

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**AVALIAÇÃO DOS PRINCIPAIS FITOSTERÓIS EM ÓLEOS
VEGETAIS E AZEITE**

CLÁUDIA APARECIDA SILVA ALMEIDA

Bacharel em Química

Profa. Dra. NEURA BRAGAGNOLO

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre
em Ciência de Alimentos

Campinas/SP

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP**

AL64a Almeida, Claudia Aparecida Silva
Avaliação dos principais fitosteróis em óleos vegetais e
azeite / Claudia Aparecida Silva Almeida. -- Campinas, SP:
[s.n.], 2009.

Orientador: Neura Bragagnolo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Fitosteróis. 2. Óleos vegetais. 3. Azeite. 4.
Validação de método. 5. Colesterol. I. Bragagnolo, Neura.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Titulo em inglês: Evaluation of the main phytosterols in vegetable and olive oils

Palavras-chave em inglês (Keywords): Phytosterols, Vegetable oils, Olive oil,
Method validation, Cholesterol.

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Neura Bragagnolo

Renato Grimaldi

Sueli Regina Baggio

Data de Defesa: 21/08/2009

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Banca Examinadora

Profa. Dra. NEURA BRAGAGNOLO
(Orientadora)

Dr. RENATO GRIMALDI
FEA-UNICAMP

Dra. SUELI REGINA BAGGIO
ITAL

Dedico este trabalho a toda minha família, e, em especial a minha mãe, que sempre me ajudou nas horas mais difíceis, orando, apoiando e incentivando.

Ao meu esposo, Welermont, pelo amor, carinho e apoio.

Ao meu querido e amado filho, Matheus (luz, razão e inspiração da minha vida).

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Neura Bragagnolo pela orientação, oportunidade e pelos ensinamentos profissionais e pessoais.

Aos membros da banca examinadora pelas contribuições e sugestões apresentadas para redação final deste projeto.

Ao Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos (CCQA) do ITAL pela oportunidade concedida.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro ao projeto.

Aos pesquisadores Ana Maria Rauen, Roseli Ferrari, Eduardo Vicente, Marcelo Morgano e Sueli Baggio pela grande colaboração em etapas importantes deste projeto.

Às minhas colegas e amigas de trabalho, Bete Spina, Camila Pascoal, Ercília Henriques, Natália Scalon, Natália Vallin, Rita Vilela, pelo companheirismo e apoio nas análises.

À Adriana Barreto Alves pelo valioso auxílio mostrando sempre disponível durante toda a realização deste projeto.

Às estagiárias, Renata Melatto, Karina Silva e Tamyres Ribeiro, pela grande ajuda nas realizações das análises.

À minha amiga e comadre Márcia (grávida do Gabriel), pela paciência e amizade e ao compadre Denny pela amizade e carinho.

A todos muito obrigada.

Cláudia Almeida

ÍNDICE

	página
Resumo	vii
Summary	ix
1. Introdução	1
2. Revisão Bibliográfica	4
2.1. Fitosteróis	4
2.2. Azeites e óleos vegetais comestíveis	9
2.3. Adulteração de azeite de oliva	13
2.4. Avanço na análise de fitosteróis	18
3. Materiais e Métodos	23
3.1. Materiais	23
3.1.1. Reagentes	23
3.1.2. Amostras	23
3.2. Metodologia	24
3.2.1. Determinação dos teores dos principais fitosteróis	24
3.2.1.1. Planejamento experimental	26
3.2.1.2. Comparação com a metodologia oficial da AOCS	27
3.2.1.2.1. Matéria insaponificável	27
3.2.1.2.2. Separação da fração esterólica da matéria insaponificável	29
3.2.1.2.3. Extração dos esteróis	30
3.2.2. Determinação simultânea de colesterol e principais fitosteróis	32
3.2.3. Índice peróxido	33
3.2.4. Índice de refração	33
3.2.5. Ácidos graxos livres	34
3.2.6. Composição em ácidos graxos	34
3.2.7. Análise estatística	35
4. Resultados e Discussão	36
4.1. Otimização da metodologia para determinação de fitosteróis	36
4.2. Teores de fitosteróis em óleos vegetais e azeite	50
4.3. Teores de colesterol em óleos vegetais e azeite	57
4.4. Parâmetros de qualidade e identidade	60
4.5. Correlação entre os teores de colesterol e ácidos graxos trans usando análise estatística multivariada	72
5. Conclusão	77
6. Referências bibliográficas	78

RESUMO

Foi otimizado e validado um método para determinação dos principais fitosteróis em óleos vegetais, utilizando cromatografia gasosa, eliminando-se a etapa preparativa por cromatografia em camada delgada preconizada no método oficial da AOCS. A etapa de extração dos fitosteróis foi otimizada utilizando um planejamento experimental rotacional completo 2^4 , cujas variáveis estudadas foram: temperatura, tempo de saponificação, número de extrações e peso da amostra. Os resultados dos testes de recuperação, obtidos a partir de dois níveis de adição, variaram de 96 a 105% para o β -sitosterol, de 96 a 97% para o campesterol e de 101 a 103% para o estigmasterol. Os limites de detecção e de quantificação foram, respectivamente, 11,4 e 38,0 mg/100g para o β -sitosterol, 2,3 e 7,65 mg/100g para o campesterol e 1,95 e 6,5 mg/100g para o estigmasterol. A identificação dos picos foi confirmada por espectrometria de massas. O método otimizado foi também validado por comparação com a metodologia oficial da AOCS. Os resultados não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) entre os teores de estigmasterol e β -sitosterol obtidos pelas duas metodologias. Entretanto, foram observadas diferenças significativas ($p<0,05$) entre os resultados de campesterol sendo que, no método da AOCS os resultados foram significativamente menores. O método otimizado e validado no presente trabalho mostrou ser de fácil execução, rápido, preciso e exato. Como os fitosteróis possuem estruturas semelhantes a do colesterol a metodologia desenvolvida foi otimizada para a determinação simultânea de colesterol e dos principais fitosteróis em óleos vegetais a qual apresentou ótima precisão e exatidão, diminuindo assim

os custos e o tempo de análise. A média da porcentagem de recuperação para o colesterol, obtida a partir de três níveis de adição foi de 95,2. A precisão do método foi de $1,6 \pm 0,1$ mg/100g e os limites de detecção e de quantificação foram de 0,3 e 1,0 mg/100g, respectivamente. A metodologia foi aplicada em óleo de girassol, canola, milho, soja e azeite de oliva sendo analisadas 3 marcas de cada óleo e 10 de azeite. De cada marca foram analisados 3 lotes e todos os lotes foram analisados em triplicata totalizando 108 análises de óleo e 90 de azeite de oliva. Além da determinação dos principais fitosteróis e colesterol as amostras foram analisadas quanto aos parâmetros índice de refração, ácidos graxos livres, índice de peróxidos e composição de ácidos graxos. Dos óleos vegetais analisados no presente trabalho, o menor teor de fitosterol total foi obtido no azeite e o maior no óleo de milho, havendo grandes variações entre os lotes analisados. Quanto aos parâmetros índice de refração, ácidos graxos livres e índice de peróxidos todos os óleos vegetais analisados estão de acordo com a RDC 270 de 22/09/2005 Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gordura vegetal e Creme Vegetal (ANVISA) enquanto, das 10 marcas de azeite de oliva analisadas 4 amostras apresentaram teores de β -sitosterol abaixo do limite recomendado pela RDC 270 indicando possível adulteração. Duas marcas também apresentaram teores de ácidos graxos 18:2 ω 6, 22:0 e isômeros *trans* em desacordo com a RDC 270 indicando adulteração.

SUMMARY

A method for phytosterols determination in vegetable oils was optimized and validated using gas chromatography without the thin-layer chromatography preparation step as praised by the AOCS official method. The extraction step for phytosterols was optimized using a design 2^4 , in which the studied variables were: temperature, saponification time, number of extractions and sample weight. The results obtained in the recovering tests, for two levels of fortification, ranged from 96 to 105% for β -sitosterol, from 96 to 97% for campesterol and from 101 to 103% for stigmasterol. The detection and quantification limits were, 11.4 and 38.0 mg/100g for sitosterol, 2.3 and 7.65 mg/100g for campesterol and 1.95 and 6.5 mg/100g for stigmasterol, respectively. The peaks identification was confirmed by mass spectrometry. The optimized method was also validated by comparison with the AOCS. The results showed method no significantly difference ($p>0,05$) between stigmasterol and β -sitosterol contents, determined using both methods. However, significantly differences ($p<0,05$) were observed for campesterol results with AOCS method given significantly lower contents. The optimized and validated method presented in this study showed advantages, being easily executable, fast, precise and accurate. As phytosterols have a chemical structure similar to cholesterol, the developed methodology was optimized for the simultaneous determination of cholesterol and phytosterols in vegetable oils and it presented excellent accuracy, reducing analysis costs and time o. The average recovery for the three levels of cholesterol fortification was studied 95.2%. The precision of the developed method was 1.6 ± 0.1 mg/100g and the detection and quantification

limits were 0.3 and 1.0 mg/100g, respectively. The methodology was applied for three brands sunflower, canola, corn, soybean oils and ten brands olive oil. Three batches from each brand were analyzed in triplicate, giving a total of 192 vegetable oil analysis. Besides the phytosterols and cholesterol determination, refractive index, free fatty acids, peroxide value and fatty acid composition were carried out in the samples. Olive oil presented the lowest value for phytosterols content and the corn oil the highest value, but there was great variability within the batches. Concerning the refractive index, free fatty acids and peroxide value, almost all samples analyzed were considered acceptable according to the brasilian legislation, but one brand of olive oil was not. Additionally, two brands of olive oil presented detectable amounts of the fatty acids 18:2 ω , 22:0 and *trans* isomers in disagreement to the brasilian legislation recommendation, suggesting adulteration.

1. INTRODUÇÃO

Consumidores preocupados com a saúde estão cada vez mais buscando alimentos funcionais em um esforço para controlar sua própria saúde e o bem-estar. Alimentos que contêm fitosteróis são considerados alimentos funcionais devido aos potenciais benefícios para prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, por apresentarem atividade antioxidante e inibirem o desenvolvimento de certos tipos de cânceres, como de cólon e próstata (NORMÉN et al., 2002).

Os fitosteróis tornaram-se importantes ingredientes na nossa dieta desde que Peterson (1951) reportou que a adição de esteróis de soja em dietas ricas em colesterol prevenia o aumento do colesterol plasmático. Desde então, numerosos estudos têm confirmado o efeito hipocolesterolêmico através de experimentos em animais e humanos (JONES et al., 1997; MEGURO et al., 2003). A estrutura dos fitosteróis é semelhante à do colesterol, o que permite que esses compostos competem com o colesterol no momento em que este está sendo absorvido pelo sistema digestivo, dificultando assim a sua absorção.

A Food and Drugs Administration (FDA), após a avaliação de todos os estudos já realizados, autorizou a afirmação, para produtos alimentícios, de que o consumo de fitosteróis pode reduzir o risco de desenvolvimento de doenças cardíacas coronarianas (KRITCHEVSKY e CHEN, 2005).

Os fitosteróis estão naturalmente presentes em vegetais, particularmente em sementes, óleos vegetais comestíveis, cereais, castanhas, legumes e frutas e podem estar presentes na forma livre ou esterificada (NORMÉN et al., 2002).

Embora existam na literatura mais de 250 fitosteróis identificados, os principais encontrados em alimentos são campesterol, β -sitosterol, estigmasterol e β -sitostanol. Os óleos vegetais como o azeite de oliva são ricos em β -sitosterol (PIIRONEN et al., 2000).

Devido às propriedades terapêuticas dos fitosteróis 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 de oliva que, devido ao alto custo, torna-se alvo de freqüente adulteração com outros óleos vegetais.

Existem vários métodos para a determinação de fitosteróis em óleos vegetais, sendo a maior parte baseada em técnicas cromatográficas. O método oficial da AOCS (FIRESTONE, 2004), para quantificação de fitosteróis, é realizado em duas etapas cromatográficas, sendo a primeira preparativa, usando cromatografia em camada delgada de sílica, e a segunda quantitativa, usando cromatografia gasosa com detector por ionização em chama e coluna capilar de 25m x 0,2 - 0,5 mm diâmetro interno, silanizada e revestida com metilpolisiloxano. Este método tem a desvantagem da utilização da cromatografia em camada delgada para a separação dos esteróis dos interferentes, a qual é muito trabalhosa, consome muito tempo e pode conduzir a perdas dos analitos.

