatura e colunas de cromatografia utilizadas (Teale, 2006).

Já da perspectiva dos ácidos gordos presentes na amostra e que se pretende analisar, é necessário ter em atenção a auto-oxidação destes, particularmente os insaturados (como o DHA) pois este fenómeno aumenta com o número de duplas ligações presentes (Teale, 2006).

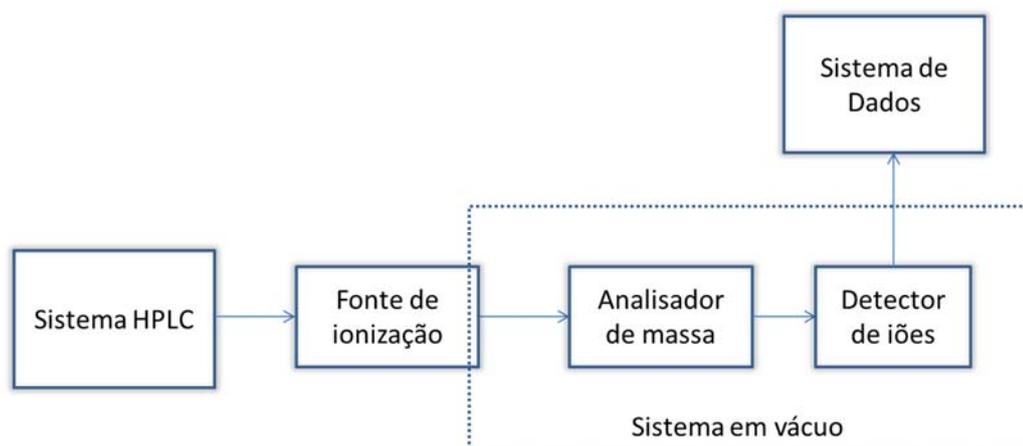
Já a espectrometria de massa, é um método amplamente usado para determinar estruturas em moléculas complexas, de forma a conseguir identificar as diferentes moléculas existentes numa dada amostra (Skoog, 2013).

O aparelho utilizado para este fim, o espectrómetro de massa, trata de converter os analitos em iões. Esses iões são depois separados com base no seu rácio massa/carga ( $m/z$ ), posteriormente identificados e por fim formado o espectro de massa dos iões (separados e identificados na amostra) (Skoog, 2013).

Apesar da composição em ácidos gordos ser o principal objectivo, existem outros compostos integrantes da fracção lipídica que seriam interessantes de analisar, nomeadamente o colesterol e a vitamina D.

A análise de vitamina D em alimentos de origem animal, como o ovo, deve ter em atenção também a 25-hidroxivitamina D<sub>3</sub>, visto que tal, como já foi referido, esta forma contribui bastante para a actividade da vitamina (Nollet & Toldrá, 2012). A sua análise no ovo pode ser realizada também por HPLC usando um detector de absorvância (Nollet & Toldrá, 2012). Também o colesterol no ovo pode ser analisado com excelente precisão através de HPLC (Dinh et al, 2011).

Com estes dois aparelhos acoplados, o espectrómetro de massa poderá identificar as espécies à medida que estas eluem das colunas cromatográficas (Skoog, 2013) (**Figura 6**).

