

ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS POR ELETROFORESE CAPILAR UTILIZANDO DETECÇÃO CONDUTOMÉTRICA SEM CONTATO

Marcone A. L. Oliveira, Claudimir L. do Lago e Marina F. M. Tavares*

Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, 05508-900 São Paulo - SP

José Alberto Fracassi da Silva

Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Luciano Gualberto, Travessa 3, 158, 05508-900 São Paulo - SP

Recebido em 7/10/02; aceito em 27/3/03

ANALYSIS OF FATTY ACIDS BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS WITH CONTACTLESS CONDUCTIVITY DETECTION. This article describes a novel approach to the separation of fatty acids ranging from 8 to 20 carbons using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. Complete separation of nine linear chain fatty acids (from C8:0 to C20:0) was achieved in 15 min under normal polarity operation. Limits of detection ranged from 35 to 319 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for C20:0 to C8:0, respectively. The optimized running electrolyte composition was 5.0 mmol L^{-1} phosphate buffer at pH 7, 4.0 mmol L^{-1} dimethyl- β -cyclodextrin, 2.0 mmol L^{-1} trimethyl- β -cyclodextrin, acetonitrile 50% (v/v), and methanol 20% (v/v). The applicability of the separation system was demonstrated by the analysis of coconut vegetable oil.

Keywords: fatty acids; capillary electrophoresis; contactless conductivity detection.

INTRODUÇÃO

Ácidos graxos (AG) são definidos como ácidos carboxílicos alifáticos, saturados ou insaturados, cuja cadeia carbônica possui de 6 a 24 átomos de carbono. Os AG de ocorrência natural em gorduras possuem número par de átomos de carbono e apresentam cadeia sem ramificações. A análise destes compostos é importante na caracterização de óleos comestíveis e produtos derivados de leite e no monitoramento da pureza e/ou adulteração de azeites.

A cromatografia gasosa (CG) tem sido amplamente utilizada na análise dos AG em óleos e gorduras^{1,2}. Geralmente a metodologia inclui uma etapa de preparação da amostra, onde os AG são separados da gordura. CG permite a separação dos AG de cadeia curta, diretamente. Os AG de cadeia longa apresentam baixa volatilidade e estabilidade térmica e, portanto, requerem uma etapa adicional de derivatização, onde os grupos carboxílicos são convertidos em grupos mais voláteis como trimetilsilil-ésteres ou metil-ésteres^{2,3}.

As vantagens do uso de CG levaram ao crescente interesse no desenvolvimento de métodos de separação em meio líquido. Em princípio, os AG podem ser separados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, mas a baixa absorvidade dos solutos torna difícil a quantificação direta por detecção UV em amostras reais. Detectores alternativos têm sido propostos na literatura, como aqueles baseados no índice de refração⁴, na condutividade⁵ e na quimioluminescência⁶. Nas análises com detecção por absorvância, há a necessidade de derivatização visando a formação de adutos ou derivativos que apresentem alta absorvidade, como fenacil-ésteres⁷, naftacil-ésteres⁸ e 2-nitrofenilidrazidas⁹. Esta etapa de reação pode gerar reações incompletas ou produtos secundários, que representam alguns agravantes no uso de CLAE.

Por possuir mecanismo de separação completamente distinto, a eletroforese capilar (EC) oferece uma boa alternativa na análise de AG. Além de apresentar curtos tempos de análise, a preparação da

amostra é relativamente simples, não sendo necessárias etapas de derivatização, uma vez que a detecção indireta, seja no caso de UV¹⁰ ou fluorescência¹¹, pode ser empregada.

Devido ao seu bom desempenho na análise iônica, a detecção condutométrica em EC tem ganhado larga aceitação, principalmente após a comercialização de equipamentos munidos deste tipo de detector¹²⁻¹⁶. Ácidos carboxílicos têm sido analisados por EC com detecção condutométrica^{17,18}, embora as análises tenham sido dirigidas para ácidos de cadeia relativamente curta (até 7 carbonos). A separação de tensoativos também tem sido investigada por EC com detecção condutométrica^{12,19-21}, apresentando resultados favoráveis.