Diante do exposto, os objetivos principais deste trabalho foram:

- Otimizar e validar uma metodologia para determinação da composição dos principais fitosteróis sem a etapa da separação dos esteróis por cromatografia

em camada delgada contida no método oficial da AOCS, usando cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-MS);

- Aplicar a metodologia otimizada na determinação do conteúdo dos principais fitosteróis em diferentes óleos vegetais, verificando a variação dos níveis dos esteróis em diferentes lotes;
- Verificar a adulteração em azeite de oliva através da composição dos principais fitosteróis e de parâmetros físico-químicos (índice de peróxido, índice de acidez e/ou ácidos graxos livres, índice de refração e composição em ácidos graxos);
- Correlacionar os teores dos principais fitosteróis com os teores de ácidos graxos *trans* através da análise de componente principal e análise de agrupamento;
- Otimizar uma metodologia para a determinação simultânea de colesterol e fitosteróis, por CG, em óleos vegetais;
- Quantificar simultaneamente os teores de colesterol e dos principais fitosteróis em óleos vegetais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fitosteróis

Esteróis são substâncias presentes e essenciais nas membranas celulares dos animais e dos vegetais. Os esteróis de origem vegetal, chamados de fitosteróis, são considerados compostos fitoquímicos, ou seja, substâncias químicas biologicamente ativas encontradas em plantas. No entanto, o esteroide mais conhecido é o colesterol, encontrado principalmente nos produtos de origem animal.

A denominação de fitosteróis para todos os esteróis de origem vegetal foi proposta em 1897 por H. Thoms (JOHNSSON, 2004). Os fitosteróis mais comuns são os insaturados que correspondem aos esteróis e os saturados aos estanois. Os fitosteróis podem ser convertidos em fitostanois por hidrogenação química (MOREAU et al., 2002).

A estrutura básica dos fitosteróis e a de todos os esteróides, é conhecida como ciclopentanoperidrofenantreno sendo muito semelhante à estrutura do colesterol, diferenciando-se apenas na cadeia lateral (CLAYTON et al., 1998). A maior parte dos fitosteróis possui cadeias longas com 28 ou 29 carbonos com uma ou duas ligações duplas (MOREAU et al., 2002). A estrutura dos fitosteróis possui um grupamento hidroxila no carbono 3 que pode estar esterificado com ácidos graxos saturados ou insaturados ou com ácido hidroxicinâmico ou glicosilado com uma hexose, normalmente a glicose, ou com uma hexose ligada na posição 6 a um ácido graxo. Em óleos vegetais os fitosteróis ocorrem principalmente como esteroide livre ou esterificado com ácidos graxos ou com monossacarídeos

(VERLEYEN, 2002). A forma glicosilada é encontrada mais comumente em cereais. Quando na forma livre, são ligeiramente solúveis no óleo, em torno de 2%, e insolúveis em água. Quando na forma de ésteres de fitosteróis a solubilidade em óleo aumenta em torno de 20 %. A redução do colesterol sanguíneo não é alterada pelo fitosteróis esterificados com ácidos graxos uma vez que no intestino delgado serão hidrolisados pela enzima colesterol esterase em ácidos graxos e esteróis livres (NTANIOS, 2001).

Nos organismos de origens vegetal e animal, os esteróis derivam-se a partir de uma mesma molécula, o acetil-CoA, e a síntese bioquímica é idêntica até a formação do esqualeno linear. Após esta etapa, em células animais ocorre a formação de uma molécula denominada lanosterol que após cerca de 200 reações, como oxidações, perda e migrações dos grupos metila, dá origem ao colesterol; já nas células vegetais, é formado o cicloartenol que após varias reações dá origem aos fitosteróis (PIIRONEN et al., 2000 e BANDEIRA et al., 2008). Desta forma, o colesterol é o principal esterol do reino animal, enquanto o β -sitosterol, o campesterol e o estigmasterol são os principais esteróis do reino vegetal.

Em plantas, mais de 200 diferentes tipos de fitosteróis têm sido reportados sendo os mais abundantes o β -sitosterol (24- α -etilcolesterol), o campesterol (24- α -metilcolesterol) e o estigmasterol (Δ^{22} ,24- α -etilcolesterol). A Figura 1 mostra a estrutura dos fitosteróis mais comumente encontrados em alimentos, comparada a do colesterol.

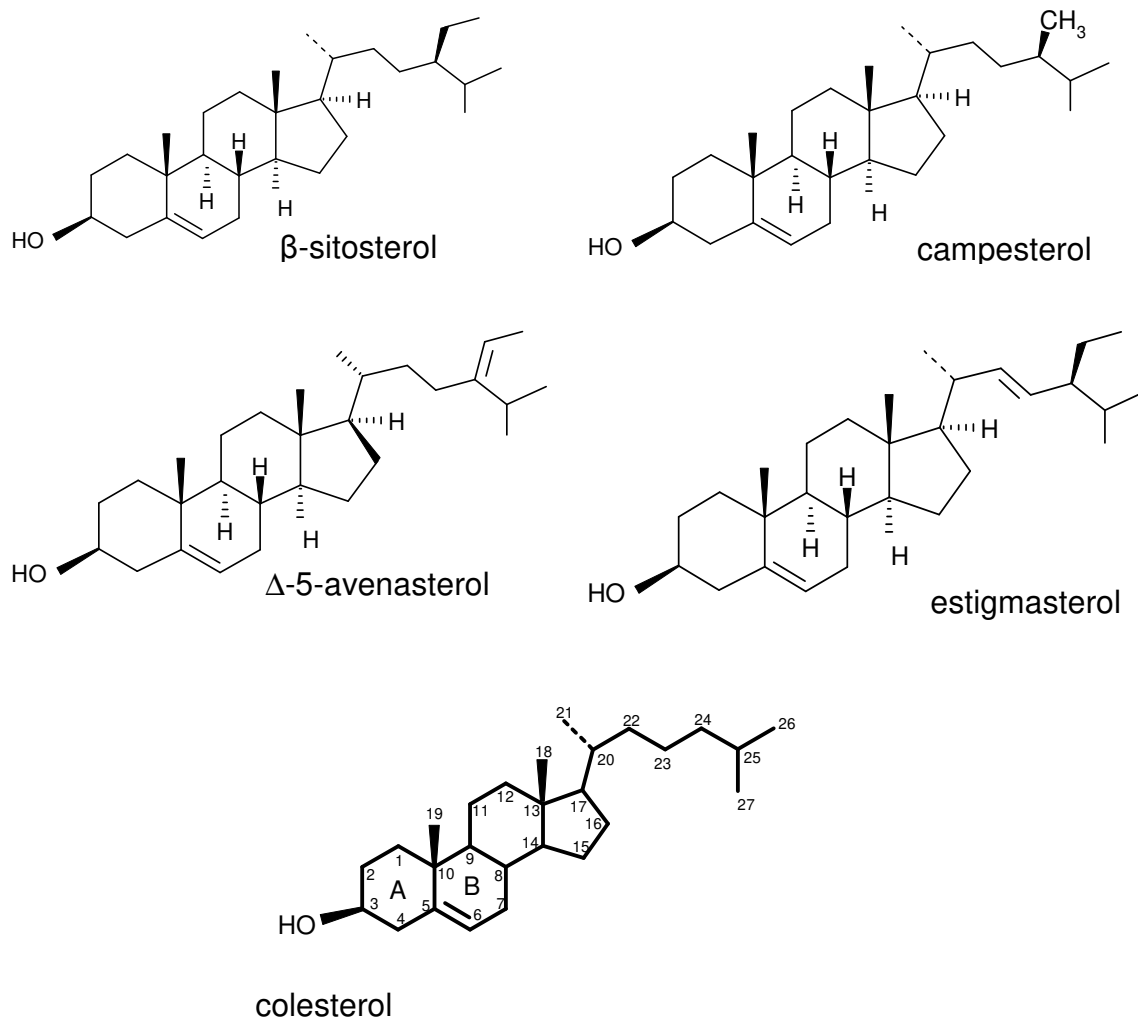


Figura 1. Estrutura química dos principais esteróis.

Os fitosteróis são componentes naturais da dieta humana e estima-se que são consumidos ao nível de 200 a 400 mg/dia na dieta ocidental (JONES et al., 1997).

Para os vegetarianos o consumo de fitosteróis tem sido estimado em aproximadamente duas vezes a quantidade de uma dieta comum (MOREAU et al, 2002).

Os fitosteróis estão naturalmente presentes em vegetais, particularmente em sementes, óleos vegetais comestíveis, cereais, castanhas, legumes e frutas, sendo os óleos vegetais uma das maiores fontes.

A **Tabela 1** mostra o teor de fitosteróis em alguns alimentos como frutas, cereais e óleos vegetais.

Tabela 1- Teor de fitosteróis totais em alimentos

Alimentos	Fitosteróis totais (mg/100g) *
Brócoli congelado	44
Ervilhas verdes congeladas	25
Laranja	24
Maçã	13
Tomate	6
Abobrinha	5
Farelo de trigo	200
Aveia	39
Pão de trigo	29
Óleo de milho	912
Óleo de canola	668
Margarina	522
Óleo de girassol	213
Azeite de oliva	154

Fonte: Ellegard, 2007

* Fitosteróis totais = β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, β -sitostanol e campestanol.

Recentemente, fitosteróis e fitostanóis têm sido adicionados a diversos produtos, que estão comercialmente disponíveis como alimentos funcionais com capacidade de reduzir os níveis de colesterol total plasmático e LDL - colesterol. Os fitosteróis promovem uma redução do colesterol total por inibirem a absorção do colesterol, exógeno, proveniente da dieta como o produzido endogenamente, oferecendo, portanto, benefícios à saúde com diminuição no risco de doenças cardíacas. O mecanismo de redução do colesterol pelos fitosteróis se dá

basicamente por competição. Os fitosteróis competem com o colesterol na entrada das micelas intestinais (PATEL e THOMPSON, 2006). Embora a absorção dos fitosteróis seja menor que a do colesterol, ainda sim, uma parte dos fitosteróis é introduzida nas micelas intestinais acarretando uma diminuição de colesterol. O colesterol que não foi absorvido vai ser expelido nas fezes, desta forma diminuindo o colesterol total sangüíneo (RODRIGUES et al., 2004). O consumo de fitosteróis como parte de uma dieta saudável pode até evitar a necessidade de medicamentos para indivíduos com níveis moderadamente altos de colesterol (NTANIOS, 2001; WEBER et al., 2002).

Produtos enriquecidos com ésteres de fitoestanois foram comercializados pela primeira vez na Finlândia, em meados dos anos 90, seguido pela comercialização de produtos enriquecidos com ésteres tanto de fitosteróis quanto de fitostanois em outros países da Europa (MOREAU et al., 2002).

Alguns fitosteróis podem ter também atividade antioxidante como o Δ -5-avenasterol, o qual ocorre em altas quantidades em cereais (WANG et al., 2002). Estudos em animais demonstram que os fitosteróis inibem o desenvolvimento de certos tipos de cânceres, como por exemplo, câncer de colon (TOIVO et al., 2000).

Os fitosteróis são considerados seguros, pois nenhuma toxicidade foi relatada pelo seu uso em modelos animais e humanos. Além disso, nenhum efeito colateral foi relatado pelo uso dos fitosteróis na dieta (NTANIOS E JONES, 1998).

Os principais fitosteróis encontrados em óleos vegetais comestíveis são: campesterol, β -sitosterol, estigmasterol e Δ -5-avenasterol (**Tabela 2**). O β -

sitosterol é predominante, variando de 115 a 543 mg/100g dependendo do óleo (PIIRONEN e LAMPI, 2004).

Tabela 2. Concentração de esteróis (mg/100g) em óleos vegetais e azeites

Óleo/Azeite	Campesterol	Estigmasterol	β -Sitosterol	Avenasterols	Total*
Amendoim	24 - 38	12 - 22	115 - 169	ND - 13	167 - 229
Canola	164 - 300	ND - 16	358 - 395	14 - 36	639 - 767
Girassol	27 - 55	18 - 32	194 - 257	19 - 56	263 - 376
Milho	123 - 164	46 - 59	454 - 543	10 - 41	686 - 773
Oliva	2 - 5	ND - 3	122 - 130	16 - 60	156 - 193
Oliva (EV)	4,5 - 5	0,9 - 1,3	118 - 133	17 - 22	144 - 162
Soja	34 - 82	37 - 64	124 - 173	4 - 14	203 - 328

Fonte: Piironen e Lampi. (2004) EV= extra virgem

* Total = campesterol + estigmasterol + β -Sitosterol + Avenasterols + sitostanols.

