

# DETERMINAÇÃO DE FITOSTERÓIS, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DE ÓLEOS VEGETAIS, COM ÊNFASE NO AZEITE DE OLIVA

RENATA C. MELATO<sup>1</sup>; SUELI R. BAGGIO<sup>2\*</sup>, CLÁUDIA A. SILVA ALMEIDA<sup>3</sup>

Nº 0701038

## Resumo

Os fitosteróis estão naturalmente presentes em vegetais, sendo os óleos vegetais umas das principais fontes. Os principais fitosteróis encontrados são: campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. O presente trabalho teve como objetivo otimizar uma metodologia para determinação de fitosteróis e avaliar os parâmetros físico-químicos (índice de peróxidos, índice de refração, ácidos graxos livres e composição em ácidos graxos) em óleos vegetais. Os parâmetros físico-químicos foram realizados de acordo com a AOCS (2004). A composição dos ácidos graxos e dos fitosteróis foram determinadas por cromatografia gasosa, utilizando colunas capilares CP-SIL 88 (100 m x 0,25 mm i.d., 0,20 mm de filme) e HP-5MS (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25  $\mu$ m de filme), respectivamente. Os teores de fitosteróis variaram de 8,30 para o estigmasterol no óleo de canola a 512,66 mg/100g para o  $\beta$ -sitosterol no óleo de milho. Dos óleos vegetais analisados, o azeite apresentou os menores teores de fitosteróis totais (178,27 mg/100g) e o óleo de milho os maiores teores (803,09 mg/100g). O óleo de canola apresentou o menor teor de ácidos graxos saturados (8,70 g/100g). Os maiores teores de ácidos graxos poliinsaturados foram obtidos no óleo de soja (56,5 g/100g), seguido do óleo de girassol (52,1 g/100g). O azeite apresentou maior valor para os ácidos graxos monoinsaturados (66,2 g/100g), seguido do óleo de canola (61,7 g/100g).

## Abstract

The phytosterols are naturally found in vegetables, where the vegetable oils are one of the main sources. The main phytosterols found are: campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol. The objective of this work was to optimize the methodology for phytosterols determination and evaluate physicochemical parameters (peroxide value, refractive value, free fatty acids and fatty acids composition) in vegetable oils. The physicochemical parameters were realized according to AOCS (2004). The fatty acids and phytosterols composition were

---

<sup>1</sup>Bolsista CNPq; Graduação em Química, Instituto de Química/UNICAMP, Campinas-SP

<sup>2\*</sup>Orientador: Pesquisador, Centro de Química/ITAL, Campinas-SP, 13078-170, e-mail: Sueli@ital.sp.gov.br

<sup>3</sup>Colaborador: Assistente, Centro de Química/ITAL, Campinas-SP

obtained by gas chromatography, using a capillary column CP-SIL 88 (100 m x 0,25 mm i.d., 0,20 mm of film) and HP-5MS (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25  $\mu$ m of film), respectively. The phytosterols contents varied from 8,30 for stigmasterol in rapeseed oil to 512,66 mg/100g for  $\beta$ -sitosterol in corn oil. From all the vegetable oils analyzed, the olive-oil presented the smallest content of total phytosterols (178,27 mg/100g) and the corn oil the largest content (803,09 mg/100g). The rapeseed oil presented the smallest content of saturated fatty acids (8,70 g/100g). The largest content of polyunsaturated fatty acids were obtained in soybean oil (56,5 g/100g), followed by sunflower oil (52,1 g/100g). The olive oil presented the largest value for monounsaturated fatty acids (66,2 g/100g) followed by rapeseed oil (61,7 g/100g).

## **Introdução**

Os fitosteróis são constituintes naturais de vegetais, sendo os óleos vegetais uma das fontes mais ricas. A composição e os teores de fitosteróis podem variar de acordo com a espécie do vegetal, condições climáticas, qualidade da semente ou frutos, sistema de extração e processo de refinamento dos óleos vegetais. Os principais fitosteróis encontrados em óleos vegetais são: campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol, sendo o último o predominante. Outros fitosteróis como o  $\Delta$ -7-estigmasterol,  $\Delta$ -5-avenasterol e o  $\Delta$ -7-avenasterol, também podem ser encontrados (Belitz e Grosh, 1999). Devido às propriedades terapêuticas dos fitosteróis, como a redução da absorção do colesterol sanguíneo e a prevenção ao câncer, o interesse em quantificá-los em alimentos tem crescido muito. Além disso, tornou-se uma determinação importante para verificar a identidade e qualidade dos óleos vegetais, principalmente do azeite. Assim, o presente trabalho teve como objetivo otimizar uma metodologia para determinação de fitosteróis em óleos vegetais, caracterização físico-química e composição em ácidos graxos em óleos vegetais, verificando possíveis adulterações em azeites.

