

Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Exatas
Pós-Graduação em Química

Renata Takabayashi Sato

**OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIA ALTERNATIVA PARA
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES, EM ÓLEOS
VEGETAIS, POR ELETROFORESE CAPILAR**

Juiz de Fora

2014

Renata Takabayashi Sato

Otimização de metodologia alternativa para determinação de ácidos graxos livres, em óleos vegetais, por eletroforese capilar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Colaborador: Prof. Dr. Adilson David da Silva

Juiz de Fora

2014

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

Sato, Renata Takabayashi.

Otimização de metodologia alternativa para determinação de ácidos graxos livres, em óleos vegetais, por eletroforese capilar / Renata Takabayashi Sato. -- 2014.
46 p.

Orientador: Marccone Augusto Leal de Oliveira
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, ICE/Engenharia. Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

1. Acidez livre. 2. Ácidos graxos. 3. Óleos vegetais. 4. Azeite de oliva. 5. Eletroforese capilar. I. de Oliveira, Marccone Augusto Leal, orient. II. Título.

Aos meus pais, Mario & Regina, que sempre iluminam meu caminho com afeto e, por muitas vezes, renunciaram aos seus sonhos, para que pudesse realizar os meus.

AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem eu sempre recorro.

Aos meus pais, pelos conselhos, ensinamentos, dedicação e apoio de sempre.

Aos meus amigos e familiares, em especial, aos meus tios Francisco & Wanda e aos primos Wilian, Cristiane, Marco & Jhonata, por sempre me acompanharem e apoiarem, de tão perto.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcone, pelo aprendizado, paciência, confiança e amizade.

Aos amigos do Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ), pelo companheirismo, ensinamentos, parcerias e momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Adilson D. da Silva e ao mestrando Pedro H. F. Stroppa, pela paciência, parceria e aprendizado.

Aos colegas de graduação, pós-graduação e do Laboratório de Genética Vegetal (Embrapa Gado de Leite), pelo aprendizado e apoio.

Aos demais professores do Departamento de Química da UFJF, pelo aprendizado, em especial, aos professores Dr. Rafael A. de Sousa & Dr^a. Maria Auxiliadora C. Matos, pela colaboração na Qualificação e ao Prof. Dr. Mauro V. de Almeida, pelo incentivo.

Às secretárias Simone & Maria, pela disposição e solicitações, sempre atendidas.

Aos técnicos Ernando Motta & Marcos e ao Dr. Marco A. S. da Gama, da Embrapa Gado de Leite, pelo aprendizado.

A UFJF e a CAPES, pela bolsa concedida.

*“O mais importante é não parar de questionar.
A curiosidade tem sua própria razão de existir.”*

Albert Einstein

RESUMO

As gorduras representam, aproximadamente, 33% do total dos recursos energéticos ingeridos pela população mundial, em média, diariamente.

No presente trabalho, foram determinados os valores de acidez livre de óleos vegetais, através da técnica de eletroforese capilar de zona, com capilar revestido externamente com flúor-polímero (TSH), e detecção indireta por UV em 224 nm, temperatura controlada no interior do cartucho em 25°C. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (12.0 mbar por 4 s) e o sistema eletroforético foi operado sob polaridade normal sob voltagem constante de + 19 kV. O eletrólito utilizado consistiu em 15 mmol L⁻¹ de solução tampão NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH ~ 6.86); 4,0 mmol L⁻¹ de SDBS; 8,3 mmol L⁻¹ de Brij 35[®], 45% v/v de ACN e 2,1% de 1-octanol.

Os resultados demonstraram que a eletroforese capilar de zona pode ser utilizada como metodologia alternativa nas análises de acidez livre em óleos vegetais, já que não houve diferenças significativas, em um intervalo de 95% de confiança, quando comparados com o método oficial por titulação volumétrica alcalina.

As vantagens da metodologia alternativa proposta neste trabalho é a identificação individual dos ácidos graxos livres presentes, o menor volume de solventes e amostras, além da menor intervenção humana.

Palavras-chave: Acidez livre. Ácidos graxos. Óleos vegetais. Azeite de oliva. Eletroforese capilar.

ABSTRACT

Fats represent, approximately, 33 % of total energy resources consumed by the world population, on average, daily.

In the present study, the vegetable oils free acidity values were determined by the technique of capillary zone electrophoresis , with a capillary externally coated with fluoro - polymer (TSH), indirect UV detection at 224 nm and temperature controlled within the cartridge at 25 ° C. Samples were injected hydrodynamically (12.0 mbar for 4 s) and the electrophoretic system was operated at normal polarity under constant voltage of + 19 kV . The electrolyte used was 15 mmol L⁻¹ of buffer NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH ~ 6.86); 4.0 mmol L⁻¹ SDBS ; 8.3 mmol L⁻¹ Brij 35 ® , 45% v / v ACN and 2.1 % 1- octanol .

The results showed that capillary zone electrophoresis can be used as an alternative method in the analysis of free acidity vegetable oils, since there were no significant differences in a range of 95 % confidence , when compared with the official method by alkali titration volume .

The advantages of the alternative methodology proposed in this work is the identification of individual present free fatty acids, the lowest volume of solvents and samples, and the lowest human intervention .

Keywords: Free acidity. Fatty acids. Vegetable oils. Olive oil. Capillary electrophoresis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura do triacilglicerídeo..... 15
- Figura 2. Estruturas de AG e suas respectivas nomenclaturas. 18
- Figura 3. Esquema para CE. (A) reservatório de entrada para eletrólito; (B) reservatório de entrada para amostra; (C); reservatório de saída de eletrólito e amostra; (D) detector; (E) fornecimento de alta voltagem; (F) eletrodos de platina; (G) capilar: o diâmetro foi aumentado desproporcionalmnte para melhor visualização..... 21
- Figura 4. Migração de íons e compostos neutros em um capilar, através do fluxo eletro-osmótico normal. 23
- Figura 5. Esquema do preparo de amostras de óleos para eletroforese capilar. 29
- Figura 6. Procedimento para determinação de acidez livre em óleos 36
- Figura 7. Eletroferogramas de óleos vegetais. Eletrólito: 15 mmol L⁻¹ de solução tampão NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH ~ 6.86), 4.0 mmol L⁻¹ de SDBS, 8.3 mmol L⁻¹ de Brij 35®, 45% v/v de ACN e 2.1% de octanol. Picos: (1) C18:1 Δ⁹ ; (2) C16:0; (3) C18:2 Δ^{9,12}; (PI) C13:0. 38
- Figura 8. Eletroferogramas com diferentes solventes em análises de acidez livre em biodiesel. Eletrólito: 15 mmol L⁻¹ de solução tampão NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH ~ 6.86), 4.0 mmol L⁻¹ de SDBS, 8.3 mmol L⁻¹ de Brij 35®, 45% v/v de ACN e 2.1% de octanol. Picos: (1) C18:1 Δ⁹ ; (2) C16:0; (3) C18:2 Δ^{9,12}; (PI) C13:0..... 41

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Composição de alguns AG em óleos e manteiga..... | 16 |
| Tabela 2. Valores utilizados para o modelo de regressão..... | 32 |
| Tabela 3. Cálculo do fator de resposta | 33 |
| Tabela 4. Comparação entre CE e titulação volumétrica para óleos vegetais..... | 37 |
| Tabela 5. Valores de acidez de outros óleos vegetais..... | 37 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|--|
| A | Absortividade molar |
| ACN | Acetonitrila |
| AG | Ácidos graxos |
| AGL | Ácidos graxos livres |
| Brij 35® | Polioxoetileno 23 lauril éter |
| CCE | Comprimento de cadeia equivalente |
| CE | Eletroforese capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>) |
| CG | Cromatografia a gás |
| CZE | Eletroforese capilar de zona (<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>) |
| d.e. | Diâmetro externo |
| d.i. | Diâmetro interno |
| DAD | Detector por arranjos de diodos |
| EtOH | Etanol |
| FID | Detector por ionização em chama (<i>Flame Ionization Detector</i>) |
| F _r | Fator de resposta |
| HPLC | Cromatografia à líquido de alta eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>) |
| IR | Infravermelho (<i>Infrared</i>) |
| LOD | Limite de detecção |