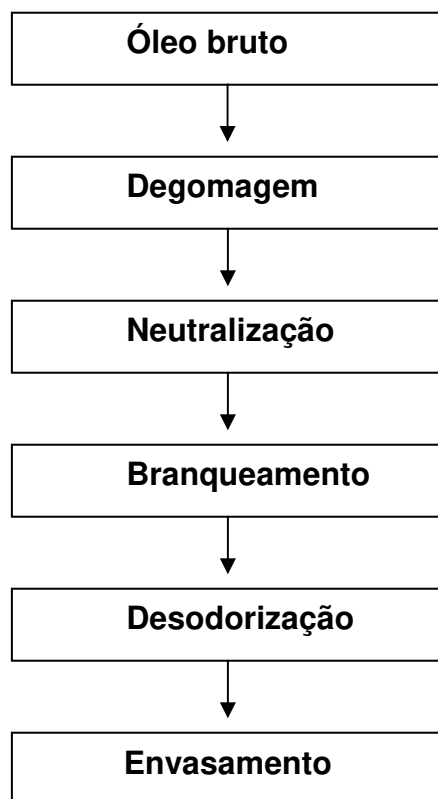
2.2 Azeites e óleos vegetais comestíveis

A diferença entre azeites e óleos vegetais comestíveis está no modo de extração a partir de sementes ou frutos. Os azeites são extraídos dos frutos por prensagem, sem o uso de produtos químicos, como é o caso do azeite de oliva, já os óleos vegetais são extraídos a partir de sementes, por prensagem e solventes, posteriormente refinados. O azeite é o único óleo vegetal que dispensa tratamento de refino para ser consumido (CARDOSO, 2006).

A etapa do refino pode ser definida como conjunto de processos que visam tornar os óleos brutos em óleos comestíveis e melhorar o odor e o sabor pela remoção, no óleo bruto, dos seguintes componentes: substâncias coloidais,

proteínas, fosfatídeos e produtos de sua decomposição; ácidos graxos livres e seus sais, ácidos graxos oxidados, lactonas, acetais e polímeros; substâncias voláteis tais como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres de baixo peso molecular; pigmentos (clorofila, xantofila e carotenóides); substâncias inorgânicas (sais de cálcio e de outros metais, silicatos, fosfatos e outros) e umidade (MORETTO e FETT, 1998).

A operação de refino convencional consiste de quatro etapas: degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização como pode ser observado no Fluxograma 1.



Fluxograma 1- Processo de refino do óleo bruto

A degomagem é o processo que tem por finalidade remover, do óleo bruto fosfatídeos, proteínas e substâncias coloidais e produzir óleos brutos capazes de serem refinados, por via química ou física com a mínima contaminação ambiental. Os motivos que levam à degomagem do óleo bruto são as seguintes: facilitar o armazenamento e o transporte do óleo bruto; produzir Lecitinas como um produto valioso; facilitar o refino alcalino (os fosfatídeos (fosfolipídios) são conhecidos como excelentes emulsificantes, o que iria provocar grandes perdas de óleo, exatamente por formar emulsão em uma etapa que se utiliza grandes quantidades de água); diminuir os problemas de poluição da água ácida depois do desdobramento da borra; eliminar fosfatídeos e outros compostos não desejados de forma eficiente para refinação física. Em geral, a degomagem é feita por adição de 1 a 3% de água ao óleo aquecido a 70 °C, sob agitação por cerca de 30 minutos. O precipitado é removido por centrifugação (MORETTO e FETT, 1998).

A neutralização consiste em fazer reagirem os ácidos graxos responsáveis pela acidez do óleo, com uma solução de soda cáustica (DORSA, 2004). A acidez é um fator que varia com a qualidade da matéria-prima, com o tempo de estocagem, com a presença de gomas, entre outros. A neutralização elimina também fosfolipídios e seus complexos metálicos, pigmentos e esteróis (COCAMAR, 2008).

O branqueamento tem como principal finalidade a remoção de pigmentos indesejáveis. Outras impurezas a serem eliminadas são os sabões, traços de metais pesados, produtos de oxidação e finalmente, fosfatídeos e material insaponificável (DORSA, 2004).

A desodorização é a última etapa do processo de refino de óleo visando à remoção dos sabores e odores indesejáveis. A desodorização baseia-se na destilação, em corrente de vapor, no qual as substâncias voláteis se separam do óleo, não volátil. O processo se dá pela combinação de alta temperatura com baixa pressão absoluta, o que favorece a aceleração da destilação, protege o óleo contra oxidação, impede a hidrólise do óleo pela ação de vapor e diminui a quantidade necessária de vapor (DORSA, 2004; COCAMAR, 2008).

Geralmente, a quantidade dos fitosteróis diminui durante os vários estágios do processo de refino do óleo vegetal. A alta temperatura de refino dos óleos vegetais afeta a quantidade de fitosterol presente no óleo, e também a sua composição, para a grande maioria dos processos de refino convencionais (COSTA, 2007). O processo completo de refino resulta na perda de esteróis entre 10-70 %. (VERLEYEN et al., 2002). Por esta razão, é que os subprodutos do refino, tal como sabão de ácido graxo proveniente da lavagem do óleo vegetal, bem como os ácidos graxos livres provenientes do destilado do óleo vegetal, são ricas fontes de fitosterol, sendo que os mesmos podem ser isolados destes destilados. A perda de ésteres de fitosteróis é muito menor que a dos fitosteróis livres, além do que os vegetais também contêm fitosteróis na forma glicosilada, os quais são removidos na etapa da degomagem (COSTA, 2007).

A qualidade e a digestibilidade dos azeites e óleos vegetais comestíveis são determinadas pela qualidade e quantidade dos ácidos graxos insaturados que os compõem, sendo fundamental a presença do ácido linoléico, já que o organismo não pode sintetizá-lo (ABOISSA, 2007).

As porcentagens de ácidos graxos saturados e insaturados contidas nos óleos vegetais são relativamente variáveis de acordo com as condições climáticas, os solos, as variedades ou os híbridos das quais foram obtidos. Os azeites e óleos vegetais mais conhecidos e consumidos atualmente são os de girassol, milho, soja, oliva, arroz, uva, algodão, amendoim e, ultimamente, os de cártamos e canola (ABOISSA, 2007; DORSA, 2004).

2.3 Adulteração de azeite de oliva

Entre os óleos vegetais comestíveis comercializados mundialmente, o azeite de oliva é um dos mais importantes e antigos do mundo, sendo largamente usado nos países que margeiam o mediterrâneo. Algumas propriedades nutricionais do azeite de oliva fazem com que os habitantes do mediterrâneo tenham menor incidência de doenças coronarianas que os povos de outras regiões que consomem mais gorduras saturadas (PEIXOTO et al., 1998).

A Classificação e seleção dos frutos, a mistura da pasta de oliva e a separação do óleo por prensagem ou centrifugação (HUI, 1996) são as três técnicas principais envolvidas na elaboração do azeite de oliva. A União Européia estabelece, para o azeite de oliva, uma classificação de dois tipos, de acordo com a prensagem e a extração, e ainda nove categorias, dependendo do método de extração e do grau de acidez (CARDOSO, 2006). Uma das classificações é a de azeite de oliva virgem de alta qualidade que é obtido através de prensagem das azeitonas em perfeitas condições (DOBARGANES, 2000). Neste caso, o óleo proveniente dos frutos frescos não sofre nenhum tipo de tratamento que possa modificar suas propriedades químicas. O azeite de oliva também pode ser refinado

ou refinado e misturado ao azeite virgem para melhorar sua cor e comercialização. Outras classificações são originárias em função da extração do resíduo sólido obtido após a prensagem (HUI, 1996).

De acordo com a legislação brasileira RDC 270 de 22/09/2005, Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gordura vegetal e Creme Vegetal (ANVISA) os diversos tipos de azeite de oliva devem ser classificados quanto ao processo de obtenção e quanto ao teor de acidez.

Quanto ao processo de obtenção os azeites são classificados em quatro tipos:

- 1) Azeite virgem de oliva: azeite obtido do fruto da oliveira unicamente por processos mecânicos e outros meios físicos, particularmente condições térmicas que não levem à deterioração do azeite, e que não tenha sido submetido a outro tratamento que não lavagem, decantação, centrifugação e filtração. Excluem-se os óleos obtidos por meio de solvente ou re-esterificação e misturas com óleos de outra natureza.
- 2) Azeite de oliva refinado: azeite de oliva obtido pelo refino do azeite virgem de oliva, com acidez final, expressa em ácido oléico, não superior a 0,5 %.
- 3) Azeite de oliva: azeite de oliva constituído pela mistura de azeite de oliva refinado com azeite virgem de oliva extra virgem, fino ou comum. Não poderá ser misturado com azeite virgem de oliva lampante (azeite virgem de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, superior a 3,3 %). O produto deverá ter acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 1,5 %.
- 4) Óleo de bagaço e/ou caroço de oliva refinado: óleo refinado do bagaço e ou caroço de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 0,5 %.

Em relação ao teor de acidez os azeites são classificados também em quatro tipos:

- 1) Azeite virgem de oliva extra: azeite virgem de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 1 %.
- 2) Azeite virgem de oliva fino: azeite virgem de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 2 %.
- 3) Azeite virgem de oliva comum: azeite virgem de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, não superior a 3,3 %. O azeite virgem comum não pode ser pré embalado quando destinado diretamente para a venda ao consumidor final. O produto pode ser misturado com azeite refinado de oliva para constituir o tipo comercial designado somente com azeite de oliva.
- 4) Azeite virgem de oliva lampante: azeite virgem de oliva com acidez, expressa em ácido oléico, superior a 3,3 %. O azeite virgem de oliva lampante não pode ser pré embalado quando destinado diretamente para o consumidor final. É, obrigatoriamente, destinado ao refino, não podendo ser usado para constituir mistura com azeite refinado. O produto pode ser embalado quando destinado para usos que não sejam diretamente os do gênero alimentício, nem diretamente de ingrediente de gênero alimentício (RDC 270, 2005).

O azeite de oliva tem adquirido popularidade em todo o mundo devido ao seu aroma e sabor delicado e agradável, além de possuir alto valor nutritivo e ser benéfico para a saúde. Contudo, o azeite de oliva possui um alto custo de produção e em consequência disto, não apenas a qualidade tem que ser garantida, mas também deve existir rigorosa fiscalização para evitar a adulteração com outros óleos e gorduras de baixo preço.

O azeite de oliva constitui-se em uma mistura de triacilgliceróis que são ésteres de glicerol com ácido graxo. Em sua composição estão presentes ainda pequenos teores de ácidos graxos livres, esteróis e outros componentes minoritários, tais como, esqualeno, ceras e antioxidantes fenólicos (GUNSTONE et al., 1986). O azeite de oliva também é fonte de vitaminas, principalmente vitamina E.

Todo óleo vegetal tem uma composição específica de esteróis variando de um óleo para outro os quais apresentam importante papel na verificação da qualidade e pureza do azeite de oliva.

O β -sitosterol é o principal esteroide encontrado no azeite de oliva, variando de 118 a 133 mg/100g no azeite de oliva comum e 122 a 130 mg/100g no azeite de oliva extra virgem, seguido do Δ -5-avenasterol e do campesterol, variando de 6,7 a 15,2 mg/100g e de 2,0 a 5,0 mg/100g, respectivamente. O estigmasterol é encontrado em menores teores, variando de 0,9 mg/100g no azeite de oliva extra virgem a 3,0 mg/100g no azeite de oliva comum (**Tabela 2**). Além destes, traços de colesterol e Δ -7-estigmasterol são encontrados.

Os tipos de adulteração incluem adição de outros óleos vegetais e/ou gorduras animais, óleos vegetais parcialmente hidrogenados, óleos vegetais desesterolizados e óleos reesterificados. A detecção da adulteração é um problema difícil devido à complexidade da composição dos diferentes azeites de oliva (PEIXOTO et al., 1998), sendo que várias determinações são recomendadas para a verificação da pureza do azeite de oliva.

Os principais parâmetros considerados na legislação brasileira (RDC 270 de 22/09 de 2005) para azeite de oliva são os seguintes: composição de fitosteróis, ácidos graxos livres, índices de iodo, refração, peróxido e composição dos ácidos graxos, absorbância no ultravioleta (270 e 232 nm).

A maioria dos trabalhos na área de adulteração de óleos comestíveis são baseados na quantificação de ácidos graxos, triacilglicerídeos, esteróis, tocoferóis e hidrocarbonetos. Os índices físico-químicos clássicos e a composição de ácidos graxos detectam apenas as fraudes mais grosseiras. A determinação da absorção no espectro a 270 nm na fração insaponificável dos azeites são empregados para verificar a presença de óleos refinados no azeite de oliva virgem; azeites de oliva que sofreram aquecimento irão apresentar um máximo de absorção a 270 nm devido à presença de acetonas insaturadas e trienos conjugados provenientes da oxidação do óleo.

Estes compostos são formados a partir de ácidos graxos insaturados no processo de refino dos óleos vegetais, na etapa da clarificação, onde os fenômenos de superfície, oxidação e desidratação são favorecidos. A formação de trienos conjugados é devido à desidratação de epóxidos, resultantes do processo de oxidação dos óleos, pela ação da terra diatomácea (MITCHEL e KRAYBILL, 1942; O'CONNOR et al., 1949). No entanto, outros produtos de oxidação podem ser formados no azeite os quais absorvem ao redor de 270 nm e portanto, o método para detecção de óleos refinados baseados na absorção de 270 nm não é específico, embora, faixas de valores para a leitura a 270 nm foram estabelecidas para cada categoria de azeite. Lanzón, Cert e Albi (1989) desenvolveram um método baseado na detecção de estigma-3,5-dieno, substância formada a partir

da desidratação do β -sitosterol durante o tratamento térmico e clarificação pelas terras diatomáceas durante o refino, para detectar pequenas quantidades de azeite de oliva refinado em azeite de oliva virgem. Os óleos refinados podem também ser detectados nos óleos virgens pelo conteúdo de ácidos graxos *trans*.