## **Materiais e Métodos**

### **Materiais**

Para a realização do planejamento experimental e validação da metodologia, para a determinação dos fitosteróis, foi utilizada uma amostra de Azeite de Oliva Espanhol. Foram analisados cinco tipos de óleos vegetais (soja, milho, girassol, canola e azeite). Para cada óleo foram analisadas três marcas diferentes, com exceção do azeite, que foram quatro

marcas. Para cada marca foram analisados três lotes com diferentes datas de validade. Cada lote foi composto por três unidades. As amostras foram adquiridas nos supermercados de Campinas/SP.

## **Métodos**

### **Determinação dos teores de fitosteróis em óleos vegetais**

A extração dos fitosteróis em óleos vegetais foi baseada no método de Mazalli *et al.* (2003). A otimização foi feita utilizando um planejamento experimental rotacional completo  $2^4$ , conforme metodologia descrita por Rodrigues e Lemma (2005), estudando as variáveis: temperatura, tempo de saponificação, número de extrações e peso da amostra. A quantificação dos fitosteróis, por CG, foi otimizada realizando testes de linearidade, recuperação, repetibilidade, limites de detecção e de quantificação. A recuperação foi determinada com a adição de dois níveis de cada fitosterol estudado à amostra, sendo realizadas oito repetições para cada nível de adição. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados de acordo com Keith *et al.* (1983).

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso (HP, modelo 6890), equipado com amostrador automático; injetor split, razão 15:1; coluna capilar HP-5MS (30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm de filme); detector por ionização de chama. As condições cromatográficas foram otimizadas com base na metodologia de Schmarr *et al.* (1996), sendo: temperatura da coluna programada, temperatura inicial 150 °C/0,1min, elevando-se para 300 °C numa escala de 100 °C/min, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos; gás de arraste hélio numa vazão de 1 mL/min; detector: gás “make-up”, nitrogênio a 30 mL/min e temperatura de 300 °C; injetor: temperatura 250 °C. A identificação dos picos foi realizada através de comparação do tempo de retenção das amostras com os padrões e por co-cromatografia e a quantificação por padronização interna, utilizando como padrão interno dihidrocolesterol (Sigma-Aldrich).

### **Parâmetros físico-químicos determinados**

As determinações de índice de peróxido, índice de refração e ácidos graxos livres foram realizadas em duplicata, seguindo os métodos oficiais da AOCS (2004).

## Determinação da composição em ácidos graxos

Aproximadamente 300 mg de lipídios foram utilizados para a reação de transmetilação realizada de acordo com o método de Hartman & Lago (1973), usando cloreto de amônia e ácido sulfúrico em metanol como agente esterificante. A cromatografia gasosa foi realizada em cromatógrafo Varian, modelo 3900, equipado com amostrador automático; injetor split, razão 75:1; coluna capilar CP-SIL 88 (100 m x 0,25 mm d.i.; 0,20 µm de filme); detector por ionização em chama (FID) e uma workstation com software Star. As condições cromatográficas utilizadas foram: temperatura da coluna programada, sendo temperatura inicial 120 °C/5min, aquecimento para 235 °C numa escala de 5 °C/min, permanecendo nesta temperatura por 15 minutos; gás de arraste, hidrogênio numa vazão de 1mL/min; gás “make-up”, nitrogênio a 30 mL/min; temperatura do injetor, 270 °C; e temperatura do detector, 310 °C. A identificação dos ácidos graxos foi realizada através da comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras com padrões e co-cromatografia. A quantificação foi realizada por normalização de área e os resultados expressos em g/100g de amostra.

## Resultados e Discussão

As condições otimizadas para a extração dos fitosteróis em óleos vegetais que apresentaram melhores resultados foram: massa da amostra igual a 0,3 g, número de extrações igual a 4 e tempo de saponificação igual a 3 horas. Como a temperatura não apresentou influência significativa sobre os resultados ( $p > 0,05$ ), optou-se pela temperatura de 50 °C. Para verificar a validade do modelo codificado realizou-se análise de variância e os resultados obtidos para os fitosteróis mostraram-se válidos ( $R^2 = 0,87\%$ ).

Os resultados dos testes de recuperação, obtidos a partir de dois níveis de adição, variaram de 96,4 a 104,5% para o  $\beta$ -sitosterol, de 96,1 a 97,1% para o campesterol e de 101 a 103% para o estigmasterol. Os limites de detecção e de quantificação para a determinação dos fitosteróis, por CG, obtidos a partir dos desvios-padrão de oito repetições, foram, respectivamente, 0,11 e 0,38 mg/g para o  $\beta$ -sitosterol, 0,02 e 0,08 mg/g para o campesterol e 0,02 e 0,06 mg/g para o estigmasterol.

Os teores de fitosteróis (Tabela 1) variaram de 8,30 para o estigmasterol no óleo de canola a 512,66 mg/100g para o  $\beta$ -sitosterol no óleo de milho. Dos óleos vegetais analisados no presente trabalho, o azeite apresentou menores teores de fitosteróis totais (178,27

mg/100g), enquanto que o óleo de milho os maiores teores (803,09 mg/100g). Através dos valores altos dos desvios-padrão obtidos, observa-se grande variação entre os lotes e marcas dos óleos vegetais analisados. Esta variabilidade pode estar relacionada com a espécie do vegetal, condições climáticas, qualidade da semente ou frutos, sistema de extração e processo de refinamento dos óleos vegetais.