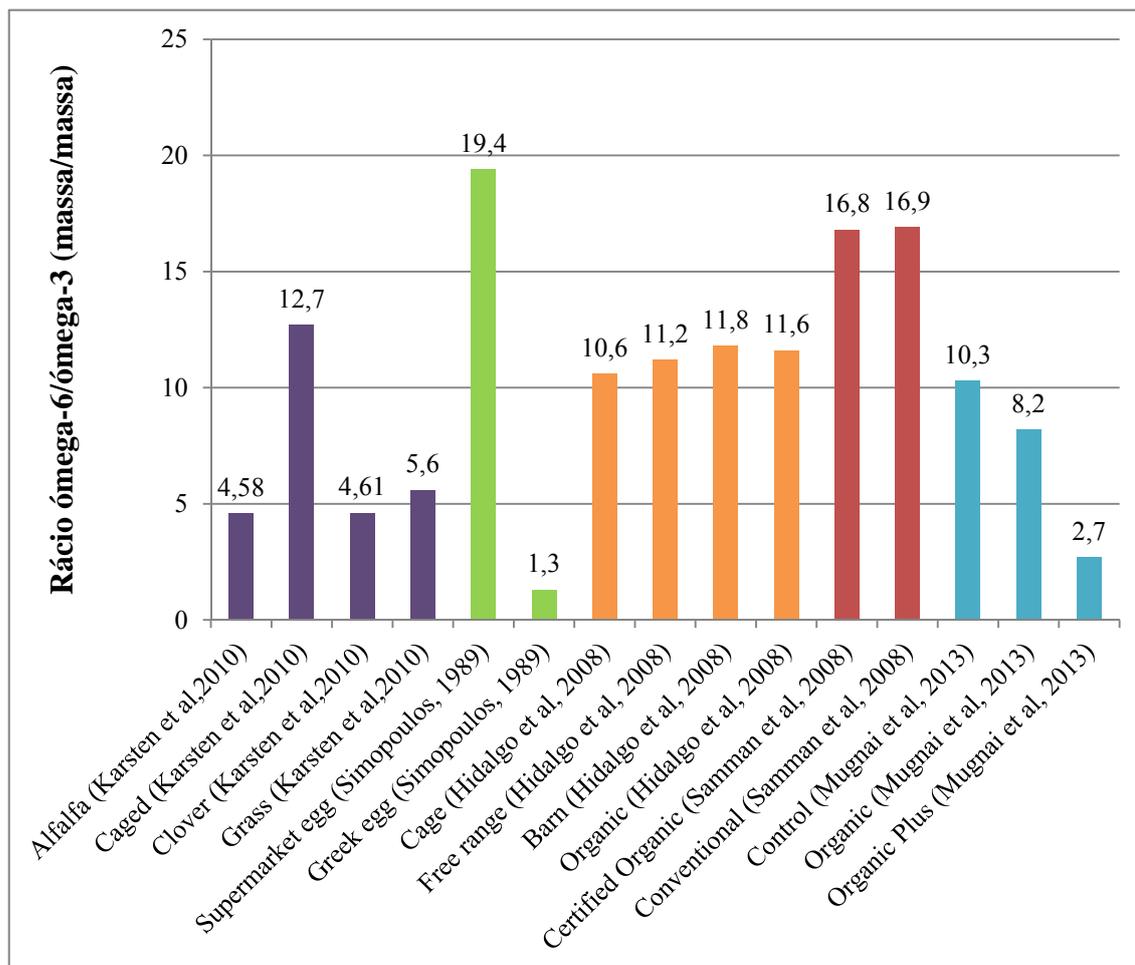


**Figura 6.** Diagrama em bloco de um sistema HPLC-MS. Adaptado de Skoog et al (Skoog, West, Holler, & Crouch, 2004).

#### 4. Discussão e conclusão

Segundo alguns autores (Cooper et al, 2007), existem poucos estudos efectuados relativamente à qualidade nutricional de ovos provenientes de diferentes sistemas de criação. Porém, o interesse e investigação relativamente à composição química de ovos de galinhas criadas em diferentes condições surgiu há mais de 40 anos no Reino Unido (Tolan et al, 1974). Desde então foram realizados outros estudos de forma a investigar os diferentes ambientes onde as galinhas podiam ser criadas (ou tipos de criação) e a influência na composição nutricional dos respectivos ovos.

Apesar do conhecimento das concentrações de diferentes ácidos gordos polinsaturados ser importante e ser uma das questões fundamentais a serem estudadas nos vários artigos que englobam esta temática, incluindo o deste projecto, o rácio ómega-6/ómega-3 fornece um valor intuitivo que deriva da diferente concentração destes. Pela variação existente nos estudos relativamente a este rácio (**Figura 7.**) torna-se difícil prever os resultados desta análise, tornando-os assim ainda mais interessantes e dignos de escrutínio.