Recentemente, a detecção condutométrica sem contato (DCSC), ou oscilométrica, foi introduzida em EC como alternativa à detecção condutométrica convencional²²⁻²⁷. Na DCSC são utilizadas altas frequências de operação, em comparação à detecção condutométrica convencional, possibilitando o posicionamento dos eletrodos do lado externo do capilar. Este arranjo evita a contaminação dos eletrodos, além de proporcionar o desacoplamento entre o circuito do detector e os altos potenciais utilizados na separação. Como vantagem adicional, a utilização de eletrodos tubulares permite a rápida troca e a adaptação perfeita e reproduzível dos capilares, dispensando as etapas de alinhamento dos eletrodos.

Este trabalho descreve, pela primeira vez, a separação de ácidos graxos de cadeia linear contendo de 8 a 20 átomos de carbono utilizando-se EC com detecção condutométrica. Devido à baixa mobilidade iônica dos analitos, optou-se pela utilização de um tampão de corrida de alta condutividade, a fim de se obter boa sensibilidade para o método proposto.

PARTE EXPERIMENTAL

Reagentes e soluções

Foram utilizados reagentes de grau analítico e solventes de pureza cromatográfica. As soluções foram preparadas utilizando-se água desionizada (NANOPure, Barnstead, Iowa, E.U.A.). Os padrões de

*e-mail: mfmtavar@iq.usp.br

ácidos graxos e a trimetil- β -ciclodextrina (TM- β -CD) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, E.U.A.). Monoidrogenofosfato de sódio, di-idrogenofosfato de sódio e metanol (MeOH) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Acetonitrila (ACN) e dimetil- β -ciclodextrina (DM- β -CD) foram obtidos da Omnisolv e Beckman Coulter Inc. (Fullerton, CA, E.U.A.), respectivamente. O eletrólito de corrida foi composto por 5 mmol L⁻¹ de tampão fosfato (pH 7,0), ACN 50% (v/v), MeOH 20% (v/v), 4 mmol L⁻¹ DM- β -CD e 2 mmol L⁻¹ TM- β -CD. O tampão fosfato foi preparado em concentrações equimolares de NaH₂PO₄ e Na₂HPO₄. Soluções estoque dos padrões de AG C8:0 (ác. octanoico), C9:0 (ác. nonanoico), C10:0 (ác. decanoico), C11:0 (ác. undecanoico), C12:0 (ác. dodecanoico), C14:0 (ác. tetradecanoico), C16:0 (ác. hexadecanoico), C18:0 (ác. octadecanoico), C18:2cc (ác. linoléico, *cis,cis*) e C20:0 (ác. eicosanoico) foram preparadas em MeOH na concentração de 170 mmol L⁻¹ e guardadas em freezer.

Preparo da amostra

Cerca de 500 mg de amostra comercial de gordura de coco de babaçu foram saponificados com 5 mL de solução metanólica de NaOH (0,5 mol L⁻¹) a temperatura de 75-80 °C por 5 min. Após esse período, a solução sobrenadante foi diluída 20 vezes, em metanol, antes da injeção.

Instrumentação

Os experimentos foram realizados em um aparelho de EC, confeccionado no laboratório. O DCSC, descrito anteriormente²², foi utilizado com pequenas modificações²⁵. Capilares de sílica fundida, recobertos externamente com polimida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.), de 75 μ m de diâmetro interno, 375 μ m diâmetro externo e 60 cm de comprimento foram utilizados nas separações. O detector condutométrico sem contato foi posicionado a 10 cm do final do capilar. Dois eletrodos tubulares de 2 mm, espaçados por 1 mm, foram posicionados do lado externo do capilar. A polimida não é removida na região de detecção, como usualmente é feito para a detecção de absorvância e/ou fluorescência. Um sinal senoidal de 600 kHz e baixa amplitude (2 V_{pp}) foi aplicado sobre um dos eletrodos com auxílio de um gerador de sinais (FG-2002C, Goldstar, Coreia). O outro eletrodo foi conectado ao circuito eletrônico do detector com etapas de conversão corrente-tensão, retificação e amplificação. O sinal contínuo resultante, proporcional à condutividade da solução no interior do capilar, foi coletado de uma interface A/D (PCL711S, Advantech, China). Os dados do detector foram armazenados em computador com o auxílio de software de controle escrito em Delphi 5.0, sob plataforma windows. O cálculo das áreas dos picos e o tratamento estatístico foram efetuados com o auxílio do software Origin 5.0 (Microcal Software, Northampton, MA, E.U.A.).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A separação foi efetuada com polaridade normal, ou seja, com o ânodo no reservatório de injeção. Nestas condições, é imprescindível que as mobilidades eletroforéticas dos ácidos graxos sejam, em módulo, menores que a mobilidade do fluxo eletrosmótico (FEO). Embora essa condição seja conseguida trabalhando-se com tampões de corrida com alto valor de pH, a utilização de valores de pH moderados (~7,0) foi suficiente para este propósito. Deste modo, a ordem de migração esperada é a do ácido de cadeia longa (C20:0) para o ácido de cadeia curta (C8:0).