**TABELA 1.** Teores de fitosteróis (mg/100g) em óleos vegetais.

Óleos Vegetais	Campesterol M (DP)*	Estigmasterol M (DP)*	$\beta$ -Sitosterol M (DP)*	Fitosteróis Totais**
Óleo de Soja	89,46 (8,71)	59,60 (6,43)	157,70 (15,44)	306.76
Óleo de Milho	237,64 (25,21)	52,79 (6,12)	512,66 (52,35)	803.09
Óleo de Canola	289,03 (52,37)	8,30 (3,75)	349,15 (59,31)	646.48
Óleo de Girassol	60,44 (7,99)	30,70 (3,62)	202,69 (18,26)	293.83
Azeite	21,27 (21,06)	14,16 (14,24)	142,84 (39,58)	178,27

\*Média e estimativa de desvio padrão de 27 amostras (3 marcas e 3 lotes em triplicata) para os óleos de soja, milho, canola e girassol e 36 amostras (4 marcas e 3 lotes em triplicata) para azeite de oliva.

\*\* Fitosteróis totais = campesterol + estigmasterol +  $\beta$ -sitosterol

De acordo com a Legislação Brasileira - RDC 270 de 22/09 de 2005 - Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gordura Vegetal e Creme Vegetal, a adulteração de azeite de oliva virgem, pela adição de óleos de sementes, pode ser identificada pelo aumento dos teores de campesterol e estigmasterol e redução de  $\beta$ -sitosterol. Os resultados de ácidos graxos livres, índice de refração e índice de peróxidos, obtidos nos óleos vegetais analisados, apresentaram níveis dentro dos limites estabelecidos pela RDC 270.

Os teores de ácidos graxos saturados variaram de 8,7 no óleo de canola a 14,8 g/100g no óleo de milho (Tabela 2). Os maiores teores de ácidos graxos poliinsaturados foram obtidos no óleo de soja (56,5 g/100g), seguido do óleo de girassol (52,1 g/100g). O azeite apresentou maior valor para os ácidos graxos monoinsaturados (66,2 g/100g), seguido do óleo de canola (61,7 g/100g). A presença dos isômeros *trans* nos óleos analisados pode estar relacionada com as temperaturas utilizadas nos processos de refino (Dharma, 2005).

**TABELA 2.** Teores de ácidos graxos (g/100g) saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA), poliinsaturados (PUFA) e isômeros *trans* em óleos vegetais.

Óleos Vegetais	SFA	MUFA	PUFA	<i>trans</i>
Óleo de Soja	14,55	24,26	56,46	0,35
Óleo de Milho	14,84	34,56	45,45	0,97
Óleo de Canola	8,70	61,66	25,31	0,83
Óleo de Girassol	10,66	31,51	52,07	1,82
Azeite	14,03	66,21	15,51	0,39

## **Conclusão**

O método proposto para a determinação de fitosteróis em azeites de oliva, por CG, não apresenta a etapa de cromatografia de camada delgada como no método da AOCS, sendo de fácil execução, rápido, preciso e exato. A quantificação dos fitosteróis acompanhada de outras determinações como, por exemplo, a análise da composição em ácidos graxos é muito importante para auxiliar na detecção de fraude do azeite de oliva.

## **Referências Bibliográficas**

- Belitz HD, Grosh W. Food Chemistry. 2 ed., Springer Verlag. 1999.
- Firestone, D. (Ed.). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 5th ed. Champaign: AOCS. 2004.
- Dharma, R.K. Trans Fats – Chemistry, Occurrence, Functional Need in Foods Potential Solutions, In: Dharma Kodali and Gary R. List, editors. Trans Fats Alternatives. USA: ed. Champaign, Illinois; 2005. p. 1-25.
- Hartman L, Lago RCA. Rapid Preparation of fatty Acid Methyl Esters from Lipids. Lab. Practice. 1973, 22 (8): 475-476.
- Keith, L. K., Crummet, W., Deegan, J. J., Libby, R., Taylor, J. K., Wentler, G. Principles of environmental analysis. Anal. Chem., 52, 2242-2249, 1983.
- Mazalli, M.R., Saldanha, T., Bragagnolo, N. Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. Revista do IAL, 62: 1, 49-53, 2003.
- Rodrigues, M. I., Iemma, A. F., Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos. Casa do Pão Editora, Campinas, 2005.
- Schmarr, H., Gross, H. B., Shibamoto, T. Analysis of polar cholesterol oxidation products: evaluation of a new method involving transesterification, solid phase extraction, and gas chromatography. J. Agric. Food Chem., 44, 512-517, 1996.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPq, pela concessão da bolsa de Iniciação Científica (PIBIC/ITAL), e ao Centro de Química de Alimentos e Nutrição Aplicada do ITAL.