O óleo de bagaço de oliva é detectado no azeite de oliva através da determinação do conteúdo de ceras contendo 40 a 46 átomos de carbono e do teor de eritrodiol e uvaol, na fração insaponificável do óleo. Os óleos extraídos com solventes contêm quantidades maiores de ceras e de eritrodiol e uvaol que óleos extraídos a frio (APARICIO, 2003 e BOSKOU, 1996).

A presença de quantidades menores que 5% de óleos de semente que contenham grande quantidade de ácido linoléico como soja, milho e girassol no azeite de oliva pode ser detectada pela determinação da diferença entre o valor real de triacilglicerídeos com um número equivalente de carbonos igual a 42 (ECN 42) obtido experimentalmente por CLAE e o valor teórico (ECN 42) calculado a partir da composição de ácidos graxos por GC. (APARICIO, 2003 e COI, 2001).

2.4. Avanço na análise de fitosteróis

Como mencionado, os fitosteróis são encontrados nos alimentos na forma livre, esterificados com ácidos graxos ou com monossacarídeos. Além disso, os alimentos têm sido enriquecidos com esteróis, fitostanois, fitosteróis na forma livre ou esterificada. Desta forma, o procedimento ideal de preparo da amostra para a determinação de fitosteróis deve incluir a análise de todos. No entanto, em muitos

casos, a determinação de fitosteróis é baseada na análise de fitosteróis na forma livre ao invés da forma esterificada (LARGADA, 2006).

A determinação de fitosteróis em plantas é baseada em técnicas cromatográficas, usualmente a cromatografia gasosa (CG) com detector por ionização em chama e espectrometria de massas para a confirmação da identidade do pico, embora a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) possa também ser utilizada. Entretanto, a cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas com ionização de impacto de elétrons ou ionização química que permite a melhor resolução, identificação e quantificação dos fitosteróis na forma de éster silil. Tipicamente, a análise dos fitosteróis inclui:

- 1) extração dos lipídios;
- 2) saponificação ou hidrólise ácida para liberação dos fitosteróis;
- 3) extração da matéria insaponificável;
- 4) separação ou purificação dos fitosteróis por cromatografia em camada delgada (CCD) ou extração por fase sólida (SPE);
- 5) formação dos fitosteróis derivatizados;
- 6) análise por CG capilar.

A extração dos fitosteróis depende da natureza da matriz, do seu estado físico, sólido ou líquido, e também da forma (livre, esterificado ou glicosilado) na qual os fitosteróis se encontram no alimento. Os fitosteróis dos tecidos vegetais e sementes oleaginosas podem ser extraídos por solventes como clorofórmio-metanol, clorofórmio-metanol-água, hexano, diclorometano ou acetona (LAGARDA et al., 2006). O método da SPE usando cartuchos de alumina neutra é utilizado na extração de fitosteróis livres e esterificados de óleos e gorduras (PHILLIPS et al.,

2002). Os lipídios de vegetais podem ser extraídos também por extração com fluído supercrítico com CO₂, seguida de saponificação (SYNDER et al., 1999; KING et al., 1997) ou fracionamento por fluído supercrítico juntamente com etapa adicional de limpeza usando diferentes técnicas cromatográficas.

Saponificação direta da amostra é aplicada na determinação de fitosteróis em massas (KOVACS, 1990) e em amostras contendo multicomponentes (JEKEL et al., 1998). Entretanto, a ligação acetila entre o esterol e o carboidrato não pode ser hidrolisada em condições alcalinas e conseqüentemente, os métodos que utilizam a saponificação direta não quantificam os fitosteróis na forma glicosídica. A etapa da saponificação é trabalhosa na rotina de laboratório e a hidrólise ácida não é aplicada para o Δ^7 -fitosteróis tais como Δ^7 -avenasterol e Δ^7 -estigmasterol uma vez que estes fitosteróis se decompõem ou isomerizam rapidamente após a mesma (BREINHOLDER et al., 2002). Nos óleos vegetais refinados, os fitosteróis ocorrem na forma livre e na forma esterificada desde que os fitosteróis glicosilados, se originalmente presentes, são removidos durante o processo de refino (KOCHHAR, 1983; TOIVO et al., 2001). Como os ésteres de fitosteróis são sensíveis ao procedimento de saponificação com reagentes fortemente básicos, estes compostos, juntamente com os fitosteróis livres, são comumente isolados dos extratos lipídicos ou dos óleos vegetais por cromatografia em coluna (CC), CC e CCD, CCD, lipólise, CCD e CLAE, CLAE ou SPE (ABIDI, 2001).

Após a saponificação, a matéria insaponificável contendo entre outros os fitosteróis e os fitostanóis, será extraída com solventes orgânicos como éter dietílico, ou heptano seguido da evaporação do solvente. Entretanto, este procedimento consome tempo e pode haver a formação de uma emulsão

dificultando a extração da matéria insaponificável. O uso de pequenas colunas de óxido de alumínio pode ser utilizado em substituição a extração evitando a formação de emulsão e diminuindo o tempo de análise. A solução de sabão em etanol é aplicada na coluna sendo que os sais de ácidos graxos livres serão fortemente ligados à superfície do óxido de alumínio formando sais de alumínio altamente insolúveis. Os componentes insaponificáveis serão eluídos da coluna com éter dietílico ou heptano (AITZETMÜLLER et al., 1998).

O método oficial da AOCS (FIRESTONE, 2004) para quantificar fitosteróis em óleos vegetais é realizado em duas etapas cromatográficas: a primeira etapa é preparativa usando CCD de sílica e a segunda é quantitativa usando CG com detector de ionização em chama e coluna capilar de 25 m x 0,2 - 0,5 mm diâmetro interno, silanizada e revestida com metilpolisiloxano (OV 17). No entanto, a utilização da CCD ou de outro método para a separação dos esteróis dos interferentes é muito trabalhosa, consome muito tempo e pode conduzir a perdas dos analitos. Por isto, alguns pesquisadores têm substituído esta etapa por SPE utilizando SPE com fase reversa (C18) para separar os fitosteróis e com fase normal para isolar trimetilsilil derivatizados da fração insaponificável da amostra de óleo vegetal (TOIVO et al., 1998). Cartuchos de SPE contendo alumina neutra foram utilizados para separar os fitosteróis livres de esterificados e com sílica para separar fitosteróis livres de glicosilados (LAGARDA et al., 2006).

Com o propósito de melhorar a separação dos compostos e a estabilidade térmica, os fitosteróis são comumente analisados como seus trimetilsilil (TMS) éster e acetato (ABIDI, 2001). Os derivados do TMS éster são muito mais estáveis para a análise CG-MS do que os acetatos e em vista do procedimento

simplificado e do tempo de reação a maioria dos pesquisadores tem utilizado a derivatização com TMS. A grande maioria dos trabalhos utiliza colunas capilares de 25 a 30 m com fase estacionária apolar (100% de polisiloxano) para a análise de fitosteróis (ABIDI, 2001; LAGARDA et al., 2006).

Embora a maioria dos trabalhos encontrados na literatura para quantificar os fitosteróis utiliza a cromatografia gasosa, recentemente a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido usada de modo crescente (RAMON, 2000; MOREAU et al., 2002) tanto para análise qualitativa como quantitativa (MOREAU et al., 2002), uma vez que a mesma apresenta algumas vantagens como, por exemplo, as análises serem realizadas a temperaturas relativamente baixas, evitando possível oxidação dos fitosteróis e também a eliminação da etapa da derivatização deixando o método mais rápido e preciso. Colunas de fase normal e reversa são utilizadas para a separação dos fitosteróis por CLAE e entre estas, as C18 são as preferidas. Como fase móvel, solventes orgânicos tais como metanol e acetonitrila ou suas soluções aquosas são as mais utilizadas. A detecção dos fitosteróis pode ser realizada por UV (200-210 nm), arranjo de diodos, índice de refração, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas. Recentemente, ionização química na pressão atmosférica (APCI) com CLAE e detector de espectrometria de massas (CLAE-APCI-MS) foi utilizado na identificação de fitosteróis em óleos vegetais (CARERI et al., 2001).

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Reagentes

- Reagentes grau analítico: hexano 98,5%, álcool etílico 99,3%, hidróxido de potássio, isoctano, clorofórmio, iodato de potássio, amido solúvel, carbonato de sódio e ácido clorídrico concentrado.
- Reagente grau cromatográfico: álcool iso-propílico 99,8%.
- Padrões: dihidrocolesterol, estigmasterol, campesterol, β -sitosterol e colesterol (Sigma-Aldrich), mistura de 37 ácidos graxos (Supelco 37 component FAME Mix).

3.1.2. Amostras

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 de oliva). Para cada um destes óleos foram analisadas três marcas diferentes, com exceção do azeite, que foram dez marcas. Para cada marca foram analisados três lotes com diferentes datas de validade. Cada lote foi composto por três unidades e analisados em triplicata. As amostras foram adquiridas nos supermercados de Campinas, São Paulo.

3.2. Metodologia

3.2.1. Determinação dos teores de fitosteróis

A otimização da metodologia analítica, para a extração dos fitosteróis em óleos vegetais, foi baseada no método de Mazalli et al. (2003). A Figura 2 apresenta um fluxograma simplificado do método da extração dos fitosteróis, indicando as variáveis estudadas no planejamento experimental.

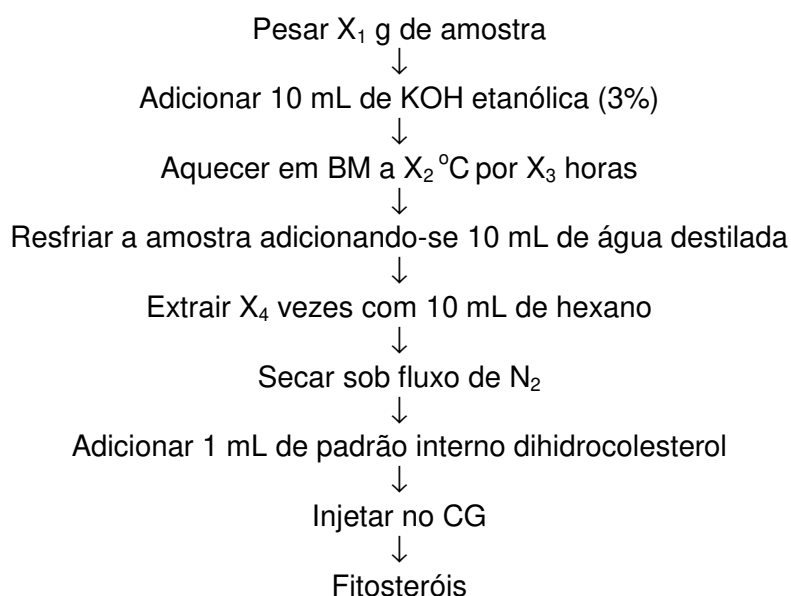


Figura 2. Fluxograma para a determinação de fitosteróis em azeite de oliva por cromatografia gasosa.

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso (HP, modelo 6890), equipado com amostrador automático; injetor em modo split, razão 50:1; coluna capilar HP-5MS (30m, 0,25mm d.i., 0,25µm de filme); detector por ionização em 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 em uma escala de 10°C/min, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos; gás de arraste hélio, vazão de 1 mL/min.; detector de ionização em chama: gás “make-up”, nitrogênio a 30 mL/min., hidrogênio 30 mL/min. e ar sintético 300 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, por co-cromatografia e a quantificação por padronização interna, utilizando como padrão interno dihidrocolesterol (Sigma-Aldrich).

A confirmação dos picos foi realizada por espectrometria de massas usando um cromatógrafo a gás modelo HP 6890 acoplado a um MS HP 5973. A energia de impacto de elétrons foi de 70 eV. As condições cromatográficas foram: injetor split, razão 50:1; coluna capilar HP-5MS (30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm de filme); temperatura da coluna programada, temperatura inicial 160°C/0,1min., elevando-se para 300 °C numa escala de 5 °C/min., permanecendo nesta temperatura por 10 minutos; gás de arraste hélio numa vazão de 1,5 mL/min.; injetor: temperatura inicial 160°C/0,01min., elevando-se para 300°C numa escala de 500°C/min., permanecendo nesta temperatura por 1 minuto. Fonte: 230°C e Quadrupolo 150 °C.