Em sistemas de detecção condutométrica²¹, o fator de resposta diminui com a redução da diferença de mobilidade entre o analito e

o contra-íon do tampão de corrida. Neste caso específico, quanto menor a cadeia carbônica dos ácidos analisados, menor é a diferença entre a sua mobilidade e a do contra-íon (sistema fosfato, no caso). Deste modo, espera-se que a resposta diminua com a diminuição do comprimento da cadeia carbônica.

A Figura 1 mostra o eletroferograma de uma mistura padrão, que ilustra as observações acima descritas. Pode-se verificar a completa resolução de 9 AG de cadeia linear (C20:0 a C8:0) em torno de 15 min. A boa resolução dos ácidos é conseguida mediante a adição de TM- β -CD e DM- β -CD ao tampão de corrida. A cadeia apolar dos ácidos sofre forte interação com a cavidade destas ciclodextrinas, provocando uma alteração de mobilidade. O fato da TM- β -CD e da DM- β -CD não possuírem carga é bastante favorável como estratégia para otimização da resolução do sistema, uma vez que a corrente que flui pelo capilar e, conseqüentemente, a temperatura no seu interior não sofrem aumento. Entretanto, atenção deve ser dada às alterações no fluxo eletrosmótico, devido ao aumento na viscosidade do tampão de corrida.

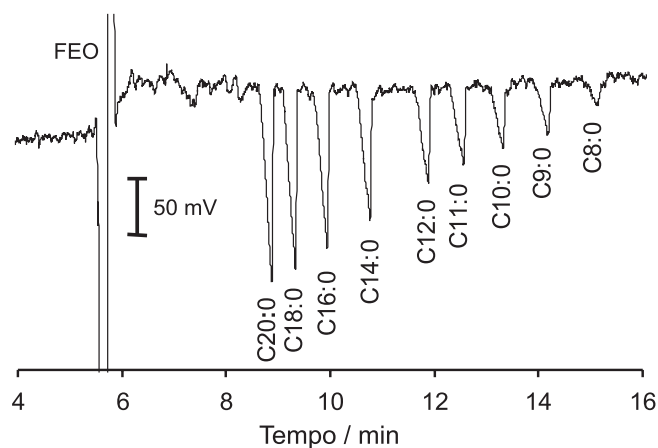


Figura 1. Eletroferograma da mistura padrão de ácidos graxos. Condições: tampão fosfato (pH 7,0) 5 mmol L⁻¹, ACN 50% (v/v), metanol 20% (v/v), DM- β -CD 4 mmol L⁻¹ e TM- β -CD 2 mmol L⁻¹. Potencial +20 kV; injeção por gravidade a 10 cm por 10 s; capilar de sílica fundida de 75 μ m (diâmetro interno) e 60 cm de comprimento; detector operando a 600 kHz e 2 V_{pp}. Padrões injetados na concentração de 0,5 mmol L⁻¹

O uso de uma alta porcentagem de solventes orgânicos proporciona perspectivas promissoras na detecção condutométrica de AG, como explorado neste trabalho pela primeira vez e para outros tipos de analitos, como verificado por Kennedler e colaboradores²⁸. Na aplicação específica da separação de AG, as vantagens decorrentes do uso de solventes orgânicos no tampão são o aumento significativo da solubilidade dos ácidos de cadeia longa e a prevenção de aglomerados micelares, intrínsecos entre as moléculas dos AG²⁹.