| | |
|------|--|
| LOQ | Limite de quantificação |
| MEKC | Cromatografia micelar eletrocinética capilar (<i>Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography</i>) |
| MeOH | Metanol |
| PI | Padrão interno |
| RMN | Ressonância magnética nuclear |
| SDBS | Dodecilbenzenosulfonato de sódio |
| UV | Ultravioleta |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---------------------|-----------------------------------|
| v | Velocidade de migração |
| η | Viscosidade |
| μ_e | Mobilidade eletroforética |
| A | Absorbância |
| a | Absortividade molar |
| A_{AGL} | Área de ácido graxo livre |
| A_{PI} | Área do padrão interno |
| E | Intensidade do campo elétrico |
| F_R | Fator de resposta |
| $F_{tab}(v_1, v_2)$ | Distribuição F |
| $H_{máxima}$ | Altura máxima do pico do analito |
| $H_{mínima}$ | Altura da base do pico do analito |
| m_i | Número de medidas |
| N_c | Número de carbonos |
| N_{c-c} | Número de insaturações |
| p | Número de parâmetros |
| q | Carga iônica |
| r | Raio do soluto |

s_{yx}

Desvio padrão

u

Velocidade linear

SUMÁRIO

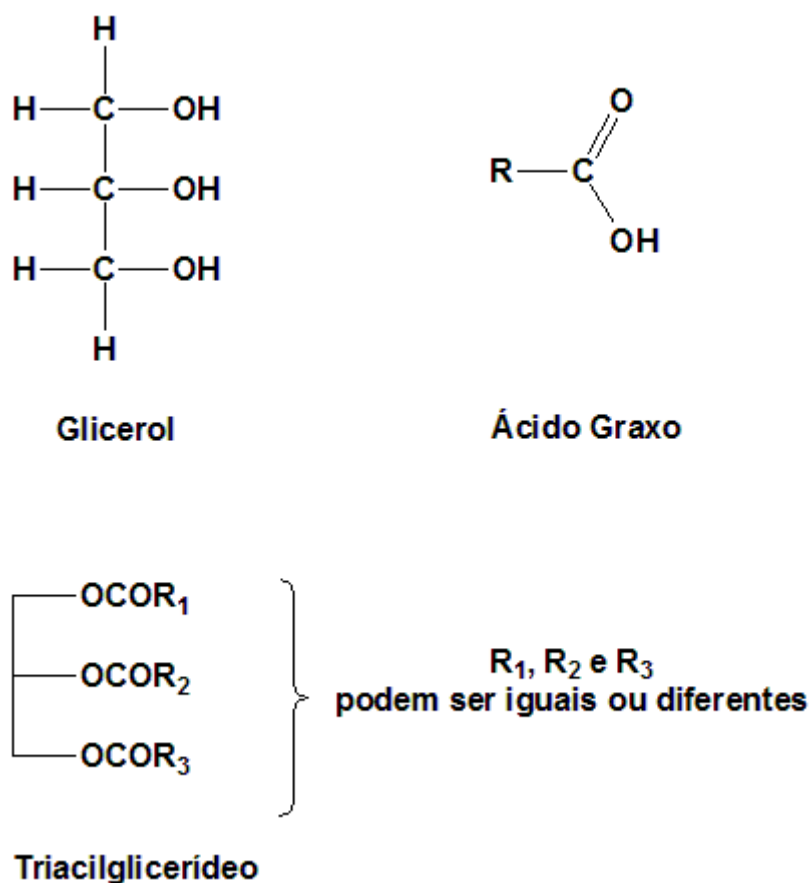
| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1. ACIDEZ..... | 17 |
| 2. ÁCIDOS GRAXOS..... | 18 |
| 3. ELETROFORESE CAPILAR | 20 |
| 3.1. ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA | 22 |
| 3.2. DETECÇÃO | 24 |
| 4. OBJETIVO..... | 25 |
| 5. PARTE EXPERIMENTAL | 26 |
| 5.1. MATERIAIS E REAGENTES..... | 26 |
| 5.2. INSTRUMENTAÇÃO | 27 |
| 5.3. PREPARO DAS AMOSTRAS | 28 |
| 5.4. PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA AS ANÁLISES | 29 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 31 |
| 6.1. CÁLCULO DO FATOR DE RESPOSTA (F_R) | 31 |
| 6.2. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO | 34 |

| | |
|---|----|
| 6.3. COMPARAÇÃO ENTRE TITULAÇÃO VOLUMÉTRICA E ELETROFORESE CAPILAR | 35 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 39 |
| 8. PERSPECTIVAS..... | 40 |
| REFERÊNCIAS | 42 |
| APÊNDICE | 46 |
| TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS | 46 |
| ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO | 46 |

1. INTRODUÇÃO

As gorduras representam, aproximadamente, 33% do total dos recursos energéticos ingeridos pela população mundial, em média, diariamente (Bontempo, 2008). Óleos e gorduras são ésteres de ácidos graxos de alto peso molecular e glicerol; destes os mais importantes são os triacilgliceróis (Figura 1).

Figura 1. Estrutura do triacilglicerídeo.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA.

Ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos, alifáticos e monocarboxílicos (Otieno e Mwongela, 2008; Wong, Saad e Makahleh, 2013). Os AG são solúveis em solventes orgânicos e fracamente solúveis em água, quando em formas não dissociadas.

Os AG dividem-se em dois grupos: saturados (não possuem duplas ligações) e insaturados (com uma ou duas ligações duplas em sua estrutura molecular). O consumo excessivo de alimentos ricos em ácidos graxos saturados, encontrados, geralmente, em produtos de origem animal, pode ser prejudicial, pois contribui para elevação das taxas de colesterol no organismo. Em contrapartida, ingerir alimentos ricos em ácidos graxos insaturados produz diminuição dos níveis de colesterol no organismo e, por isso, há redução do risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Bontempo, 2008).

Para uma alimentação saudável, aconselha-se substituir o consumo de gorduras saturadas por AG monoinsaturados (AG com uma dupla ligação), como os de azeite de oliva, que protege o organismo contra câncer, retarda o processo de envelhecimento e inibe a formação de radicais livres (Bontempo, 2008).

Na tabela 1, é mostrada a composição de AG de alguns óleos e gorduras. A composição de lipídios é variável e depende das espécies animais e vegetais envolvidas, bem como a dieta ou fatores climáticos (Bontempo, 2008). O mais abundante dos AG saturados é o ácido palmítico (C16:0), e dos AG insaturados é o ácido oleico (C18:1 Δ^9). Os AG insaturados predominam sobre os ácidos saturados, na maioria das plantas e animais.

Tabela 1. Composição de alguns AG em óleos e manteiga.

| Gorduras | Percentual de Ácidos Graxos | | | | | |
|-----------------|-----------------------------|-----------|-----------|---------|-----------|------------|
| | Mirístico | Palmítico | Esteárico | Oleico | Linoleico | Linolênico |
| manteiga | 8 -13 | 25 - 32 | 8 -13 | 22 - 29 | 2 - 4 | |
| azeite de oliva | 0 - 2 | 7 - 20 | 2 - 3 | 53 - 86 | 4 - 22 | |
| óleo de milho | 1 - 2 | 8 -12 | 2 - 5 | 29 - 49 | 34 - 56 | |
| óleo de soja | 0 - 1 | 6 - 10 | 2 - 5 | 20 - 30 | 50 - 60 | 2 - 10 |

Fonte: Bontempo, 2008.

1.1. ACIDEZ

O teor de ácidos graxos livres AGL é um dos mais importantes parâmetros no controle de qualidade de óleos vegetais, em especial, os azeites de oliva. O Regulamento da Comissão Europeia, de 1991, indica a análise titrimétrica (ou titulação volumétrica) a frio para análise de acidez em azeites de oliva, que consiste na dissolução da amostra em uma mistura de dietil-éter (ou tolueno) e álcool etílico (EtOH), na proporção de 1:1 v/v, utilizando-se hidróxido de sódio, como titulante e fenolftaleína, como indicador (Ecc, 1991).

A acidez em óleos vegetais é devido à reação de hidrólise de triacilglicerídeos, onde AGL são formados. Fatores como infestação de insetos nos frutos ou grãos, tempo entre colheita e extração do óleo, presença de fungos, extrações sem cuidados devidos e o contato entre óleo e água, aumentam a acidez. Quanto mais elevada acidez, maiores serão a deterioração do azeite e a presença de ranço.