Para a otimização da metodologia foram realizados testes de linearidade, recuperação, repetitividade, limites de detecção e de quantificação e comparação da metodologia validada com a metodologia oficial (método Ch 6-91) da AOCS (FIRESTONE, 2004). A linearidade da curva padrão foi obtida na faixa de concentração entre 4 a 100 µg/mL construída com 5 pontos. A recuperação foi

determinada com a fortificação da amostra em dois níveis (66 e 100 mg/100g para sitosterol, 5 e 20 mg/100g para o estigmasterol, 7 e 25 mg/100g para o campesterol), sendo realizadas oito repetições para cada nível de adição. A repetitividade e a precisão intermediária foram verificadas através dos coeficientes de variação entre 5 repetições. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados de acordo com Keith et al. (1983).

3.2.1.1. Planejamento experimental

A metodologia para a extração dos fitosteróis foi otimizada utilizando um planejamento experimental rotacional completo 2^4 , conforme metodologia descrita por Rodrigues e lemma (2005). As variáveis estudadas foram: temperatura, tempo de saponificação, número de extrações e peso da amostra. Os níveis utilizados no planejamento estão apresentados na **Tabela 3**. Os dados foram analisados com o uso do software Statistica versão 5.5 (STATSOFT, 2000), a fim de se obter um modelo polinomial quadrático conforme a equação:

$$Y = B_0 + B_1X_1 + B_2X_2 + B_3X_3 + B_4X_4 + B_{11}X_1^2 + B_{22}X_2^2 + B_{33}X_3^2 + B_{44}X_4^2 + B_{12}X_1X_2 + B_{13}X_1X_3 + B_{14}X_1X_4 + B_{23}X_2X_3 + B_{24}X_2X_4 + B_{34}X_3X_4.$$

Tabela 3. Variáveis e níveis estudados no planejamento experimental

Variáveis	-2	-1	0	+1	+2
X ₁ : tempo de saponificação (h)	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0
X ₂ : temperatura (°C)	30	40	50	60	70
X ₃ : número de extrações	1	2	3	4	5
X ₄ : peso (g)	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7

3.2.1.2. Comparação com a metodologia oficial da AOCS

A metodologia desenvolvida e otimizada para a determinação dos teores de fitosteróis em óleos vegetais foi comparada com a metodologia oficial da AOCS (FIRESTONE, 2004), baseada na metodologia oficial do Diário Oficial da Comunidade Européia (L 248, publicado em 05 de setembro de 1991), que apresenta as seguintes etapas: extração da matéria insaponificável, separação da matéria esterólica utilizando cromatografia em camada delgada de sílica, extração dos esteróis e quantificação por CG.

3.2.1.2.1. Matéria insaponificável

Para a extração da matéria insaponificável foi utilizada uma alíquota de 5 g de óleo vegetal. Em seguida, foram adicionados 30 mL de álcool etílico a 95%, 5 mL de solução de KOH a 50% e 0,5 mL (para azeite de oliva) e 1,5 mL (para os demais óleos vegetais) de padrão de dihidrocolesterol a 0,2% em isopropanol e aquecimento em refluxo por uma hora, contando o tempo a partir do início da condensação.

Após a saponificação da amostra, foram adicionados 40 mL de água destilada e 40 mL de álcool etílico 95%. O conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação e o balão foi lavado com 50 mL de éter de petróleo grau cromatográfico, o qual foi recolhido no funil e agitado vigorosamente. Após a separação das fases, a fração de éter foi recolhida em outro funil. Repetiu-se a extração mais 3 vezes. A fase etérea foi filtrada através de um funil de vidro com papel de filtro comum contendo sulfato de sódio anidro para um balão de fundo

chato de 250 mL previamente tarado. O solvente foi evaporado em rotaevaporador até 5 mL e em seguida, foi realizada a secagem total em fluxo de nitrogênio.

O balão foi seco em estufa a 80°C por 30 minutos, e após o resfriamento em dessecador, foi realizada a pesagem final, para determinação da matéria insaponificável obtida (Figura 3).

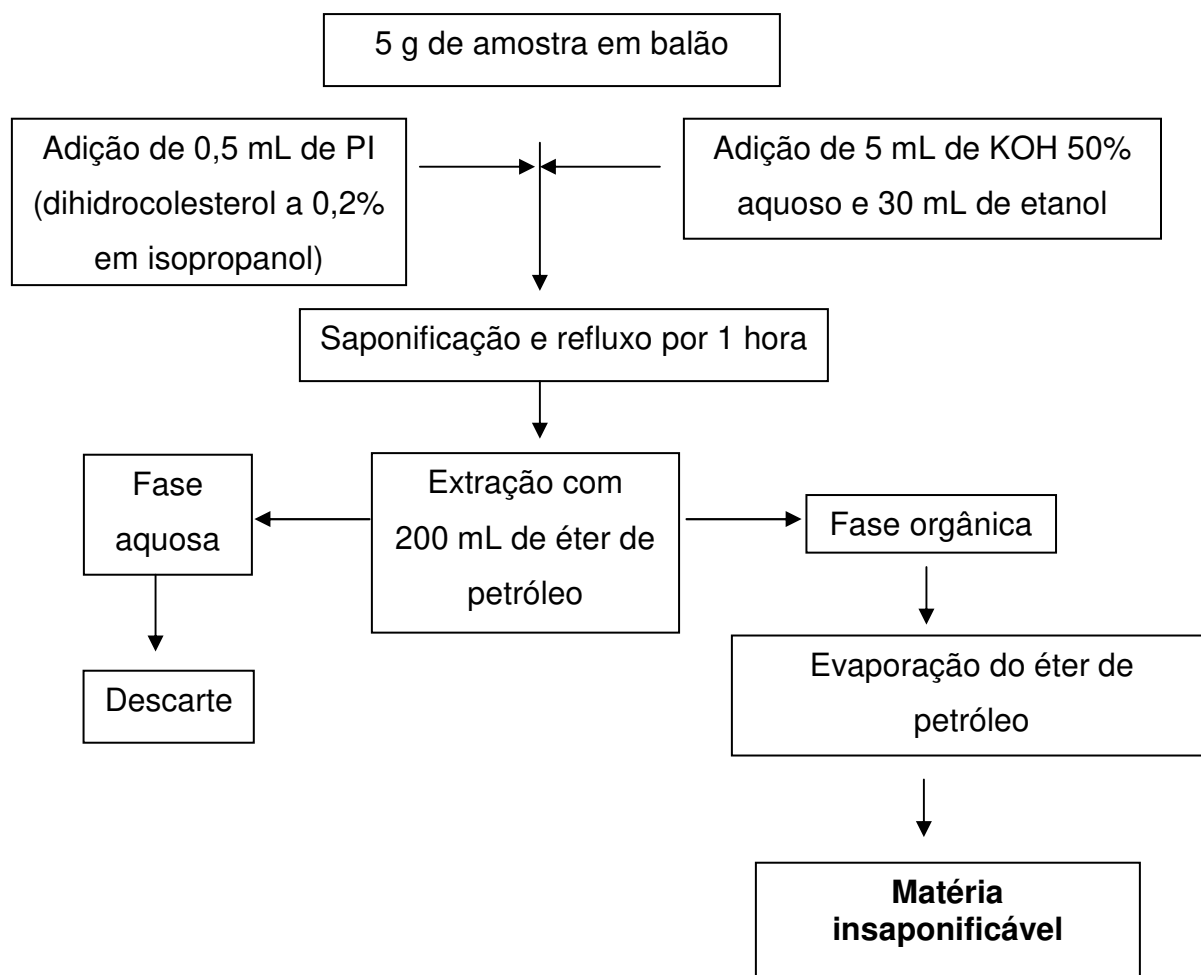


Figura 3. Fluxograma da obtenção da matéria insaponificável em óleos e azeite de oliva.

3.2.1.2.2. Separação da fração esterólica da matéria insaponificável

A matéria insaponificável foi adicionada de 2 a 3 mL de hexano 85% grau cromatográfico e aplicado em área demarcada na cromatoplaca (ativada previamente em estufa a 105°C por 30 minutos), utilizando uma pipeta de Pasteur. Uma solução padrão de esterol (colesterol a 2,5% em isopropanol) foi aplicada nas laterais demarcadas da cromatoplaca (Figura 4). Após a secagem a cromatoplaca foi colocada em cuba cromatográfica para a eluição dos esteróis.

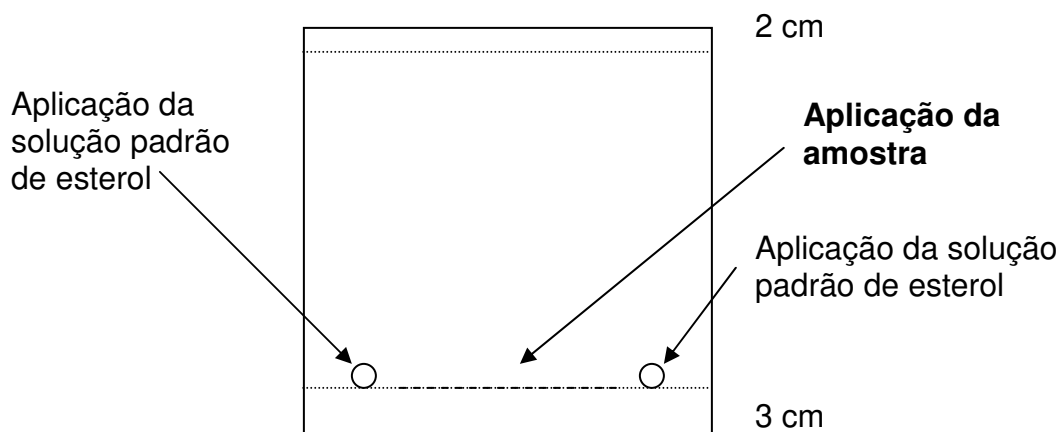


Figura 4. Demarcação e aplicação da amostra na cromatoplaca

A cuba cromatográfica foi preparada com hexano/éter etílico grau cromatográfico na proporção de 65:35 (v/v), deixando-se saturar por 30 minutos antes da colocação das placas para a eluição.

O tempo de eluição total da placa (até a altura demarcada) foi de aproximadamente 40 minutos. Após este tempo, a placa foi retirada da cuba,

colocada na capela por aproximadamente 10 minutos para a secagem do solvente.

A revelação da placa foi realizada através da pulverização de solução etanólica de 2,7-diclorofluoresceína a 0,2%.

A visualização da banda dos esteróis foi realizada sob luz ultravioleta sendo a área das bandas demarcadas utilizando como referência a posição do padrão de esterol, o colesterol.

Posteriormente, a área demarcada foi raspada com o auxílio de uma espátula e recolhida em tubo de ensaio com tampa.

3.2.1.2.3. Extração dos esteróis

Após o recolhimento de toda a sílica com a fração de esteróis em tubo de ensaio, foram adicionados (ao tubo) 10 mL de clorofórmio grau cromatográfico e levado ao banho de água em ebulição por aproximadamente 3 minutos. Em seguida foi agitado em vórtex por 30 segundos e, após a sedimentação, a fase sobrenadante foi filtrada em funil de vidro com papel de filtro e recolhida em balão de fundo chato de 250 mL. O resíduo de sílica foi lavado três vezes com éter etílico e filtrado. A mistura dos solventes foi evaporada sob fluxo de gás nitrogênio. Os esteróis contidos no balão foram dissolvidos com 1 mL de hexano grau cromatográfico e transferidos para um vial para análise de cromatografia em fase gasosa. Um fluxograma das etapas da separação da fração esterólica da matéria insaponificável, isolamento e recuperação da fração esterólica encontra-se descrito na Figura 5.