A utilização de DCSC não restringe a quantidade de modificadores orgânicos que pode ser adicionada ao tampão de corrida, o que pode acontecer na detecção por absorção no UV-vis, caso seja necessário empregar um comprimento de onda no qual os aditivos do eletrólito absorvam. Como vantagem adicional, a DCSC torna dispensável a utilização de agentes cromóforos, o que facilita o preparo e otimização do eletrólito condutor.

A Tabela 1 traz os fatores de resposta (razão entre a área do pico e a concentração em mmol L⁻¹) e os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) conseguidos com o método. A utilização dos fatores de resposta é interessante para avaliar o limite prático na detecção e/ou quantificação destes AG. Quanto menor o fator de resposta, maior o limite de detecção e/ou quantificação limitando, portanto, o

uso da detecção condutométrica para a determinação de AG de cadeia média, como é o caso do C8:0.

Tabela 1. Área do pico, fator de resposta (FR), limite de detecção e quantificação para os AG estudados

AG	Área do pico	FR / L mmol ⁻¹	LD* / μmol L ⁻¹	LQ* / μmol L ⁻¹
C20:0	0,0231	0,0462	35	117
C18:0	0,0235	0,0469	37	123
C16:0	0,0212	0,0424	42	140
C14:0	0,0167	0,0333	54	180
C12:0	0,0131	0,0261	69	230
C11:0	0,0121	0,0242	84	280
C10:0	0,0080	0,0160	112	373
C09:0	0,0077	0,0153	127	423
C08:0	0,0025	0,0051	319	1062

*LD, limite de detecção, calculado como a concentração correspondente à relação sinal-ruído igual a 3; LQ, limite de quantificação, calculado como a concentração correspondente à relação sinal-ruído igual a 10.

O gráfico do fator de resposta em função do tempo de migração apresenta-se linear e com inclinação negativa para o intervalo de AG estudados, como pode ser visto na Figura 2. É interessante notar que, a partir do tempo de migração 15,73 min, o fator de resposta muda de sinal. Desta forma, a partir deste tempo, espera-se que picos positivos sejam detectados, relativos a AG de cadeia curta. Isto pode não chegar a ser observado devido à alta mobilidade destes ácidos de cadeia curta (em módulo maior que a mobilidade do fluxo eletromótico), que neste caso se moveriam no sentido contrário ao do detector e escapariam do capilar. Para a faixa de AG estudada, os LD obtidos são comparáveis àqueles obtidos por detecção no UV-vis³⁰ e se adequam à análise de várias amostras de óleos e gorduras comerciais.

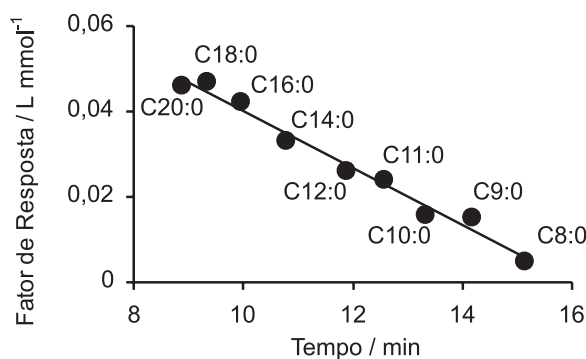


Figura 2. Relação linear entre os fatores de resposta (FR) e os tempos de migração (t_m), obtidos do eletroferograma da Figura 1

Constatou-se que a resposta do detector se mostrou linear no intervalo de 100 a 2000 μmol L⁻¹ para C20:0. Entretanto, este intervalo diminui consideravelmente com a diminuição da cadeia carbônica dos AG, uma vez que o limite de detecção e/ou quantificação dos ácidos de cadeia média é da ordem de 10 vezes maior que os de cadeia longa (Tabela 1).

A repetibilidade das áreas dos picos ficou entre 10 e 16% C.V., para cinco injeções consecutivas da mistura de padrões. Cabe lembrar que a precisão intra-ensaio em eletroforese capilar é fortemente dependente de um controle adequado da temperatura, da manuten-

ção da composição da amostra e eletrólito, do tipo de injeção propriamente dito, do condicionamento do capilar, do algoritmo de integração do pico, entre outros fatores instrumentais. É possível que no sistema de eletroforese capilar confeccionado no laboratório, tenha havido alteração do eletrólito durante a corrida devido à evaporação de solvente. O controle de temperatura do sistema foi feito por convecção de ar. É sabido que um sistema de refrigeração do capilar por passagem de líquido é muito mais eficiente no controle de temperatura e remoção do calor gerado por efeito Joule. Dessa forma, a precisão aqui obtida pode ser considerada aceitável³¹.