A rancidez, seja hidrolítica ou oxidativa, é a deterioração dos lipídios e constitui-se em um dos problemas técnicos mais importantes na indústria de alimentos. A rancidez hidrolítica resulta da hidrólise da ligação éster, por lipase ou umidade, de óleos e gorduras com produção de AGL. Os AGL formados são responsáveis pelo sabor e odor desagradáveis, especialmente em gorduras como a manteiga, que possui grande quantidade de ácidos graxos de baixo peso molecular. Porém, em gorduras com AG não-voláteis, o sabor e odor característicos não surgem juntamente com a deterioração. Nesse caso, é muito importante a medida quantitativa de AGL para se determinar o grau de deterioração (Osawa, Gonçalves e Ragazzi, 2006).

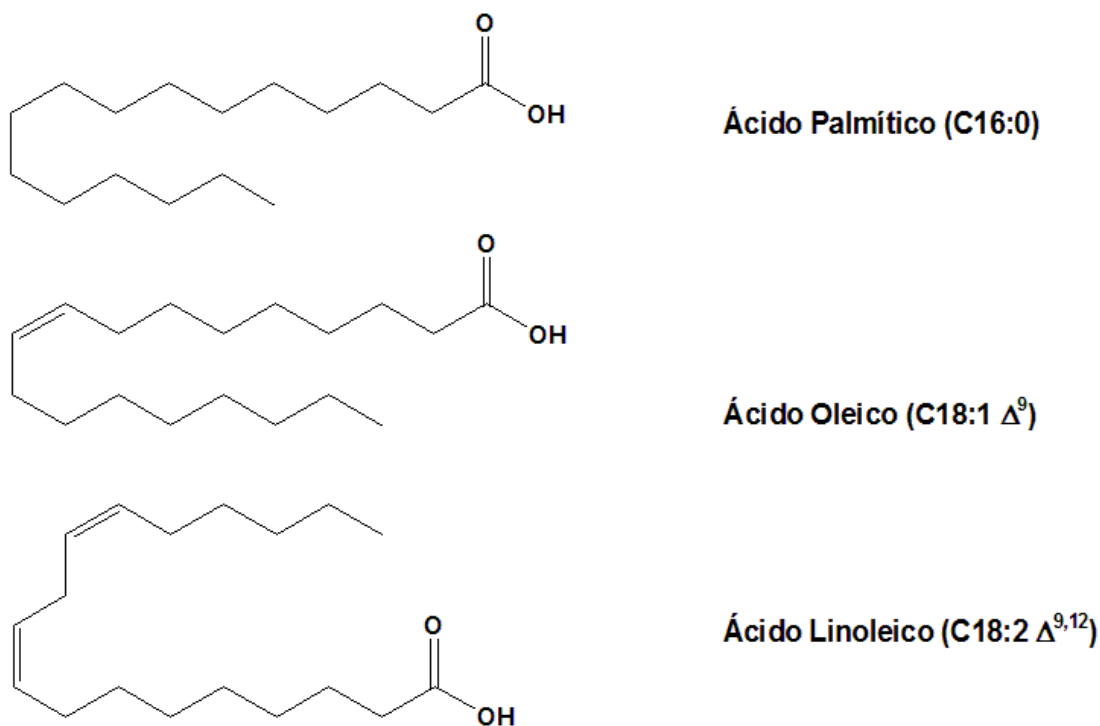
Estudos realizados com ratos mostraram que a presença de alimentos rançosos na dieta pode contribuir na inativação parcial ou destruição de vitaminas A, D e K, caroteno, tocoferóis, ácido ascórbico e ácidos graxos essenciais, além de alterar o funcionamento do sistema digestivo (Greenberg e Frazer, 1953).

Na literatura, há alguns métodos para análise de acidez em óleos vegetais, dentre eles, encontram-se espectroscopia por infravermelho (IR, *Infrared*) (Cayuela, Garcia e Caliani, 2009), cromatografia à gás (CG), (Lercker e Rodriguez-Estrada, 2000), análise por injeção de fluxo (Soares *et al.*) (Makahleh e Saad, 2011) e eletroforese capilar (CE) (Balesteros *et al.*, 2007).

2. ÁCIDOS GRAXOS

Segundo a IUPAC, a nomenclatura de AG é estabelecida a partir do carbono do grupo carbonila, como número um e a posição da insaturação é representada por Δ^n , onde n indica o número do carbono insaturado. A representação simplificada dos AG é dada por: número total de carbonos : número de ligações duplas, $\Delta^{\text{posição das insaturações}}$ (Iupac, 1997). A Figura 2 mostra exemplos de AG, com suas respectivas nomenclaturas.

Figura 2. Estruturas de AG e suas respectivas nomenclaturas.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA.

Há, na literatura, diversos métodos analíticos para determinação de AG, entre eles, encontram-se IR, (Aocs, 1999; Mossoba, Adam e Lee, 2001; Mossoba *et al.*, 2007), cromatografia à líquido de alta performance (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) (Delmonte *et al.*, 2004; Delmonte e Rader, 2007), e o método

clássico, por CG, com detecção por ionização por chama (FID, *Flame Ionization Detector*) (Golay *et al.*, 2009).

Uma das técnicas, em crescimento, na análise de AG, em diversos tipos de amostras, desde alimentos a amostras biológicas, é a eletroforese capilar (CE, *Capillary Electrophoresis*) (Oliveira *et al.*, 2001; Bannore *et al.*, 2008; Porto, De Souza e De Oliveira, 2011; Barra *et al.*, 2012; Castro *et al.*, 2013).

3. ELETROFORESE CAPILAR

Eletroforese capilar é uma técnica analítica e instrumental de separação baseada na migração diferenciada de compostos neutros, iônicos ou ionizáveis em um meio líquido condutor, sob a influência de campo elétrico (Baker, 1995; Tavares, 1996). As separações em CE são conduzidas na presença de um fluxo eletricamente induzido, denominado fluxo eletro-osmótico, que faz com que os analitos se movimentem em direção ao detector.

A separação é conduzida em tubos capilares de sílica fundida preenchidos com solução tampão, denominada eletrólito ou tampão de corrida. A alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados e baixas correntes, resultando em separações de alta eficiência, resolução e tempos relativamente curtos. Nos instrumentos disponíveis comercialmente, os capilares são mantidos em cartuchos, garantindo maior proteção da janela de detecção e fácil inserção no instrumento. O controle de temperatura ao redor do capilar é realizado através de ar ou líquido refrigerante, o que proporciona separações reproduzíveis (Queiroz e Jardim).

Além disso, a CE permite pequena demanda de amostras e solventes (Tavares, 1997). A amostra é introduzida em uma das extremidades do tubo e um potencial de corrente contínua é aplicado entre os dois eletrodos durante a separação. Os analitos separados são observados por um detector localizado na extremidade oposta à usada para injeção da amostra (Skoog, Crouch e Pasquini, 2009). A Figura 3 representa um esquema do instrumento de CE.

A velocidade de migração v de um íon (cm s^{-1}) em um campo elétrico pode ser definida pela Equação (1).

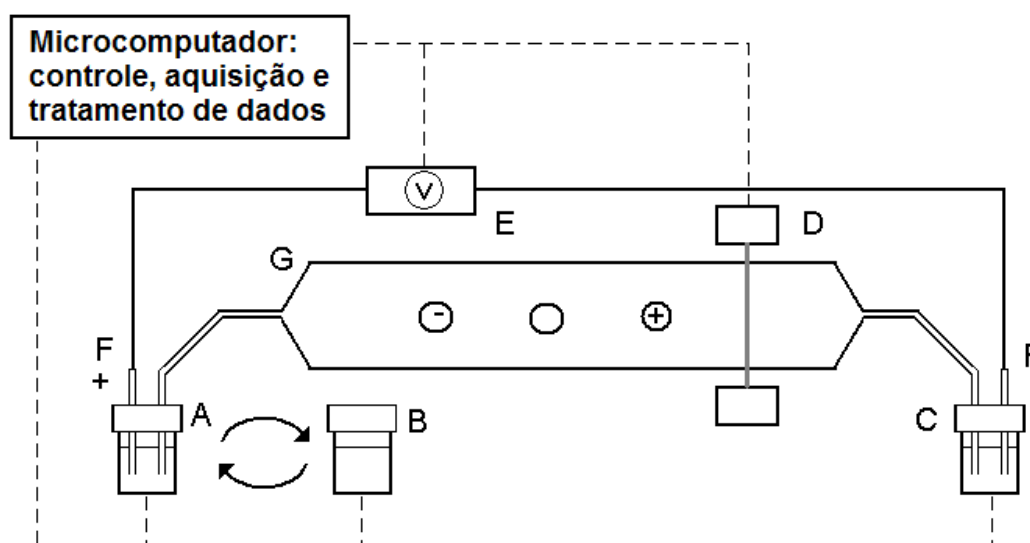
$$v = \mu_e E \quad (\text{Equação 1})$$

Onde E (V cm^{-1}) é a intensidade do campo elétrico e μ_e ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$) é a mobilidade eletroforética (Equação 2), que é proporcional à carga iônica (q) do analito e inversamente proporcional à viscosidade da solução tampão (η) e ao raio de hidratação do soluto (r) (Skoog, Crouch e Pasquini, 2009).