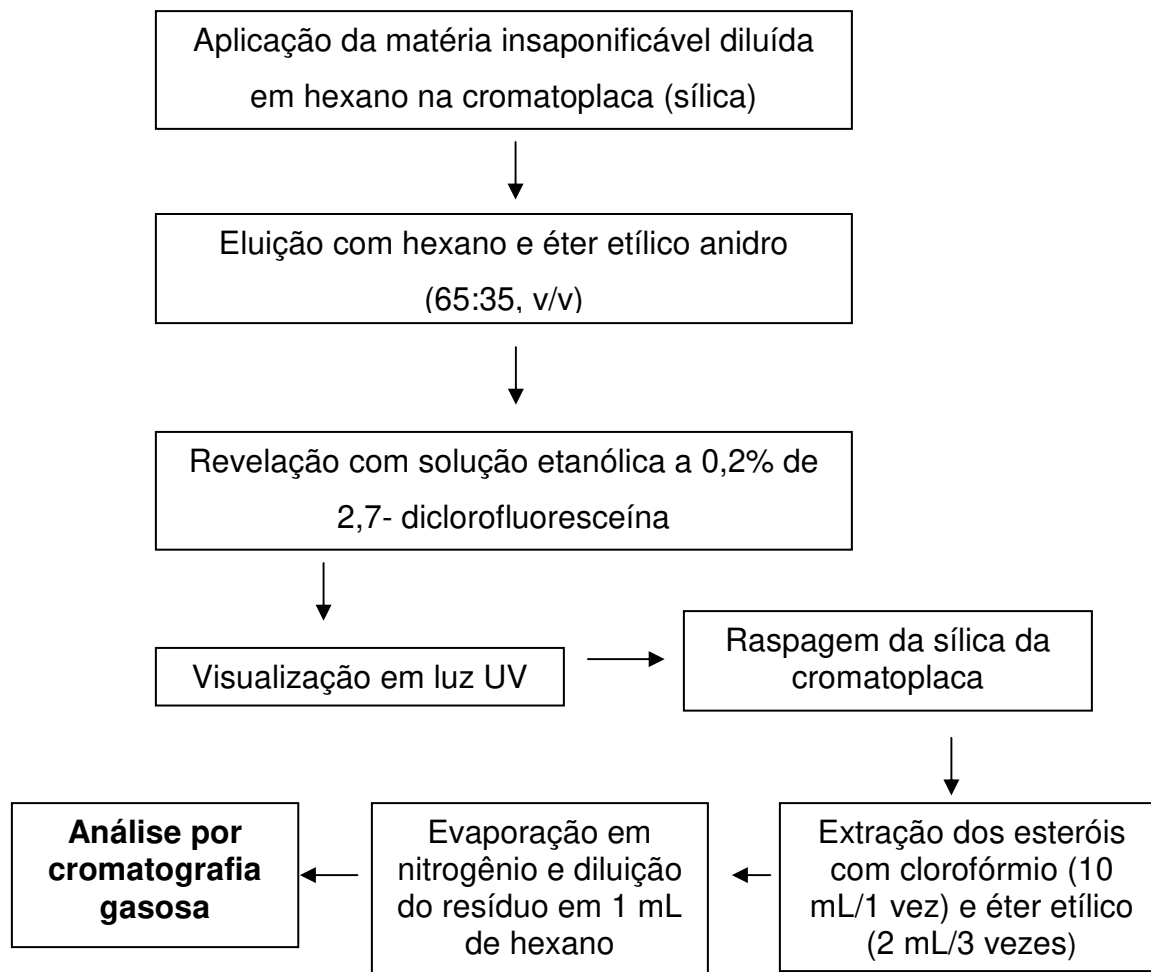


Figura 5. Fluxograma da separação da fração esterólica da matéria insaponificável, isolamento e recuperação da fração esterólica em óleos e azeite de oliva

As condições cromatográficas utilizadas foram as descritas no item 3.2.1.

Foram realizados os ensaios de recuperação com a finalidade de se verificar possíveis perdas de analitos durante a realização do método, já que o mesmo apresenta várias etapas. Foram adicionados padrões de β -sitosterol e stigmasterol em amostra de azeite de oliva, com adição de dois níveis de

concentrações diferentes (64 e 96 mg/100g para o sitosterol; 6 e 38 mg/100g para o estigmasterol), os quais foram realizados com 5 repetições.

3.2.2 Determinação simultânea de colesterol e dos principais fitosteróis

Considerando que a estrutura básica dos fitosteróis é a mesma para todos os esteróides, conhecida como ciclopentanoperidrofenantreno, foi validada uma metodologia analítica para a quantificação simultânea de colesterol e dos principais fitosteróis.

Os parâmetros de controle de qualidade avaliados foram recuperação, repetitividade, reprodutibilidade e limites de detecção e quantificação. A exatidão ou recuperação do método para o colesterol foi realizada utilizando-se amostra de óleo de milho, com adição de três níveis (6 mg/100g, 12 mg/100g e 30 mg/100g) de concentração de padrão de colesterol. Foram realizadas 5 repetições para os níveis I e II e 8 repetições para o nível III. A precisão foi avaliada em dois parâmetros: repetitividade (duas análises no mesmo dia) e precisão intermediária (duas análises em dias diferentes).

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados de acordo com Keith et al. (1983), onde o limite de detecção é igual a três vezes o desvio padrão de oito repetições e o limite de quantificação é igual a 10 vezes o desvio padrão determinado para as repetições.

Para a determinação simultânea de colesterol e dos principais fitosteróis em óleos vegetais, por CG utilizando detector por ionização em chama, foram testadas algumas condições cromatográficas a partir do método otimizado e validado para fitosteróis. Estas modificações foram realizadas a fim de se obter

uma melhor separação para a determinação simultânea destes compostos, como também para separar melhor os padrões internos utilizados, tanto para a determinação do colesterol quanto para os principais fitosteróis.

Foi utilizado um cromatógrafo gasoso, marca HP, modelo 6890, equipado com amostrador automático, injetor modo split (razão 50:1) coluna capilar de fase estacionária (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm de filme) e detector por ionização em chama (FID).

A identificação dos picos do colesterol e dos principais fitosteróis foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos padrões com os tempos de retenção das amostras e por co-cromatografia.

3.2.3. Índice de peróxido

As amostras foram analisadas em duplicata de acordo com o método oficial (Cd 8b-90) da AOCS (FIRESTONE, 2004).

Este método determina, em miliequivalentes de peróxido por quilograma de amostra, todas as substâncias presentes na amostra que oxidam iodeto de potássio, nas condições do teste. Estas substâncias são geralmente consideradas como peróxidos ou outros produtos similares da oxidação de gorduras.

3.2.4 Índice de refração

As amostras foram analisadas em duplicata de acordo com o método oficial (Cc 7-25) da AOCS (FIRESTONE, 2004).

O índice de refração de uma substância corresponde à relação da velocidade da luz no vácuo e a velocidade da luz na amostra analisada, sob temperatura

controlada. O índice de refração em óleos é característico para cada tipo de amostra e está relacionado com grau de saturação da substância e é afetado por outros fatores como o teor de ácidos graxos livres, oxidação e tratamento térmico.

3.2.5 Ácidos graxos livres

As amostras foram analisadas em duplicata de acordo com o método oficial (Ca 5a-40) da AOCS (Firestone, 2004).

Este método determina os ácidos graxos livres presentes na amostra. Baseia-se na dissolução da amostra em álcool etílico neutralizado e quente, seguido de titulação com solução de hidróxido de sódio padronizada, na presença de fenolftaleína como indicador.

3.2.6 Composição em ácidos graxos

As amostras foram esterificadas de acordo com o método de Hartman e Lago (1973), usando solução de cloreto de amônia e ácido sulfúrico em metanol como reagente de esterificação.

A cromatografia gasosa, para a análise da composição em ácidos graxos, foi realizada em cromatógrafo gasoso VARIAN, modelo 3900, equipado com amostrador automático; injetor em modo split, razão 75:1; coluna capilar CP-SIL 88, 100m de comprimento x 0,25mm de diâmetro interno e filme de 0,20 μm .; detector por ionização em chama e uma workstation com software Star. Condições cromatográficas: temperatura da coluna programada, temperatura inicial 120°C/5min, elevando-se para 235°C numa escala de 5°C/min, permanecendo

nesta temperatura por 15 minutos; gás de arraste, hidrogênio numa vazão de 1 mL/min; Detector de ionização em chama: gás “make-up”, nitrogênio a 30 mL/min; hidrogênio a 30 mL/min.; ar sintético 300 mL/min., temperatura do injetor, 270°C; e temperatura do detector, 310°C.

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras e padrões e co-cromatografia de padrões e amostras. Foram utilizados no total 37 padrões de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados (SulpecoTM 37 FAME Mix 47885-U, U.S. A) para verificar a identidade, precisão e exatidão do método.

A quantificação foi realizada por normalização de área e os resultados foram expressos em g/100g de amostra calculados segundo Mc Cance and Widdowson's (2002).

3.2.7 Análise estatística

Com o objetivo de verificar as diferenças entre os teores de fitosteróis, composição em ácidos graxos e características físico-químicas entre as diferentes amostras de óleos vegetais, os resultados foram submetidos à análise de variância (Anova) utilizando o programa Statistica versão 5.5 (STATSOFT, Inc., 1984-2000).

A correlação dos teores dos principais fitosteróis com os teores de ácidos graxos *trans* foi realizada através da análise de componente principal e análise de agrupamento (PIROUETTE, 2001).

4. Resultados e Discussão

4.1. Otimização da metodologia para determinação de fitosteróis

Para a extração dos fitosteróis em óleos vegetais, as condições otimizadas que apresentaram melhores resultados quanto às variáveis: temperatura, tempo de saponificação, número de extrações e peso da amostra, foram as seguintes: 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 ($R^2 = 0,87\%$). As condições otimizadas foram estabelecidas utilizando a metodologia de superfície de resposta (Figura 6).

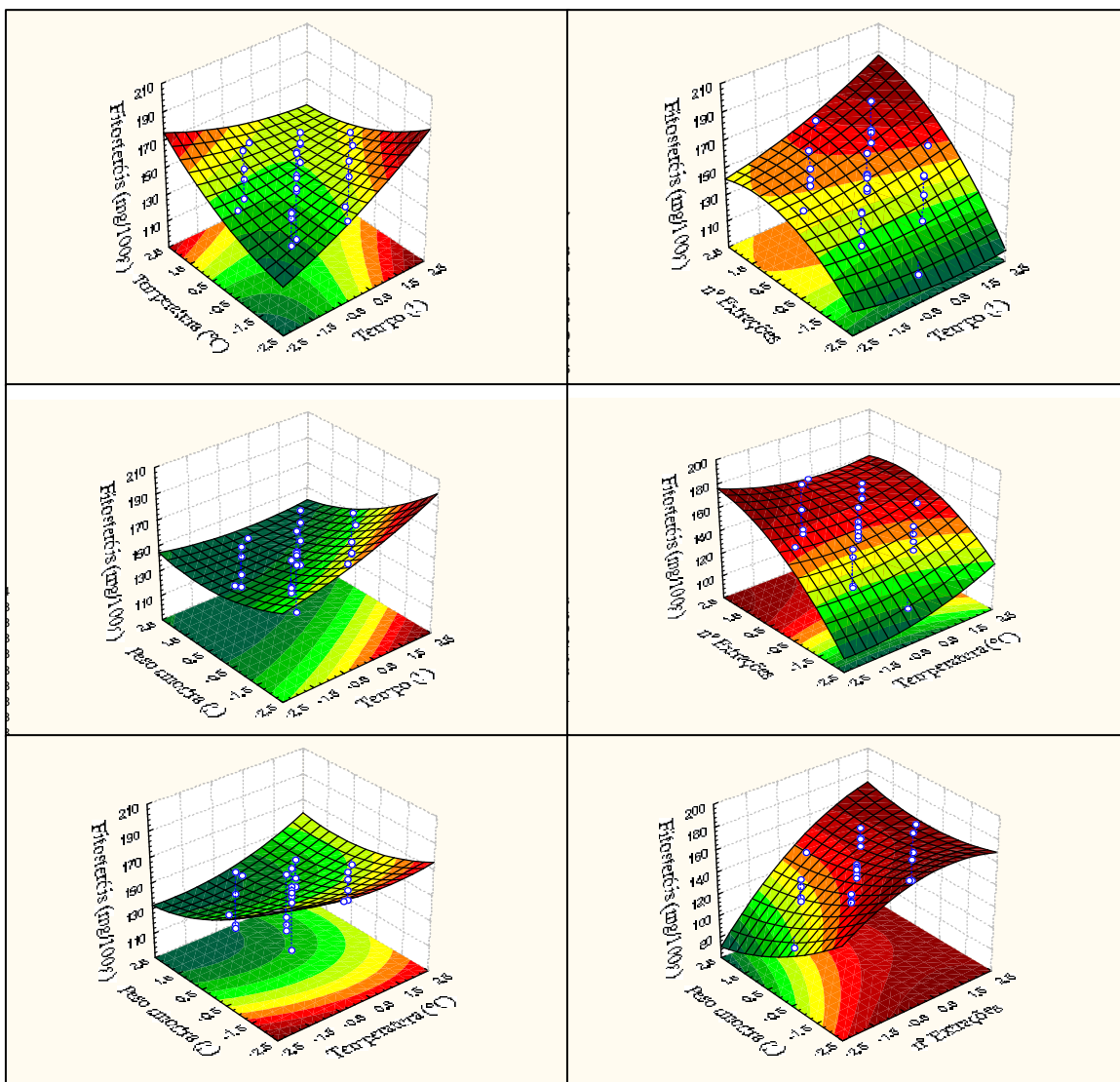


Figura 6. Superfícies de resposta para o planejamento central rotacional completo 2^4 .

A determinação dos fitosteróis, por CG, utilizando as condições cromatográficas otimizadas permitiu a detecção e quantificação dos fitosteróis: campesterol, estigmasterol e β -sitosterol. Os cromatogramas obtidos apresentaram boa separação e resolução dos componentes, permitindo facilidade na identificação dos compostos mediante a injeção prévia de soluções padrão. Cromatogramas característicos podem ser observados nas Figuras 7 a 9.