A Figura 3 mostra a aplicabilidade do método a amostras reais, onde gordura de coco foi analisada, sendo identificados os ácidos graxos de cadeia linear C18:0, C14:0, C12:0, C10:0 e C8:0, além de um ácido de cadeia insaturada C18:2cc. Os ácidos C18:1 e C16:0 co-migram como uma zona única neste sistema. A identificação dos picos foi feita mediante fortificação da amostra com padrões.

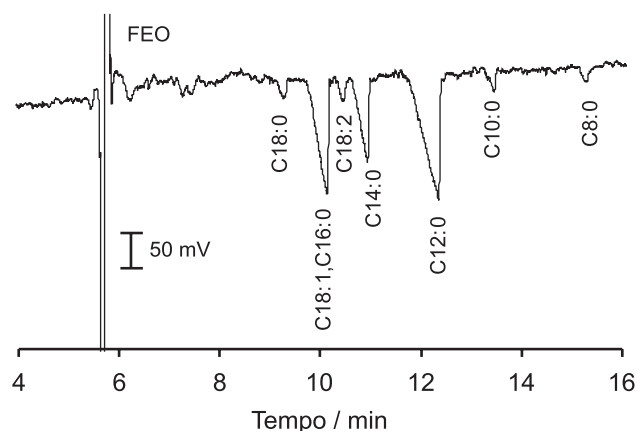


Figura 3. Eletroferograma da separação de AG em gordura de coco de babaçu. Condições como na Figura 1

Resultados da estimativa do teor de AG na amostra de coco de babaçu estão compilados na Tabela 2. Na quantificação, utilizou-se um ponto de calibração, que mostrou ser uma prática aceitável na análise de ácidos graxos em amostras de óleos e gorduras utilizando-se eletroforese capilar³². Conforme observado, a concentração de todos os ácidos graxos que puderam ser separados inequivocamente está de acordo com a composição preconizada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para gordura de coco de babaçu.

Tabela 2. Estimativa do teor de AG numa amostra de gordura de coco de babaçu

AG	% AG	
	Presente trabalho	ANVISA* (intervalo)
C18:0	5,8	3,2 - 7,1
C14:0	20,6	19,4 - 25,8
C12:0	61,8	52,7 - 70,7
C10:0	5,8	2,1 - 7,3
C8:0	6,5	4,6 - 7,0

*Agência Nacional de Vigilância Sanitária (www.anvisa.gov.br); valores normalizados, base 100, para os AG determinados.

CONCLUSÕES

A detecção condutométrica sem contato mostrou-se bastante apropriada para a análise de AG possuindo de 8 a 20 átomos de carbono

na cadeia linear. Para AG saturados acima de 20 carbonos, problemas de solubilidade começam a se tornar evidentes, inviabilizando a análise. Para AG de cadeia menor que 8 carbonos, o fator de resposta é muito pequeno, uma vez que as mobilidades destes ácidos se aproximam da mobilidade do contra-íon do tampão. Mesmo que em teoria seja possível a detecção (como picos positivos) de ácidos de cadeia curta, isto não foi verificado, por estes possuírem mobilidade maior (em módulo) que a do fluxo eletrosmótico e migrarem no sentido contrário ao do detector. Como vantagem adicional, foi possível a operação em uma condição próxima à da eletroforese em meio não aquoso (70% de modificadores orgânicos), sem a preocupação de que o eletrólito absorva radiação, deslocando a linha de base, e prejudicando a sensibilidade do método, como ocorre na detecção por absorção no UV-vis.

Os resultados aqui apresentados encorajam a utilização da eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato na análise de AG e também para o desenvolvimento de outras aplicações em meio não aquoso.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas concedidas (FAPESP 00/11545-8, CNPq 301201/94-3).