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (\text{Equação 2})$$

As separações estão baseadas, então, nas diferenças das relações carga-tamanho dos analitos presentes na amostra. Em função do sinal da carga, a μ_e de cátions será positiva, a de ânions será negativa e a de compostos neutros será nula (Skoog, Crouch e Pasquini, 2009). Assim, para analitos de mesmo tamanho, quanto maior a carga, maior v ; para íons de mesma carga, quanto maior o tamanho, menor a v , em módulo.

Figura 3. Esquema para CE. (A) reservatório de entrada para eletrólito; (B) reservatório de entrada para amostra; (C); reservatório de saída de eletrólito e amostra; (D) detector; (E) fornecimento de alta voltagem; (F) eletrodos de platina; (G) capilar: o diâmetro foi aumentado desproporcionalmente para melhor visualização.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA.

Há alguns modos de separação por eletroforese capilar entre os mais utilizados estão: eletroforese capilar de zona (CZE, *Capillary Zone Electrophoresis*), cromatografia micelar eletrocinética capilar (MEKC, *Micellar Electrokinetic Capillary*

Chromatography), foco isoeletrico capilar, isotacoforese e eletroforese capilar em gel (Baker, 1995; Tavares, 1996; Skoog, Crouch e Pasquini, 2009).

Neste trabalho será destacado o método por CZE, utilizado nas análises.

3.1. ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA

Em CZE, o capilar é preenchido com solução tampão de composição constante e dois pequenos frascos (*vials*) também são preenchidos com a mesma solução tampão a fim de se mergulhar, um em cada um, um eletrodo, de maneira a estabelecer o campo elétrico (Baker, 1995; Tavares, 1996).

O fluxo eletro-osmótico normal ocorre do anodo para o catodo, através do capilar. Na presença do fluxo eletro-osmótico, a medida da mobilidade observada ($\vec{\mu}_{obs}$) é representada pela mobilidade eletro-osmótica vetorial ($\vec{\mu}_e$) mais a mobilidade vetorial do fluxo eletro-osmótico ($\vec{\mu}_{FEO}$) (Equação 3). As moléculas ionizadas são separadas através da μ_e e tendem a migrar na direção do eletrodo de carga oposta.

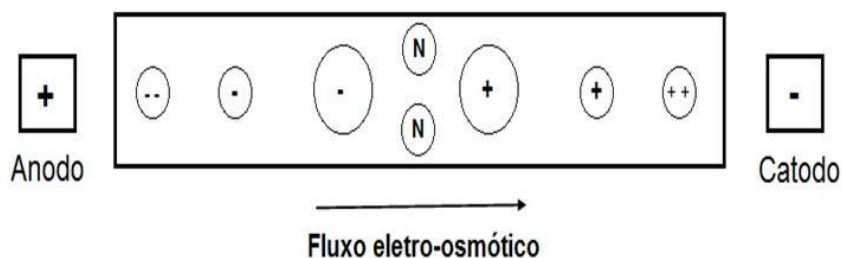
$$\vec{\mu}_{obs} = \vec{\mu}_e + \vec{\mu}_{FEO} \quad (\text{Equação 3})$$

Os solutos neutros não são influenciados pela μ_e e, portanto, percorrem o capilar na mesma velocidade que o fluxo eletro-osmótico. Os analitos carregados positivamente migram em direção ao eletrodo negativo, sob a influência do fluxo eletro-osmótico e da μ_e , fazendo com que a mobilidade observada de cátions seja maior que o fluxo eletro-osmótico (Baker, 1995).

Os ânions, por sua vez, são atraídos para o eletrodo positivamente carregado (anodo), e se não houvesse o fluxo eletro-osmótico, os analitos carregados negativamente, não seriam detectados. Porém, usualmente, o fluxo eletro-osmótico é maior que a μ_e de ânions, assim os mesmos poderão ser detectados. Deste modo, a

ordem de migração será cátions, compostos neutros (estes, em uma única banda) e, depois, ânions (Baker, 1995) (Figura 4).

Figura 4. Migração de íons e compostos neutros em um capilar, através do fluxo eletro-osmótico normal.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA.

No presente trabalho, ocorre a separação de ânions de AG de cadeia longa de mesma carga, portanto, se considerarmos a forma esférica para estes ânions, quanto menor o tamanho da cadeia carbônica, maior o tempo de migração. Entretanto, em CZE, quando consiste na separação de AG saturados e insaturados, a ordem de eluição é influenciada pelas insaturações que modificam o tamanho da cadeia carbônica. Ainda assim, é possível prever a ordem de migração através do cálculo do comprimento de cadeia equivalente (CCE) (Equação 4).

$$CCE = N_C - 2N_{C-C} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde N_C é o número de carbono da cadeia carbônica e N_{C-C} é o número de insaturações.

Deste modo, é possível prever a ordem de eluição na separação que envolve os ácidos graxos palmítico (C16:0), oleico (C18:1 Δ^9) e linoleico (C18:2 $\Delta^9, 12$), por exemplo. O C16:0, apresenta 16 carbonos e nenhuma insaturação (CCE = 16); o C18:1 Δ^9 apresenta 18 carbonos e uma insaturação (CCE = 16) e o C18:2 $\Delta^9, 12$, 18 carbonos e

duas insaturações (CCE = 14). Portanto, C16:0 e C18:1 Δ^9 , eluem próximos, pois possuem o mesmo valor de CCE, enquanto o C18:2 $\Delta^9, 12$ possui maior tempo de migração.

3.2. DETECÇÃO

Em CE, cada íon migra em uma velocidade determinada por μ_e . Desse modo, as bandas de analito passam pelo detector a diferentes velocidades, resultando em picos que dependem dos tempos de migração e das concentrações do analito. Para manter o volume de detecção na escala de nL ou menor, a detecção é feita na própria coluna, retirando-se uma pequena seção de seu revestimento externo, por queima. Esta seção serve como cela do detector (Skoog, Crouch e Pasquini, 2009).

A detecção baseada na absorvância por luz ultravioleta ou na região do visível (UV/vis) é muito utilizada em CE. A luz incide sobre o capilar, onde a amostra absorve parte desta luz e a outra parte é detectada por um fotodetector, geralmente, um fotodiodo (Baker, 1995). O princípio da detecção por UV/vis é baseada na Lei de Beer, onde a absorvância é expressa na Equação 5.

$$A = abc \quad (\text{Equação 5})$$

Onde a é a absorvância molar, b é o comprimento óptico (cm), que no caso do capilar é seu diâmetro interno e C é a concentração do soluto. A absorvância depende do cromóforo (grupo da molécula que absorve a luz) do soluto, do comprimento de onda da luz incidente, do pH e da composição do eletrólito.

Para compostos que possuem baixa absorvância, é possível utilizar a detecção indireta. Nesta técnica, um cromóforo iônico é colocado no eletrólito, assim, o detector recebe um sinal constante devido à presença dessa substância. Desse modo, o sinal do detector diminui durante a passagem do analito, que é então determinado pelo decréscimo da absorvância (Skoog, Crouch e Pasquini, 2009).

4. OBJETIVO

O principal objetivo deste trabalho é a otimização de metodologia alternativa e, por eletroforese capilar de zona, para a determinação dos teores de acidez livre, em diferentes tipos de óleos vegetais.

A determinação da acidez livre deverá ser realizada através de ácidos graxos livres majoritários presentes nas amostras, e comparada ao método oficial de análise afim de comprovar que o método, por eletroforese capilar, poderá ser utilizado como alternativa para tal determinação.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. MATERIAIS E REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e a água purificada por sistema de osmose reversa. Metanol (MeOH), etanol (EtOH) e ácido clorídrico (HCl) (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); acetonitrila (ACN) (Merck, Rio de Janeiro, Brasil), 1-octanol (Merck, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro Brasil) e hexano (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) foram adquiridos com grau cromatográfico. Polioxoetileno 23 lauril éter (Brij 35[®]) e dodecilbenzenosulfonato de sódio (SDBS) foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), e hidróxido de sódio (NaOH) foi obtido de Synth (São Paulo, Brasil).