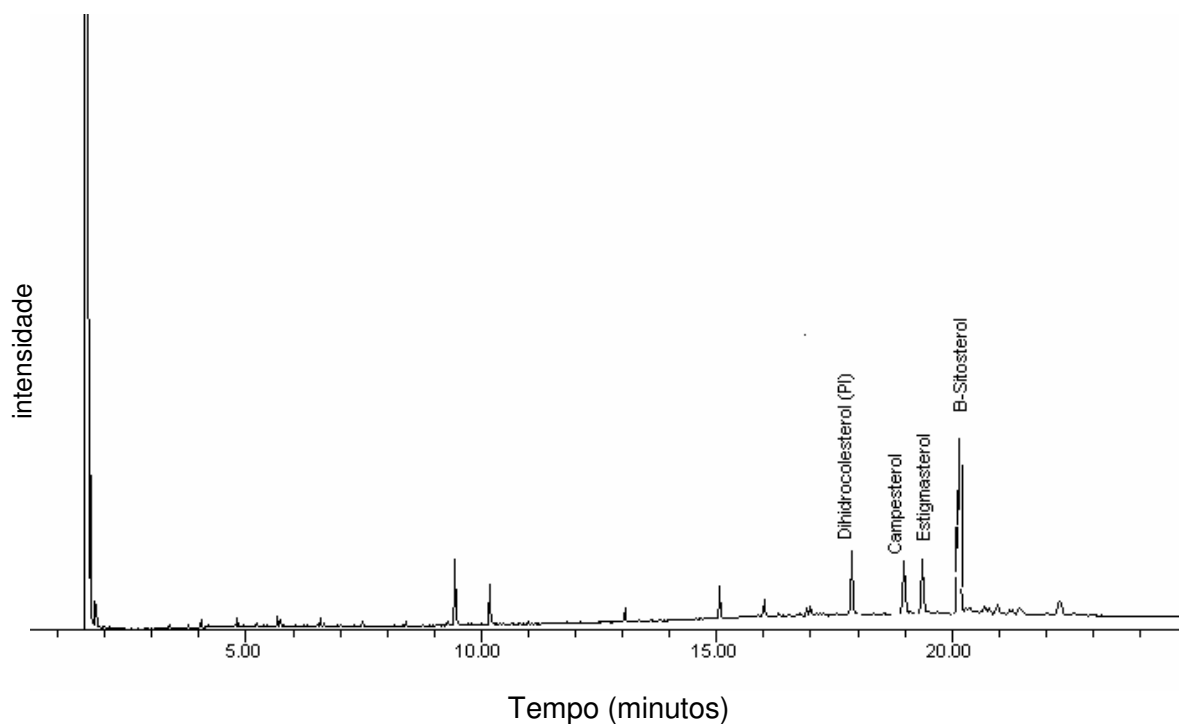


Figura 7. Cromatograma característico dos padrões de fitosteróis (campesterol $t_r=18.98$, estigmasterol $t_r= 19.41$ e β -sitosterol $t_r= 20.14$) e dihidrocolesterol $t_r= 17.87$ (padrão interno) obtido por CG-FID. Coluna capilar de fase estacionária (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μ m de filme). t_r = tempo de retenção.

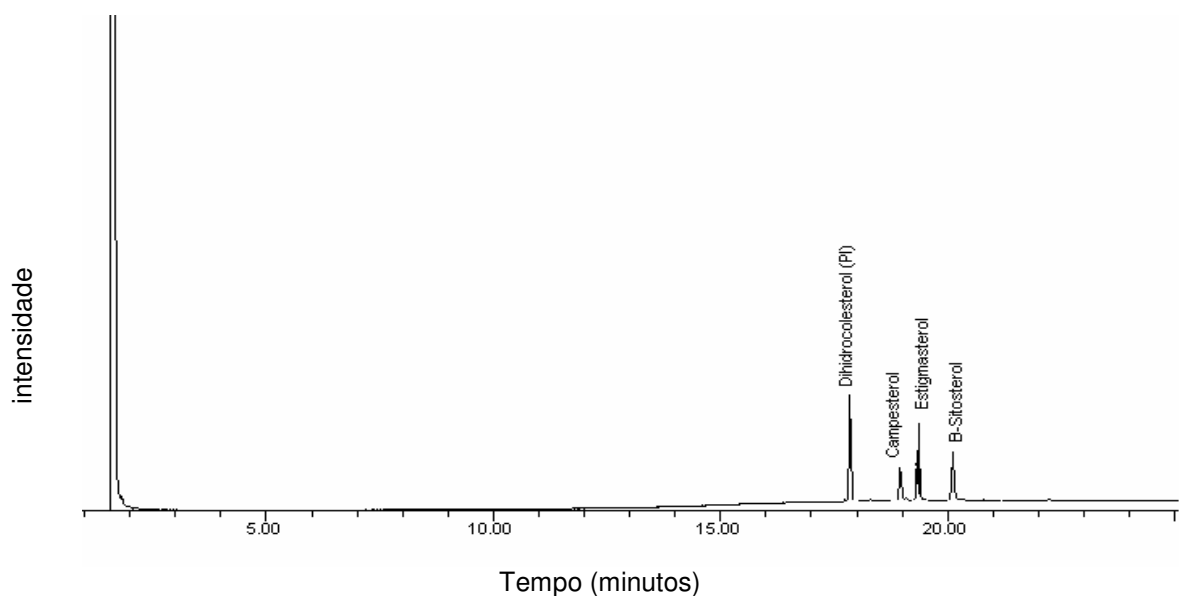


Figura 8. Cromatograma característico dos principais fitosteróis (campesterol $t_r=18.98$, estigmasterol $t_r= 19.41$ e β -sitosterol $t_r= 20.14$) e dihidrocolesterol $t_r= 17.87$ (padrão interno) em amostra de óleo de soja obtido por CG-FID. Coluna capilar de fase estacionária (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μ m de filme). t_r = tempo de retenção.

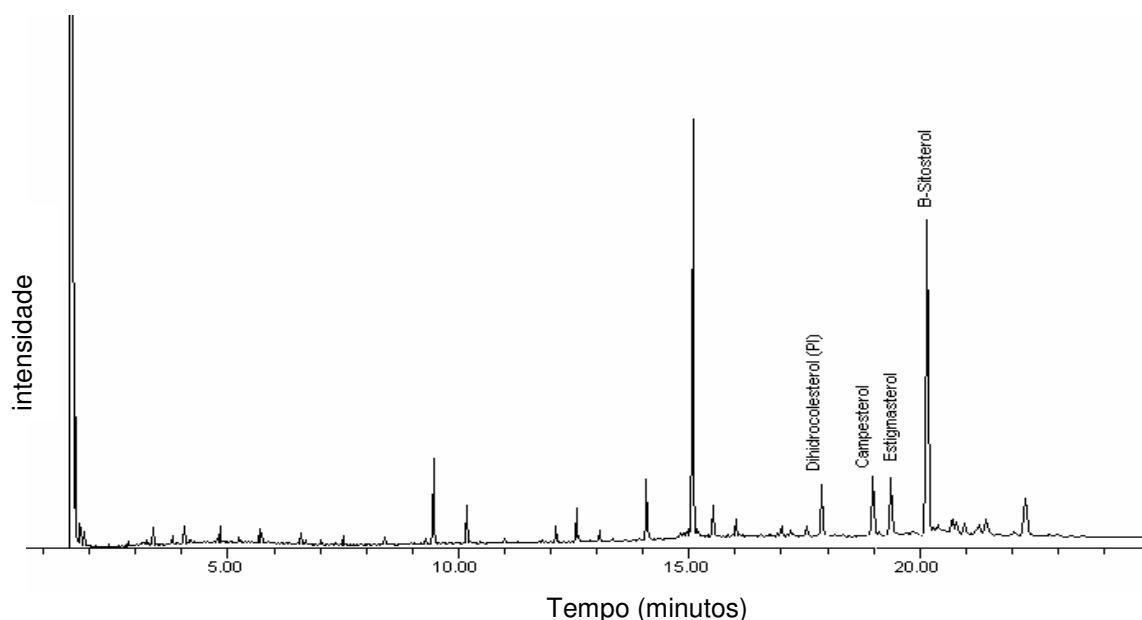


Figura 9. Cromatograma característico dos principais fitosteróis (campesterol $t_r=18.98$, estigmasterol $t_r=19.41$ e β -sitosterol $t_r=20.14$) e dihidrocolesterol $t_r=17.87$ (padrão interno) em amostra de azeite por CG-FID. Coluna capilar de fase estacionária (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μ m de filme). t_r = tempo de retenção.

As curvas de calibração dos fitosteróis foram lineares na faixa de concentração entre 4 a 100 μ g/mL com coeficientes de correlação acima de 0,9996 (**Tabela 4**). A repetitividade e a precisão intermediária (**Tabela 5**) foram adequadas com coeficientes de variação menores que 1%. Os resultados dos testes de recuperação, obtidos a partir de dois níveis de adição estão apresentados na **Tabela 6**. 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, 11,4 e 38,0 mg/100g de amostra para o β -sitosterol, 2,3 e 7,65 mg/100g de amostra para o campesterol e 1,95 e 6,5 mg/100g de amostra para o estigmasterol.

Tabela 4. Equações das curvas de calibração e coeficientes de correlação (r^2) para colesterol e os principais fitosteróis.

Composto	Equação	r^2
Campesterol	$y = 0,0174x - 0,0088$	0,9998
Colesterol	$y = 0,0141x - 0,0180$	0,9996
Estigmasterol	$y = 0,0198x - 0,0213$	0,9996
β -Sitosterol	$y = 0,0199x - 0,0229$	0,9996

Tabela 5. Repetitividade e Precisão intermediária dos teores dos principais fitosteróis (mg/100g) em azeite de oliva

		β -Sitosterol	Campesterol	Estigmasterol
Repetitividade	Média ¹	141,70	16,66	13,26
	DP ²	0,78	0,61	0,72
Precisão intermediária	Média ¹	142,98	11,70	10,16
	DP ²	2,6	0,4	0,1

¹n=5, ²DP = desvio padrão

Tabela 6. Taxas de recuperação dos fitosteróis

Composto	Nível 1	Nível 2
Campesterol	96 %	97 %
Estigmasterol	101 %	103 %
β -sitosterol	96 %	105 %

A identificação dos picos foi confirmada por espectrometria de massas. Os cromatogramas em modo SIM (Figuras 10 a 16) mostram claramente que apenas no óleo de milho foi confirmada a presença de colesterol enquanto nos demais óleos embora tenham sido encontrados picos com tempo de retenção próximo ao

do colesterol, estes não foram confirmadas pelos espectros de massas, demonstrando a necessidade da confirmação.

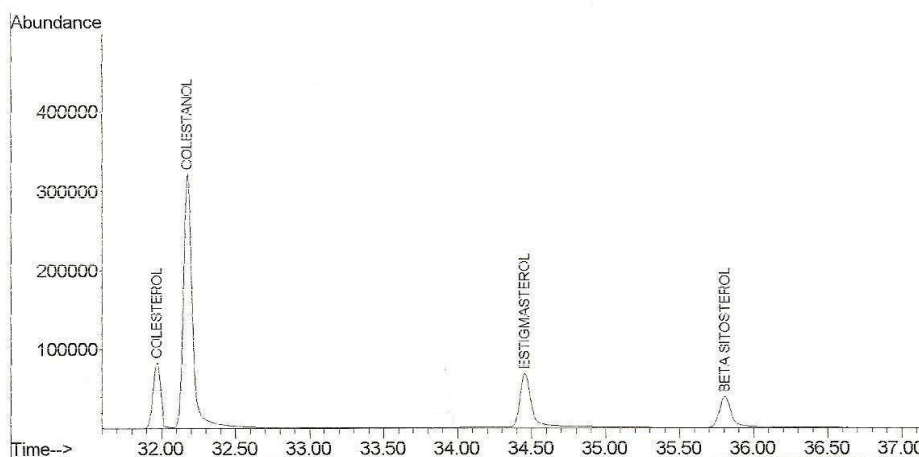


Figura 10. Cromatograma característico dos padrões colesterol, padrão interno colestanol (dihidrocolesterol) e fitosteróis (estigmasterol, β -sitosterol) obtido por CG-MS em modo SIM. Coluna capilar de fase estacionária (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μ m de filme).

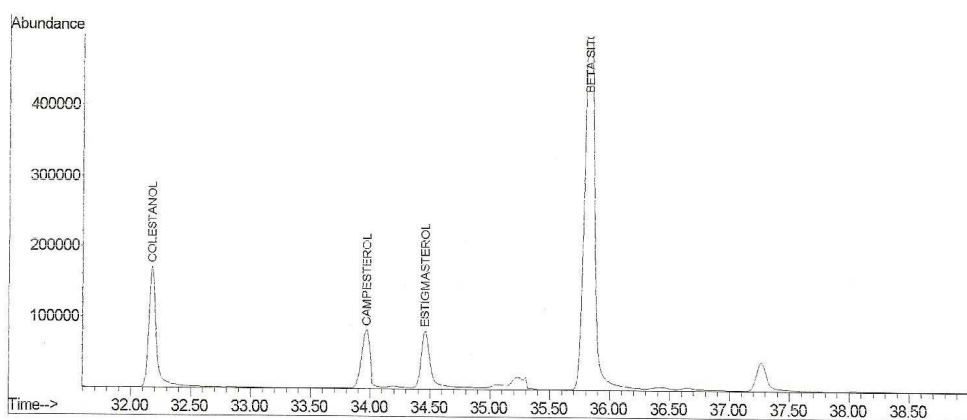


Figura 11. Cromatograma característico dos principais fitosteróis (campesterol, estigmasterol, β -sitosterol) e padrão interno colestanol (dihidrocolesterol) obtido por CG-MS em modo SIM. Coluna capilar de fase estacionária (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μ m de filme).