REFERÊNCIAS

1. Gutnikov, G.; *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.* **1995**, 671, 71.
2. Helrich, K., ed.; *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Chemists*, 15th ed., AOAC: Arlington, 1990, vol. 2, p. 963.
3. Martin-Hernandez, M. C.; Alonso, L.; Juarez, M.; Fontecha, J.; *Chromatographia* **1988**, 25, 87.
4. King, J. W.; Adams, E. C.; Bidlingmeyer, A.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1982**, 5, 275.
5. Tsuyama, Y.; Uchida, T.; Goto, T.; *J. Chromatogr.* **1992**, 596, 181.
6. Kawasaki, H.; Maeda, N.; Yuki, H.; *J. Chromatogr.* **1990**, 516, 450.
7. Durst, H. D.; Milano, M.; Kikta, E. J.; Connelly, S. A.; Grushka, E.; *Anal. Chem.* **1975**, 47, 1797.
8. Jordi, H. C.; *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1978**, 1, 215.
9. Miwa, H.; Yamamoto, M.; Nishida, T.; Nuno, K.; Kikuchi, M.; *J. Chromatogr.* **1987**, 416, 237.
10. Collet, J.; Gareil, P.; *J. Capillary Electrophor. Microchip Technol.* **1996**, 3, 77.
11. Zuriguel, V.; Caussé, E.; Bounéry, J. D.; Nouadje, G.; Siméon, N.; Nertz, M.; Salvayre, R.; Couderc, F.; *J. Chromatogr.* **1997**, 781, 233.
12. Haber, C.; Jones, W.; Soglia, J.; Surve, M.; McGlynn, M.; Caplan, A.; Reineck, J.; Krstanovic, C.; *J. Capillary Electrophor. Microchip Technol.* **1996**, 3, 1.
13. Klampfl, C. W.; Katzmayer, M. U.; Buchberger, W.; Basener, N.; *J. High-Resolution Chromatogr.* **1999**, 22, 297.
14. Klampfl, C. W.; *J. Capillary Electrophor. Microchip Technol.* **1998**, 5, 125.
15. Klampfl, C. W.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 987.
16. Hissner, F.; Mattusch, J.; Heinig, K.; *Fresenius' J. Anal. Chem.* **1999**, 365, 647.
17. Huang, X.; Luckey, J.; Gordon, M.; Zare, R. N.; *Anal. Chem.* **1989**, 61, 766.
18. Huang, X.; Gordon, M.; Zare, R. N.; *J. Chromatogr.* **1989**, 480, 285.
19. Gallagher, P.; Danielson, N.; *J. Chromatogr., A* **1997**, 781, 533.
20. Gallagher, P.; Oertel, C.; Danielson, N.; *J. Chromatogr., A* **1998**, 817, 31.
21. Lucy, C.; Wu, Q.; *J. Chromatogr. Sci.* **1998**, 36, 33.
22. Fracassi da Silva, J. A.; Lago, C. L.; *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4339.
23. Zemmann, A.; Schnell, E.; Volgger, D.; Bonn, G.; *Anal. Chem.* **1998**, 70, 563.
24. Kaniánsky, D.; Zelenká, V.; Masár, M.; Iványi, F.; Gazdíkóvá, S.; *J. Chromatogr., A* **1999**, 844, 349.
25. Fracassi da Silva, J. A.; Guzman, N.; Lago, C. L.; *J. Chromatogr., A* **2002**, 942, 249.
26. Kubán, P.; Karlberg, B.; Kubán, V.; *J. Chromatogr., A* **2002**, 964, 227.
27. Tanyanyiwa, J.; Galliker, B.; Schwartz, M. A.; Hauser, P. C.; *Analyst* **2002**, 127, 214.
28. Muzikár, J.; van de Goor, T.; Gas, B.; Kenndler, E.; *J. Chromatogr., A* **2001**, 924, 147.
29. Zana, R.; *Adv. Colloid Surf. Sci.* **1995**, 57, 1.
30. Oliveira, M. A. L.; Micke, G. A.; Bruns, R. E.; Tavares, M. F. M.; *J. Chromatogr., A* **2001**, 924, 533.
31. Ross, G. A.; *Accred. Qual. Assur.* **1997**, 2, 275.
32. Roldan-Assad, R.; Gareil, P.; *J. Chromatogr., A* **1995**, 708, 339.