Os padrões dos ácidos tridecanoico (C13:0), palmítico (C16:0), oleico (C18:1 Δ^9) e linoleico (C18:2 $\Delta^{9,12}$) foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Soluções estoques individuais dos ácidos graxos foram preparadas em metanol na concentração de 20,0 mmol L⁻¹ e soluções individuais de ésteres metílicos foram preparadas em hexano na concentração de 30,0 mmol L⁻¹. Todas as soluções foram estocadas no freezer até o momento das análises. Mistura dos padrões foram preparadas no dia da injeção a partir da diluição adequada dos estoques.

A solução estoque de Brij 35[®] foi preparada na concentração de 50,0 mmol L⁻¹ e mantida sob refrigeração de 5° C para evitar a formação de mofo. Para a solução estoque aquosa de SDBS, foi pesada e dissolvida a massa correspondente a 100,0 mmol L⁻¹ em um balão volumétrico de 100,0 mL.

A solução tampão estoque (pH ~ 6.86) na concentração de 100,0 mmol L⁻¹ foi preparada a partir da solução de fosfato monobásico de sódio (NaH₂PO₄) 50,0 mmol L⁻¹ e 50,0 mmol L⁻¹ de fosfato dibásico de sódio (Na₂HPO₄), que também foi mantida sob refrigeração para evitar bolor.

Para as análises por CE, o eletrólito de trabalho foi preparado no dia das análises, pela diluição apropriada das soluções estoques e adição de solventes.

5.2. INSTRUMENTAÇÃO

Os experimentos foram conduzidos em equipamento de CE 7100 (HP3d CE, Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA), disponível na Universidade Federal de Juiz de Fora, equipado com detector por arranjo de diodos (DAD), com detecção indireta por UV em 224 nm, temperatura controlada no interior do cartucho em 25°C, aquisição e tratamento de dados em software (HP ChemStation, rev A.06.01). As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (12.0 mbar por 4 s) e o sistema eletroforético foi operado sob polaridade normal e voltagem constante de + 19 kV. Para todos os experimentos foi utilizado o capilar de sílica fundida com revestimento externo de flúor-polímero (TSH) (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA): 48.5 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo), 75 µm diâmetro interno (d.i.) e 375 µm de diâmetro externo.

Neste trabalho, o capilar do tipo TSH foi utilizado em substituição ao capilar com revestimento externo de poliamida, a fim de se evitar problemas na reprodutibilidade das análises, como foi demonstrado por Balesteros e colaboradores (Balesteros *et al.*, 2007), pois o capilar revestido externamente com poliamida pode sofrer dilatação, quando em contato com alguns solventes orgânicos, especialmente, ACN (Baeuml e Welsch, 2002).

Em determinados casos, a ACN é indispensável como solvente orgânico, assim, em alguns trabalhos, pode ser observada a remoção de uma pequena parte nas extremidades do capilar (Guttman e Schwartz, 1995; Balesteros *et al.*, 2007), deste modo, a perda na eficiência da separação pode ser diminuída. Entretanto, o capilar torna-se mais frágil nas extremidades, originando, na maioria das vezes, uma quebra não retangular, resultando um campo elétrico não uniforme (Baeuml e Welsch, 2002). Segundo Baeuml & Welsch (Baeuml e Welsch, 2002), esta dilatação do revestimento externo de poliamida pode ser evitada se o capilar for submetido ao aquecimento de 300°C por 240h, o que não é vantajoso se for considerados o longo período de tempo (10 dias) e que o capilar tipo TSH não necessita de nenhum pré-tratamento deste tipo.

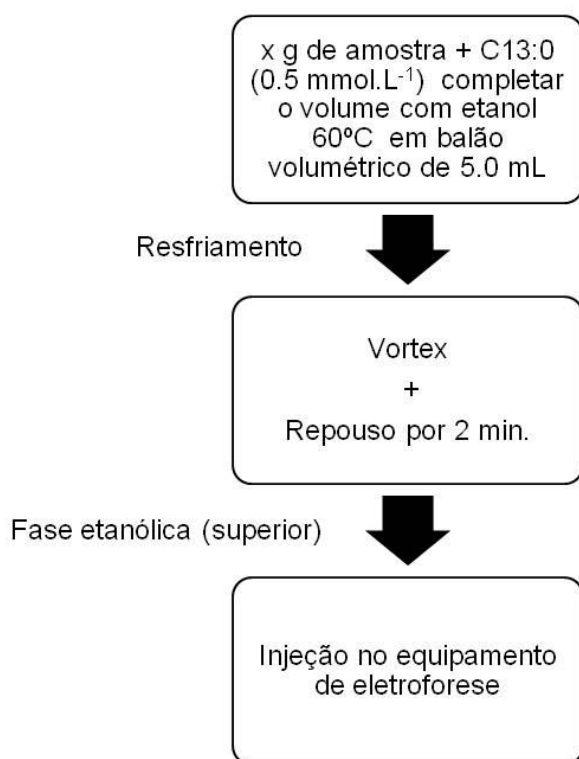
5.3. PREPARO DAS AMOSTRAS

As amostras de óleos vegetais (azeites de oliva extravirgem e virgem, óleos de girassol, soja de duas diferentes marcas, representadas por A e B e utilizados em frituras) foram obtidas comercialmente, exceto o óleo de fritura, obtido por meio de doações aleatórias e, portanto, não foi possível determinar seu tempo de uso.

O ponto principal no preparo das amostras foram as massas a serem pesadas, para isto, levou-se em conta o perfil de resolução observado. Assim, quanto maior a acidez esperada, menor deveria ser a quantidade de massa. As massas medidas foram 0,50; 0,75 e 1,50 g, para azeites de oliva virgem, extravirgem e demais óleos vegetais, respectivamente.

As amostras já pesadas foram transferidas para um balão de 5,0 mL, adicionou-se $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de C13:0, utilizado com padrão interno (PI) e o volume foi ajustado com EtOH aquecido à 60°C . O balão foi submetido à agitação manual e após o resfriamento, o volume foi completado novamente com EtOH em temperatura ambiente. O balão foi levado ao vortex por 2 min. e mantido em repouso por mais 2 min. Uma alíquota da fase etanólica (superior) foi injetada no equipamento de CE. As análises foram realizadas em duplicatas autênticas (Figura 5).

Figura 5. Esquema do preparo de amostras de óleos para eletroforese capilar.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA.

5.4. PROCEDIMENTO ANALÍTICO PARA AS ANÁLISES

Antes do uso, os capilares novos foram condicionados através de flush com NaOH 1.0 mmol L⁻¹ (40 min), água purificada por osmose reversa (15 min.) e solução do eletrólito (15 min.). Entre as corridas, houve a limpeza do capilar com NaOH 1.0 mmol L⁻¹ (2 min.), água (2 min.) e solução de eletrólito (2 min.). Este condicionamento mostrou-se satisfatório para repetibilidade dos tempos de análise e resolução dos picos.

O eletrólito de corrida utilizado para as análises de AGL foi baseado em um trabalho, já publicado, que consistia em 15 mmol L⁻¹ de solução tampão NaH₂PO₄ /

Na_2HPO_4 (pH ~ 6.86); $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de SDBS; $8,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de Brij 35[®], 45% v/v de ACN e 2,1% de 1-octanol (De Castro Barra *et al.*, 2012).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. CÁLCULO DO FATOR DE RESPOSTA (F_r)

A quantificação de AGL pode ser determinada através do cálculo do fator de resposta, utilizando C13:0 como PI. Para se calcular F_r , três curvas analíticas (uma para cada ácido graxo) foram construídas com réplicas autênticas em cada ponto. Foram utilizadas soluções padrões de C16:0, C18:1 Δ^9 e C18:2 $\Delta^9, 12$, nas concentrações de 0,2; 0,6; 1,0; 1,4; 1,8 e 2,2 mmol L⁻¹ e a concentração do PI foi fixada em 0,5 mmol L⁻¹. Os modelos foram executados com replicatas autênticas e sua avaliação pode incluir a remoção de pontos em cada nível, se necessário sem prejudicar a previsão correta do modelo. A homocedasticidade dos resíduos foi verificada por teste de Levene (diferentes números de replicatas em um mesmo nível) ou teste de Cochran (mesmo número de replicatas no mesmo nível) e a independência foi verificada pelo teste de Durbin-Watson.