**Figura 7.** Rácio ômega-6/ômega-3 de ovos relatado em diferentes estudos.

Considerando exclusivamente os estudos referidos na figura anterior, é preciso referir que tanto no trabalho de Karsten e colegas (Karsten et al., 2010) como no de Mugnai e colegas (Mugnai et al., 2014) a alimentação das aves é conhecida, algo que, ao estudar os ovos comprados numa superfície comercial, não acontece.

No estudo de Simopoulos e colegas (Simopoulos & Salem Jr, 1989), as galinhas de onde eram provenientes os ovos do grupo “*Greek eggs*” tinham uma criação “ao ar livre” muito particular o que dificulta comparações com os resultados a obter neste estudo. Já no de Samman e colegas (Samman et al., 2008) existem as limitações referidas anteriormente, acerca da regulamentação deste alimento na Austrália, para além de uma selecção da amostra comprometedor dos resultados por estes autores. Isto é, no grupo de ovos “*conventional*” foram inseridos ovos com a designação “de

gaiolas”, “ ao ar livre” e o equivalente a criação “no solo” (*barn-laid*), isto poderá ter implicado uma grande diversidade na qualidade dos ovos neste grupo.

Visto isto, a comparação directa é apenas possível com o trabalho de Hidalgo e colegas (Hidalgo et al., 2008). Inclusive este é realizado em Itália, onde os ovos disponíveis comercialmente se apresentam também sobre o alcance das regulamentações Europeias já referidas.

Esta investigação surge no mesmo ano em que Matyash e colegas (Matyash et al., 2008) desenvolvem o seu método de extracção lipídica que demonstra uma extracção semelhante ou melhor que os métodos clássicos (Bligh & Dyer, 1959; Jordi Folch, Lees, & Stanley, 1957). Os últimos, usados no trabalho de Hidalgo e colegas. O que se traduz numa possível vantagem do método a usar neste projecto.

Este projecto a realizar em parceria com o IST de Lisboa apresenta também limitações. Tal como já foi referido, a cromatografia gasosa (usado na investigação de Hidalgo e colegas e na maioria das outras investigações sobre esta temática) é a melhor técnica para a análise de ácidos gordos (Teale, 2006). Apesar do HPLC (a ser utilizado neste projecto) ser também uma escolha válida.

Este projecto reúne várias componentes de interesse:

- Um alimento abundantemente consumido globalmente;
- Uma das indústrias de produção alimentar mais polémicas pela intensa exploração a que os animais são sujeitos, levantando questões éticas;
- Um modo de produção (biológico) que ganha cada vez mais adeptos, sendo visto como sinal de qualidade;
- Um rácio de ácidos gordos polinsaturados que parece estar na base de várias patologias;
- E finalmente, um método de extracção lipídica mais eficiente que os tradicionais.

Como nota final, num aspecto é possível concordar com Rakonjac e colegas (Rakonjac et al., 2014) autores do único artigo de revisão sobre esta temática, é que a investigação futura deve-se focar na qualidade nutricional dos ovos provenientes de diferentes sistemas, sendo esse mesmo o objectivo deste projecto.

## 5. Bibliografia

- Allen, P., & Kovach, M. (2000). The capitalist composition of organic: The potential of markets in fulfilling the promise of organic agriculture. *Agriculture and Human Values*, 17(3), 221–232. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1023/A:1007640506965> <http://www.springerlink.com.proxy1.lib.umanitoba.ca/content/v44t1v72r6238612/fulltext.pdf>
- Almeida, J. C. De, Perassolo, M. S., Camargo, J. L., Bragagnolo, N., & Gross, J. L. (2006). Fatty acid composition and cholesterol content of beef and chicken meat in Southern Brazil, 42.
- ANAPO. (n.d.). Informações ao consumidor. Retrieved August 1, 2015, from <http://www.anapo.pt/sistprodovos.php>
- Australia, A. (n.d.). Making sense of egg labels. Retrieved August 10, 2015, from <http://www.makeitpossible.com/guides/egg-labels.php>
- Beynen, A. C. (2004). Fatty acid composition of eggs produced by hens fed diets containing groundnut, soya bean or linseed. *NJAS-Wageningen Journal of Life Sciences*, 52(1), 3–10.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917. doi:10.1139/o59-099
- Browning, L. C., & Cowieson, A. J. (2014). Vitamin D fortification of eggs for human health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 1389–96. doi:10.1002/jsfa.6425
- CE. (n.d.-a). DIRECTIVA 1999/74/CE DO CONSELHO de 19 de Julho de 1999. Retrieved from <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1999:203:0053:0057:PT:PDF>
- CE. (n.d.-b). REGULAMENTO (CE) N. o 1804/1999 DO CONSELHO de 19 de Julho de 1999. Retrieved from