Os valores utilizados nos modelos de regressão estão contidos na Tabela 2.

Tabela 2. Valores utilizados para o modelo de regressão.

| AGL | [AGL] / [PI] | 1ª replicata* | 2ª replicata* | 3ª replicata* |
|-----------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
| C18:1 Δ^9 | 1,2 | 78,7 | 70,7 | --- |
| | 2,0 | 96,1 | 90,3 | --- |
| | 2,8 | 208,2 | 147,6 | --- |
| | 3,6 | 194,2 | 181,5 | --- |
| | 4,4 | 292,8 | 303,6 | --- |
| C16:0 | 0,4 | 36,9 | 31,8 | --- |
| | 1,2 | 111,5 | 129,4 | --- |
| | 2,0 | --- | 179,9 | --- |
| | 2,8 | 208,5 | 217,9 | --- |
| C18:2 $\Delta^{9,12}$ | 0,4 | 33,4 | 28,3 | 28,2 |
| | 2,0 | 134,6 | 127,1 | 160,2 |
| | 2,8 | 243,8 | 220,7 | 211,4 |
| | 3,6 | 262,2 | 317,0 | 344,1 |
| | 4,4 | 367,6 | 406,8 | 472,4 |

*Valores das áreas dos picos.

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA.

Foi aplicado, então, o teste de hipótese a priori (Danzer e Currie, 1998; Faria, Souza e Oliveira, 2008), que consiste na comparação dos desvios das médias com os desvios padrão (s_{yx}) (Equação 6).

$$F_{calc} = \frac{S_{y,x}^2}{S_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p - 2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / (m - p)} \quad (\text{Equação 6})$$

Onde m_i é o número de medidas, p é o número de parâmetros do modelo e m é o produto entre m_i e p .

Na verificação da falta de ajuste, se o valor de $F_{calculado}$ for menor que o valor de $F_{tabelado}$, dentro do intervalo estimado, não haverá falta de ajuste do modelo e o coeficiente angular da equação obtida poderá ser usado como F_R para a quantificação do respectivo AG nas amostras. Como o valor de $F_{calculado}$ foi menor que o valor de $F_{tabelado}$ para todas as curvas analíticas obtidas, pode-se afirmar com 95% de confiança que para

o intervalo estimado, não há evidências de falta de ajuste nos modelos implementados e, portanto, os F_r s encontrados podem ser utilizados para quantificar os AG (Tabela 3).

Tabela 3. Cálculo do fator de resposta

| AGL | C. Angular | C. Linear | r | $F_{\text{calculado}}$ | F_{tabelado} |
|-----------------------|-----------------------|------------------------|-------|------------------------|-----------------------|
| C18:1 Δ^9 | 0.526 (± 0.016) | -0.143 (± 0.048) | 0.996 | 4.42 | 5.41 ^a |
| C16:0 | 0.622 (± 0.024) | -0.013 (± 0.048) | 0.994 | 1.80 | 6.59 ^b |
| C18:2 $\Delta^{9,12}$ | 0.604 (± 0.012) | -0.078 (± 0.037) | 0.997 | 2.86 | 3.71 ^c |

^a $F_{\text{tab}}(v_1=3, v_2=5)$; ^b $F_{\text{tab}}(v_1=3, v_2=4)$; ^c $F_{\text{tab}}(v_1=3, v_2=10)$

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA.

Assim, a quantificação pode ser realizada através da Equação 7.

$$\frac{A_{AGL}}{[AGL]} = F_r \frac{A_{PI}}{[PI]} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde A_{AGL} é a área de cada AGL, $A_{C13:0}$ é a área do PI, $[AGL]$ é a concentração em mmol L^{-1} para cada AG e $[PI]$ é a concentração de PI, fixada em 0.5 mmol L^{-1} .

Os modelos de regressão foram considerados satisfatórios e, portanto, os valores dos coeficientes angulares encontrados podem ser considerados como F_r , desde que $[C13:0]$ seja fixado em $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$. Assim, os valores de porcentagem de acidez nas amostras podem ser calculadas através da Equação 8.

$$\%_{\text{acidez}} = \frac{MM_{C18:1c} [C13:0] V \sum A_{xi}}{F_r A_{C13:0} m} 100 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde A_{xi} é a área de cada AGL nas amostras (C18:1 Δ^9 , C16:0, C18:2 $\Delta^{9,12}$), $A_{C13:0}$ é a área do PI, $[C13:0]$ é a concentração do PI ($0,5 \text{ mmol L}^{-1}$), V é o volume em

litros, m é a massa da amostra em miligramas, F_r é o fator de resposta e $MM_{C18:1 \Delta^9}$ é a massa molecular de $C18:1 \Delta^9$ (282,5 g mol⁻¹).

6.2. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Para os AG detectados nas amostras, é possível calcular o limite de detecção (LOD, *Limit Of Detection*) e o limite de quantificação (LOQ, *Limit Of Quantification*) (Skoog, Crouch e Pasquini, 2009).

O LOD representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (Harris, 2008; Skoog, Crouch e Pasquini, 2009) e pode ser calculado de três maneiras diferentes: *i*) método visual (determinado pela análise de amostras em concentrações conhecidas do analito), *ii*) método relação sinal-ruído (aplicada somente em procedimentos analíticos que exibem ruído da linha de base, comparando-se os sinais medidos a partir de amostras em baixas concentrações conhecidas do analito) e *iii*) método baseado em parâmetros da curva analítica (utilizando-se os coeficientes angular e linear da curva analítica) (Group, 2005).

LOQ representa a menor concentração da substância em exame que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis (Skoog, Crouch e Pasquini, 2009) e pode ser calculado através dos métodos: visual, relação sinal-ruído e baseado em parâmetros da curva analítica (Group, 2005).

No presente trabalho, tanto LOD quanto LOQ, foram calculados a partir da relação sinal-ruído (Equações 9 e 10, respectivamente).

$$LOD = \frac{3 \times S_{ruído} \times C_{analito}}{H_{máxima} - H_{mínima}} \quad (\text{Equação 9})$$

$$LOQ = \frac{10 \times S_{\text{ruído}} \times C_{\text{analito}}}{H_{\text{máxima}} - H_{\text{mínima}}} \quad (\text{Equação 10})$$

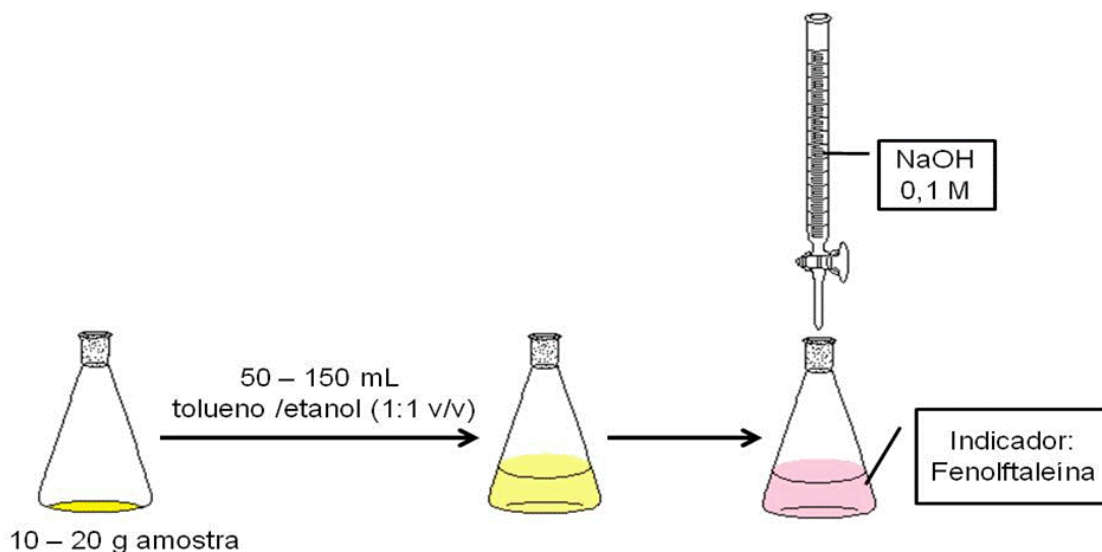
Onde $S_{\text{ruído}}$ é o desvio padrão do ruído, C_{analito} é a concentração do analito, $H_{\text{máxima}}$ é a altura máxima do pico e $H_{\text{mínima}}$ é a altura da base do pico.

Os limites de detecção ($\mu\text{mol L}^{-1}$) foram 7,91 para C18:1 Δ^9 , 6,96 para C16:0 e 9,06 para C18:2 $\Delta^9, 12$. Os limites de quantificação ($\mu\text{mol L}^{-1}$) foram 26,35; 23,21 e 30,19 para C18:1 Δ^9 , C16:0 e C18:2 $\Delta^9, 12$, respectivamente.

6.3. COMPARAÇÃO ENTRE TITULAÇÃO VOLUMÉTRICA E ELETROFORESE CAPILAR

O método oficial para determinação da acidez livre em óleos vegetais é a titulação volumétrica alcalina, que segundo o Regulamento da Comissão Europeia de 1991 (Ecc, 1991), consiste na titulação de 10 a 20 g da amostra, utilizando-se como solvente de 50 a 150 mL da mistura de tolueno / etanol (1:1 v / v), solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, como titulante e fenolftaleína como indicador (Figura 6). Este procedimento apresenta, como dificuldade, a visualização do ponto final, já que a solução a ser titulada apresenta-se colorida.

Figura 6. Procedimento para determinação de acidez livre em óleos



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA.

O método proposto, por CE, apresenta algumas vantagens, quando comparado ao método oficial, como os menores volumes de solventes e amostra, a identificação de cada ácido graxo livre presente, o que pode ser interessante, pois o processo de oxidação aumenta com o aumento do grau insaturação de AGL que funciona como catalisador na reação de decomposição de peróxidos (Paradiso *et al.*, 2010), além de que a observação visual é dispensável para a determinação da acidez.

Assim, foram determinados os valores de acidez livre, em duplicatas autênticas, de azeites de oliva extravirgem e virgem e óleo de soja da marca A, por titulação volumétrica e CE (Tabela 4), e não houve diferenças significativas no nível de 95%, segundo o teste de Wilcoxon que compara os valores, relacionados em pares, não-paramétricos.

Tabela 4. Comparação entre CE e titulação volumétrica para óleos vegetais.

| Amostra | CE / % acidez | Titulação / % acidez |
|------------------------|---------------|----------------------|
| Azeite de oliva | 0,35 | 0,36 |
| extravirgem | 0,40 | 0,35 |
| Azeite de oliva virgem | 1,68 | 1,20 |
| | 1,65 | 1,20 |
| Óleo de soja A | 0,07 | 0,07 |
| | 0,07 | 0,07 |

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA.

Assim, como não há diferenças significativas com o método oficial, o método por CE pode ser utilizado como alternativa para a determinação de acidez livre em óleos vegetais (Tabela 5).

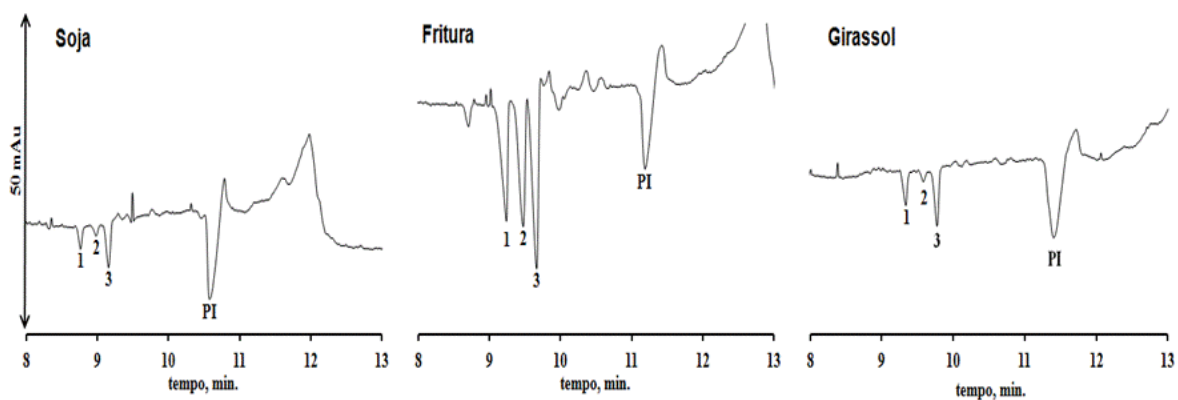
Tabela 5. Valores de acidez de outros óleos vegetais.

| Amostras de óleo | % acidez, em ácido oleico g/100g |
|------------------|-------------------------------------|
| Soja B | 0,0358 ($\pm 0,007$) |
| Girassol | 0,0364 ($\pm 0,005$) |
| Fritura | 0,3016 ($\pm 0,004$) |

Fonte: ELABORADO PELA AUTORA.

A Figura 7 mostra eletroferogramas da análise de acidez de alguns óleos vegetais. O uso do CE também pode apresentar vantagens frente ao método de titulação potenciométrica (método oficial para amostras de biodiesel), como: menores quantidades de amostras e de solventes orgânicos e menor toxicidade.

Figura 7. Eletroferogramas de óleos vegetais. Eletrólito: 15 mmol L⁻¹ de solução tampão NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH ~ 6.86), 4.0 mmol L⁻¹ de SDBS, 8.3 mmol L⁻¹ de Brij 35®, 45% v/v de ACN e 2.1% de octanol. Picos: (1) C18:1 Δ⁹; (2) C16:0; (3) C18:2 Δ^{9,12}; (PI) C13:0.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA.

7. CONCLUSÕES

Um método alternativo por CE, para análise de AGL, em amostras de óleos vegetais, foi proposto e apresentou um simples preparo de amostra, curto tempo de análise e baixo consumo de solventes orgânicos e amostra.

Esta análise pode ser importante para verificação de fraudes em óleos vegetais, especialmente, azeites de oliva e também para a escolha da melhor rota catalítica para reações de transesterificação, na produção de biodiesel.

Em amostras de óleos vegetais, não houve diferenças significativas, no intervalo de 95% de confiança, quando os métodos por CE e o oficial são comparados (titulação volumétrica). No presente trabalho, a metodologia por CE apresentou algumas vantagens como o menor volume utilizado de solventes e amostra, a identificação individual de cada AGL e ainda, pode diminuir erros, pois a observação nas mudanças de coloração é dispensável.

8. PERSPECTIVAS

Há a perspectiva para a análise de acidez livre em amostras de biodiesel. Este parâmetro, assim, como para óleos vegetais é importante para tal combustível, já que pode indicar, além da presença de água, a transesterificação incompleta.

Para a determinação do melhor solvente para as análises de acidez em biodiesel, foram realizadas análises com isopropanol, MeOH e EtOH. Assim, até o presente momento, pela observação dos eletroferogramas, as análises com MeOH foram as que apresentaram menores ruídos e melhor separação, quando comparado aos demais solventes.

Isto se deve, provavelmente, à menor viscosidade do MeOH. O modo de injeção hidrodinâmica, utilizado neste trabalho, consiste na aplicação de diferença de pressão entre as duas extremidades do capilar. A quantidade de amostra injetada pode ser calculada pela equação de Poiseuille (Equação 11) (Xu, 1996).

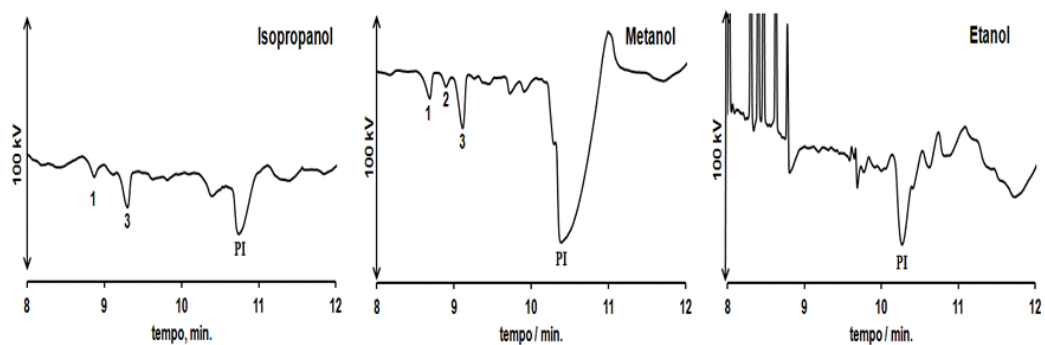
$$V_c = \frac{\Delta P \pi (d.i.)^4 t}{128 \eta L} \quad \text{(Equação 11)}$$

Onde V_c é o volume de amostra injetada, ΔP é a diferença de pressão entre as extremidades do capilar, $d.i.$ é o diâmetro interno do capilar, t corresponde ao tempo de injeção, η é viscosidade da amostra e L , comprimento total do capilar.