<http://www.proder.pt/ResourcesUser/Legisla%C3%A7%C3%A3o/Comunit%C3%A1ria/Regulamenton%C2%BA1804-99.pdf>

CE. (n.d.-c). Regulamento (CEE) nº 2092/91 do Conselho, de 24 de Junho de 1991, relativo ao modo de produção biológico de produtos agrícolas e à sua indicação nos produtos agrícolas e nos géneros alimentícios. Retrieved August 10, 2015, from <http://www.proder.pt/ResourcesUser/Legisla%C3%A7%C3%A3o/Comunit%C3%A1ria/Regulamenton%C2%BA2092-91.pdf>

CE. (2011). REGULAMENTO (UE) Nº 1169/2011 DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO. Retrieved from <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:304:0018:0063:PT:PDF>

Cooper, J., Leifert, C., & Niggli, U. (2007). *Handbook of organic food safety and quality*. Elsevier.

Decreto-Lei n.º 72-F/2003 de 14 de Abril. (2003). Retrieved September 10, 2015, from [http://www.drapc.min-agricultura.pt/drapc/servicos/licenciamento/files/decreto\\_72\\_f\\_2003.pdf](http://www.drapc.min-agricultura.pt/drapc/servicos/licenciamento/files/decreto_72_f_2003.pdf)

Dinh, T. T. N., Thompson, L. D., Galyean, M. L., Brooks, J. C., Patterson, K. Y., & Boylan, L. M. (2011). Cholesterol Content and Methods for Cholesterol Determination in Meat and Poultry. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(5), 269–289. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00158.x

Folch, J., Lees, M., & Slone Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13428781>

Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226, 497–509. doi:10.1007/s10858-011-9570-9

Goodrow, E. F., Wilson, T. a, Houde, S. C., Vishwanathan, R., Scollin, P. a, Handelman, G., & Nicolosi, R. J. (2006). Consumption of one egg per day increases serum lutein and zeaxanthin concentrations in older adults without altering serum lipid and lipoprotein cholesterol concentrations. *The Journal of Nutrition*, 136, 2519–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16988120>

Hidalgo, A., Rossi, M., Clerici, F., & Ratti, S. (2008). A market study on the quality characteristics of eggs from different housing systems. *Food Chemistry*, 106, 1031–1038. doi:10.1016/j.foodchem.2007.07.019

- Holt, S. H., Miller, J. C., Petocz, P., & Farmakalidis, E. (1995). A satiety index of common foods. *European Journal of Clinical Nutrition*, *49*, 675–690. doi:10.3109/03008207.2013.862527
- INSA. (2010). Tabela da composição dos alimentos portuguesa - Ovo (de galinha) inteiro cru. Retrieved October 13, 2015, from <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/DetalleAlimento.aspx?ID=IS083>
- Karsten, H. D., Patterson, P. H., Stout, R., & Crews, G. (2010). Vitamins A, E and fatty acid composition of the eggs of caged hens and pastured hens. *Renewable Agriculture and Food Systems*, *25*, 45. doi:10.1017/S1742170509990214
- Kühn, J., Schutkowski, A., Kluge, H., Hirche, F., & Stangl, G. I. (2014). Free-range farming: a natural alternative to produce vitamin D-enriched eggs. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, *30*, 481–4. doi:10.1016/j.nut.2013.10.002
- Lay, D. C., Fulton, R. M., Hester, P. Y., Karcher, D. M., Kjaer, J. B., Mench, J. A., ... Porter, R. E. (2011). Hen welfare in different housing systems. *Poultry Science*, *90*, 278–94. doi:10.3382/ps.2010-00962
- Leenders, M., & van Loon, L. J. C. (2011). Leucine as a pharmaconutrient to prevent and treat sarcopenia and type 2 diabetes. *Nutrition Reviews*, *69*, 675–89. doi:10.1111/j.1753-4887.2011.00443.x
- Lopez-Bote, C. ., Sanz Arias, R., Rey, A. ., Castaño, A., Isabel, B., & Thos, J. (1998). Effect of free-range feeding on n-3 fatty acid and  $\alpha$ -tocopherol content and oxidative stability of eggs. *Animal Feed Science and Technology*, *72*(1-2), 33–40. doi:10.1016/S0377-8401(97)00180-6
- Matt, D., Veromann, E., & Luik, A. (2009). Effect of housing systems on biochemical composition of chicken eggs. *Agronomy Research*, *7*(2), 662–667.
- Matyash, V., Liebisch, G., Kurzchalia, T. V, Shevchenko, A., & Schwudke, D. (2008). Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. *Journal of Lipid Research*, *49*, 1137–1146. doi:10.1194/jlr.D700041-JLR200
- McDonald, R. E., & Mossoba, M. M. (1997). *New techniques and applications in lipid analysis*. The American Oil Chemists Society.
- Miao, Z. H., Glatz, P. C., & Ru, Y. J. (2005). Free-range poultry production - A review. *ASIAN-AUSTRALASIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCES*, *18*, 113–132.

- Minelli, G., Sirri, F., Folegatti, E., Meluzzi, A., & Franchini, A. (2010). Egg quality traits of laying hens reared in organic and conventional systems. *Italian Journal of Animal Science*, 6(1s), 728–730.
- Mugnai, C., Sossidou, E. N., Dal Bosco, A., Ruggeri, S., Mattioli, S., & Castellini, C. (2014). The effects of husbandry system on the grass intake and egg nutritive characteristics of laying hens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94, 459–467. doi:10.1002/jsfa.6269
- Negro, M., Giardina, S., Marzani, B., & Marzatico, F. (2008). Branched-chain amino acid supplementation does not enhance athletic performance but affects muscle recovery and the immune system. *Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 48, 347–351. Retrieved from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=20647574>
- Nimalaratne, C., Lopes-Lutz, D., Schieber, A., & Wu, J. (2012). Effect of domestic cooking methods on egg yolk xanthophylls. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 12547–52. doi:10.1021/jf303828n
- Nollet, L. M. L., & Toldrá, F. (2012). *Food analysis by HPLC* (p. 1078). CRC Press.
- Nutritiondata.self.com. (2014). Egg, whole, raw, fresh. Retrieved October 13, 2015, from <http://nutritiondata.self.com/facts/dairy-and-egg-products/111/2>
- Nys, Y., Bain, M., & Immerseel, F. Van (Eds.). (2011). *Improving The Safety and Quality of Eggs and Egg Products Volume 1: Egg Chemistry, Production, and Consumption*. Woodhead Publishing Limited.
- Pombo-Rodrigues, S., Calame, W., & Re, R. (2011). The effects of consuming eggs for lunch on satiety and subsequent food intake. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(6), 593–599. doi:10.3109/09637486.2011.566212
- PORDATA. (2015). Área de cultivo biológico em % da superfície total na Europa. Retrieved October 17, 2015, from <http://www.pordata.pt/Europa/%C3%81rea+de+cultivo+biol%C3%B3gico+em+percentagem+da+superf%C3%ADcie+total-2384>
- Rakonjac, S., BOGOSAVLJEVIĆ-BOŠKOVIĆ, S., PAVLOVSKI, Z., ŠKRBIĆ, Z., DOSKOVIĆ, V., PETROVIĆ, M. D., & PETRIČEVIĆ, V. (2014). Laying hen rearing systems: a review of chemical composition and hygienic conditions of eggs. *World's Poultry Science Journal*, 70(01), 151–164. doi:10.1017/S0043933914000130
- Ratliff, J., Leite, J. O., de Ogburn, R., Puglisi, M. J., VanHeest, J., & Fernandez, M. L. (2010). Consuming eggs for breakfast influences plasma glucose and ghrelin,