Assim, quanto menor a viscosidade da amostra, maior o volume injetado e maior quantidade de analito, como pode ser observado, comparando as análises com as amostras diluídas em MeOH e isopropanol (Figura 8)., deste modo, uma maior concentração dos analitos pode ser injetada

Entretanto, novos estudos deverão ser realizados afim de otimizar o método para análises de acidez livre em biodiesel, como concentração de PI para quantificação de AGL, outros possíveis solventes para diluição da amostra e, ainda, proporções de solventes e reagentes no eletrólito para, assim, obter melhores separações.

Figura 8. Eletroferogramas com diferentes solventes em análises de acidez livre em biodiesel. Eletrólito: 15 mmol L⁻¹ de solução tampão NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ (pH ~ 6.86), 4.0 mmol L⁻¹ de SDBS, 8.3 mmol L⁻¹ de Brij 35®, 45% v/v de ACN e 2.1% de octanol. Picos: (1) C18:1 Δ⁹; (2) C16:0; (3) C18:2 Δ^{9,12}; (PI) C13:0.



Fonte: ELABORADO PELA AUTORA.

REFERÊNCIAS

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

BAEUML, F.; WELSCH, T. Improvement of the long-term stability of polyimide-coated fused-silica capillaries used in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 961, n. 1, p. 35-44, Jun 28 2002. ISSN 0021-9673.

BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis (Techniques in Analytical Chemistry)**. 1. John Wiley & Sons Inc., 1995.

BALESTEROS, M. R. et al. Determination of olive oil acidity by CE. **Electrophoresis**, v. 28, n. 20, p. 3731-3736, Oct 2007. ISSN 0173-0835. D

BANNORE, Y. C. et al. Capillary electrophoresis of some free fatty acids using partially aqueous electrolyte systems and indirect UV detection. Application to the analysis of oleic and linoleic acids in peanut breeding lines. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 14, p. 2667-2676, Aug 2008. ISSN 1615-9306.

BARRA, P. M. D. et al. A rapid method for monitoring total trans fatty acids (TTFA) during industrial manufacturing of Brazilian spreadable processed cheese by capillary zone electrophoresis. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 456-461, Feb 2012. ISSN 0956-7135.

BONTEMPO, M. **Azeite de oliva: sabor, estética e saúde**. São Paulo: Alaúde Editorial, 2008.

CASTRO, R. D. C. et al. Analysis of the main conjugated linoleic acid (CLA) precursors (C18:2 n-6 and C18:3 n-3) in *Brachiaria ruziziensis* by capillary zone electrophoresis. **Central European Journal of Chemistry**, v. 11, n. 8, p. 1286-1296, Aug 2013. ISSN 1895-1066.

CAYUELA, J. A.; GARCIA, J. M.; CALIANI, N. NIR prediction of fruit moisture, free acidity and oil content in intact olives. **Grasas Y Aceites**, v. 60, n. 2, p. 194-202, Apr-Jun 2009. ISSN 0017-3495.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part 1. Fundamentals and single component calibration. 1998.

DE CASTRO BARRA, P. M. et al. A rapid method for monitoring total trans fatty acids (TTFA) during industrial manufacturing of Brazilian spreadable processed cheese by capillary zone electrophoresis. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 456-461, 2012. ISSN 0956-7135.

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

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

ECC, E. C. R. **The characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis.** REGULATION, E. C. Commission Regulation (EEC) No 2568/91: Official Journal of the European Communities. July, 1991 1991.

FARIA, A. F.; SOUZA, M. V. N. D.; OLIVEIRA, M. A. L. D. Validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and ofloxacin in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 389-396, 2008. ISSN 0103-5053.

GOLAY, P. A. et al. Streamlined Methods for the Resolution and Quantification of Fatty Acids Including Trans Fatty Acid Isomers in Food Products by Gas Chromatography. **Journal of AOAC International**, v. 92, n. 5, p. 1301-1309, 2009.

GREENBERG, S. M.; FRAZER, A. C. Some Factors Affecting the Growth and Development of Rats Fed Rancid Fat. **Journal of Nutrition**, v. 50, n. 4, p. 421-440, 1953. ISSN 0022-3166.

GROUP, I. E. W. Validation of a analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1)

ICH Harmonised Tripartite Guideline, Published in the Federal Register, 19 May 1997, Vol. 62, No. 96, p. 27463-7, 2005. Disponível em: <<http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>>. Acesso em: Novembro.

GUTTMAN, A.; SCHWARTZ, H. E. Artifacts Related to Sample Introduction in Capillary Gel-Electrophoresis Affecting Separation Performance and Quantitation. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 13, p. 2279-2283, Jul 1 1995. ISSN 0003-2700.

HARRIS, D. C. **Química Analítica Quantitativa**. 7ª. Rio de Janeiro: 2008.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book")**. 2nd. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. ISBN 0-9678550-9-8.

LERCKER, G.; RODRIGUEZ-ESTRADA, M. T. Chromatographic analysis of unsaponifiable compounds of olive oils and fat-containing foods. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1-2, p. 105-129, Jun 9 2000. ISSN 0021-9673.

MAKAHLEH, A.; SAAD, B. Flow injection determination of free fatty acids in vegetable oils using capacitively coupled contactless conductivity detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 694, n. 1-2, p. 90-94, May 23 2011. ISSN 0003-2670.

MOSSOBA, M. M.; ADAM, M.; LEE, T. Rapid determination of total trans fat content - An attenuated total reflection infrared spectroscopy international collaborative study **Journal of AOAC International**, v. 84, n. 4, p. 1144-1150, 2001.

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

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

OSAWA, C. C.; GONÇALVES, L. A. G.; RAGAZZI, S. Potentiometric titration applied to free fatty acid determination of edible oils and fats. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 593-599, May-Jun 2006. ISSN 0100-4042.

OTIENO, A. C.; MWONGELA, S. M. Capillary electrophoresis-based methods for the determination of lipids - A review. **Analytica Chimica Acta** v. 624, n. 2, p. 163-174, 2008.

PARADISO, V. M. et al. Effects of free fatty acids on the oxidative processes in purified olive oil. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1389-1394, Jun 2010. ISSN 0963-9969.

PORTO, B. L. S.; DE SOUZA, M. V. N.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Analysis of Omega 3 Fatty Acid in Natural and Enriched Chicken Eggs by Capillary Zone Electrophoresis. **Analytical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 541-546, May 2011. ISSN 0910-6340.

QUEIROZ, S. C. D. N. D.; JARDIM, I. C. S. F. Eletroforese Capilar. **Chemkeys - Liberdade para aprender**, p. 9,

SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R.; PASQUINI, C. **Princípios de Química Analítica**. 6ª. Porto Alegre: 2009.

SOARES, A. T. et al. Chromatographic characterization of triacylglycerides and fatty acid methyl esters in microalgae oils for biodiesel production. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 5, n. 5, Sep 2013. ISSN 1941-7012.

TAVARES, M. F. M. Capillary electrophoresis: Basic concepts. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, Mar-Apr 1996. ISSN 0100-4042.

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

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

XU, Y. **Tutorial: capillary electrophoresis**. 1996.

APÊNDICE

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

Free fatty acid analysis associated with chemometric approach to monitoring extra virgin olive oil adulteration by CZE. Sato, R.T.; Castro, R.J.C.; Oliveira, M.A.L. 18° LACE, Buenos Aires, Argentina. 2012.

Análise rápida de ácidos graxos livres (AGL) em óleos vegetais por eletroforese capilar de zona Sato, R.T.; Castro, R.J.C.; Barra, P.M.C.; Oliveira, M.A.L. 17° ENQA, Belo Horizonte, Brasil. 2013.

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

Rapid separation of free fatty acids in vegetable oils by capillary zone electrophoresis. Sato, R.T.; Castro, R.J.C.; Barra, P.M.C.; Oliveira, M.A.L. *Phytochemical Analysis*. DOI 10.1002/pca.2499. 2014.