- while reducing energy intake during the next 24 hours in adult men. *Nutrition Research*, 30, 96–103. doi:10.1016/j.nutres.2010.01.002
- Ruch, R. J., Klaunig, J. E., & Schultz, N. E. (1986). Mechanisms of chloroform and carbon tetrachloride toxicity in primary cultured mouse hepatocytes. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 69, 301–305. doi:10.1289/ehp.8669301
- Samman, S., Chow, J. W. Y., Foster, M. J., Ahmad, Z. I., Phuyal, J. L., & Petocz, P. (2008). Fatty acid composition of edible oils derived from certified organic and conventional agricultural methods. *Food Chemistry*, 109(3), 670–674. doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.067
- Schaafsma, G. (2000). The protein digestibility-corrected amino acid score. *Journal of Nutrition*, 130, 1865s–1867s. Retrieved from <Go to ISI>://WOS:000088042200036
- Schoeters, G., & Hoogenboom, R. (2006). Contamination of free-range chicken eggs with dioxins and dioxin-like polychlorinated biphenyls. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 908–914. doi:10.1002/mnfr.200500201
- Schreiner, M. (2006). Optimization of Solvent Extraction and Direct Transmethylation Methods for the Analysis of Egg Yolk Lipids. *International Journal of Food Properties*, 9(3), 573–581. doi:10.1080/10942910600596290
- Simopoulos, A. P. (2000). Human requirement for N-3 polyunsaturated fatty acids. *Poultry Science*, 79, 961–70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10901194> <http://ps.fass.org/content/79/7/961.short>
- Simopoulos, A. P. (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 60, 502–507. doi:10.1016/j.biopha.2006.07.080
- Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 233, 674–688. doi:10.3181/0711-MR-311
- Simopoulos, A. P. (2011). Evolutionary aspects of Diet: The omega-6/omega-3 ratio and the brain. *Molecular Neurobiology*, 44, 203–215. doi:10.1007/s12035-010-8162-0
- Simopoulos, A. P., & Salem Jr, N. (1989). n-3 fatty acids in eggs from range-fed Greek chickens. *The New England Journal of Medicine*, 321(20), 1412.

- Skoog. (2013). *Fundamentals of Analytical Chemistry* (9th ed., p. 1072). Cengage Learning.
- Skoog, D. a, West, D. M., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2004). Fundamentals of Analytical Chemistry. *Anal. Chem.*, 398, 27–28. doi:10.1007/s00216-010-3971-6
- Smith-Spangler, C., Brandeau, M. L., Hunter, G. E., Clay Bavinger, J., Pearson, M., Eschbach, P. J., ... Bravata, D. M. (2012). Are organic foods safer or healthier than conventional alternatives?: A systematic review. *Annals of Internal Medicine*, 157, 348–366. doi:10.7326/0003-4819-157-5-201209040-00007
- Teale, C. (2006). *Omega 3 Fatty Acid Research*. Nova Science Publishers. Retrieved from <https://books.google.es/books?id=d8l3LOyBrc8C>
- The World Egg Industry - a few facts and figures. (n.d.). Retrieved October 1, 2015, from <https://www.internationalegg.com/corporate/eggindustry/details.asp?id=18>
- Tolan, A., Robertson, J., Orton, C. R., Head, M. J., Christie, A. A., & Millburn, B. A. (1974). Studies on the composition of food. 5. The chemical composition of eggs produced under battery, deep litter and free range conditions. *The British Journal of Nutrition*, 31(2), 185–200.
- TVI24. (2012). Agricultura biológica: negócio cresce 20% ao ano. Retrieved October 16, 2015, from <http://www.tvi24.iol.pt/economia/produtos-biologicos/agricultura-biologica-negocio-cresce-20-ao-ano>
- USDA. (n.d.). Organic Regulations. Retrieved October 18, 2015, from <http://www.ams.usda.gov/rules-regulations/organic>