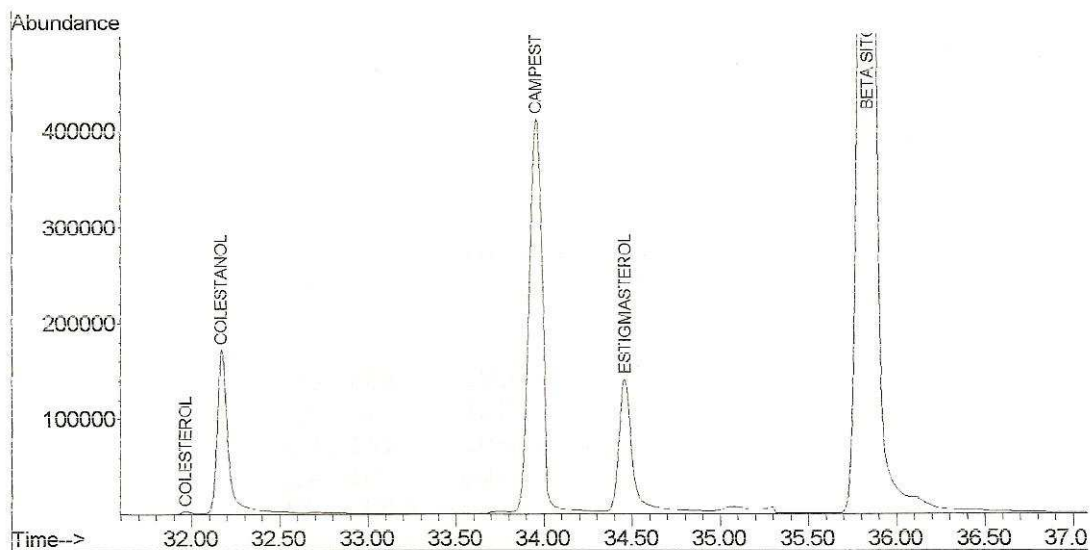


Figura 12. Cromatograma de colesterol, padrão interno colestanol (dihidrocolesterol) e fitosteróis (campesterol, estigmasterol, β -sitosterol) em óleo de milho obtido por CG-MS em modo SIM. Coluna capilar de fase estacionária (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μ m de filme).

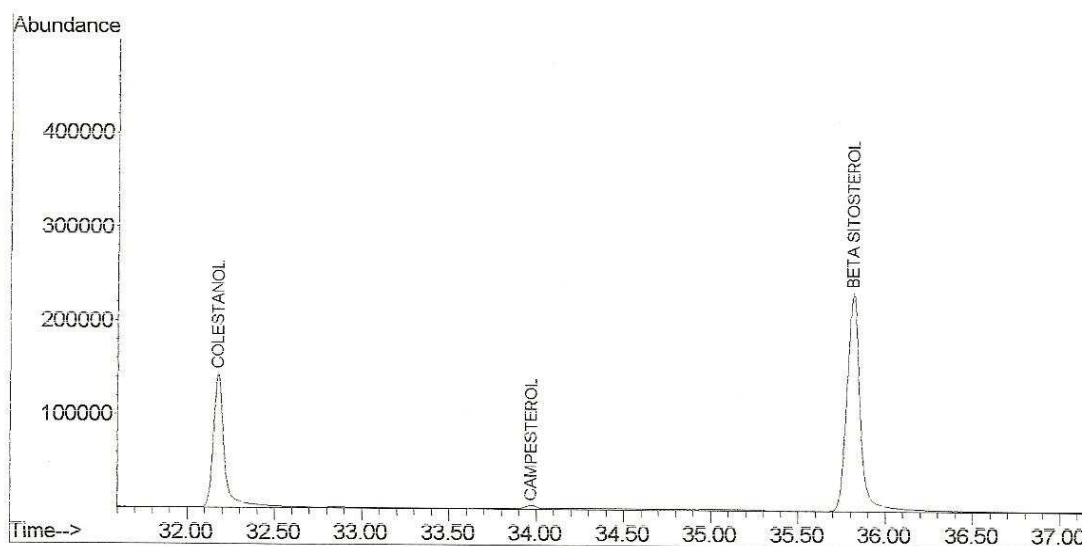


Figura 13. Cromatograma de padrão interno colestanol (dihidrocolesterol) e fitosteróis (campesterol e β -sitosterol) em azeite de oliva obtido por CG-MS em modo SIM. Coluna capilar de fase estacionária (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μ m de filme).

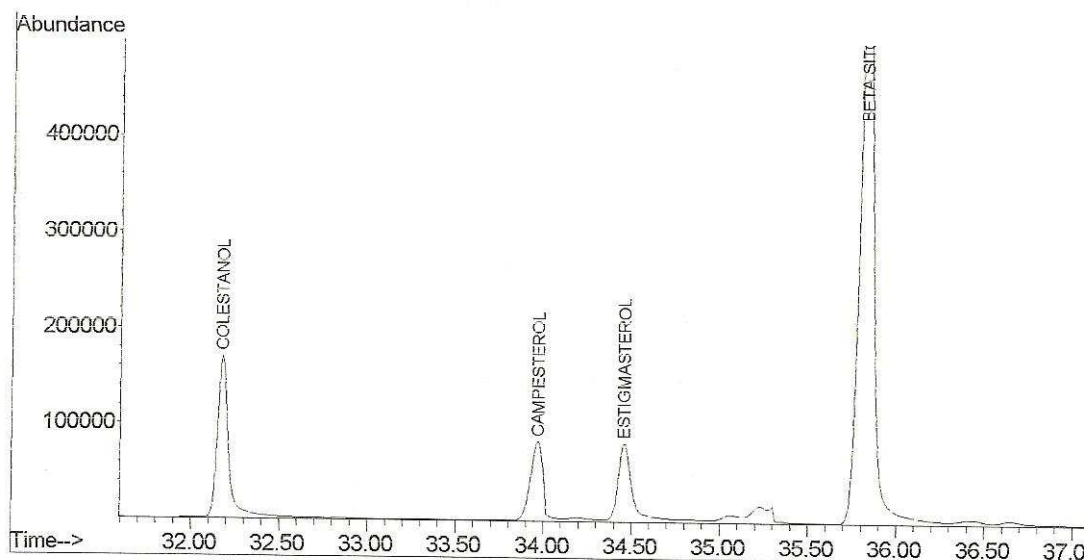


Figura 14. Cromatograma de padrão interno colestanol (dihidrocolesterol) e fitosteróis (campesterol, estigmasterol, β -sitosterol) em óleo de girassol obtido por CG-MS em modo SIM. Coluna capilar de fase estacionária (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μ m de filme).

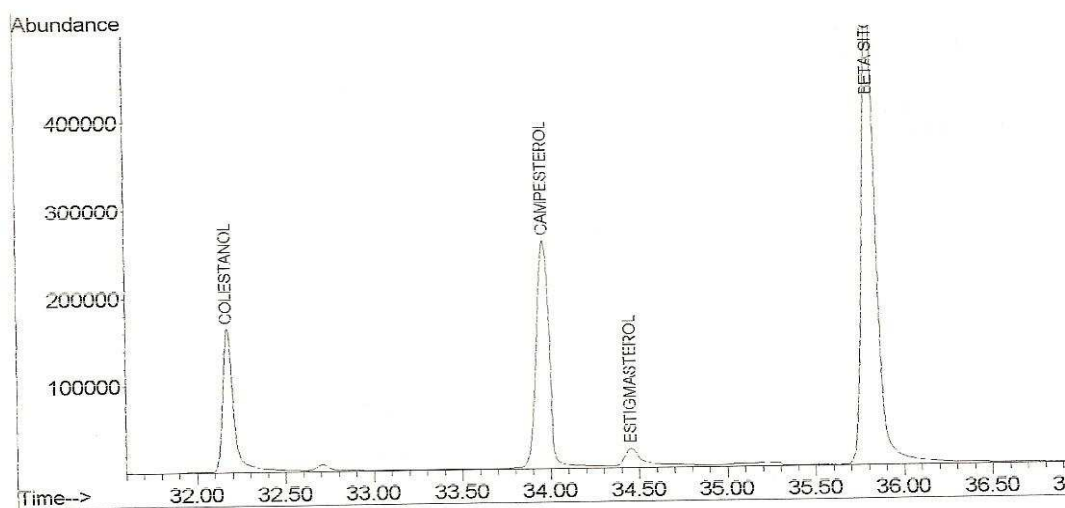


Figura 15. Cromatograma de padrão interno (colestanol) e fitosteróis (campesterol, estigmasterol, β -sitosterol) em óleo de canola obtido por CG-MS em modo SIM. Coluna capilar de fase estacionária (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μ m de filme).

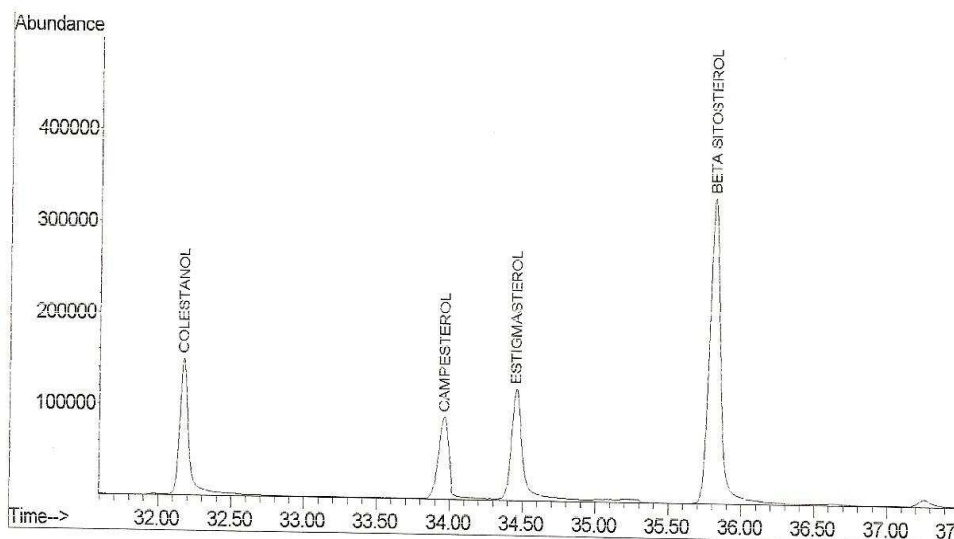


Figura 16. Cromatograma de padrão interno (colestanol) e fitosteróis (campesterol, estigmasterol, β -sitosterol) em óleo de soja obtido por CG-MS em modo SIM. Coluna capilar de fase estacionária (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, 30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 μ m de filme).

A **Tabela 7** apresenta os principais íons dos fitosteróis e colesterol identificados no espectro de massas (MS). Os resultados das dissociações demonstram a perda de uma molécula de água na estrutura do colesterol enquanto para os fitosteróis ocorrem perdas na cadeia lateral. Os fragmentos dos íons de colesterol foram similares aos encontrados em outros estudos (SALDANHA et al., 2006, MAZALLI et al., 2006). Por outro lado, os estudos da fragmentação dos fitosteróis encontrados na literatura são todos realizados após a derivatização dos fitosteróis com trimetilsilileter (TMS), portanto, não foi possível a comparação (DUTA, 2002; ZHANG et al., 2008; MENÉNDEZ-CARREÑO et al., 2008; BORTOLOMEAZZI et al., 1999). Desta forma, a identificação destes compostos nas amostras foi realizada comparando os espectros de massas obtidos com os padrões (campesterol, estigmasterol, β -sitosterol). A identificação

do colesterol foi também realizada desta forma e por comparação com os dados da literatura (SALDANHA et al., 2006; MAZALLI et al., 2006).

Tabela 7. Intensidade relativa dos principais íons do colesterol e dos principais fitosteróis obtido por espectro de massas (MS)

Intensidade Relativa (<i>m/z</i>)											
Íon molecular	400	289	213	386	368	255	271	412	414	32	303
Composto										9	
Campesterol	86	99	100								
Colesterol				100	64						
Estigmasterol						100	83	48			
β-sitosterol									85	92	100

Massa molecular: campesterol = 400,69; colesterol = 386,65; estigmasterol = 412,70; β-sitosterol = 414,72.

O método otimizado foi também validado através da comparação dos resultados com os resultados obtidos pelo método oficial da AOCS (FIRESTONE, 2004), baseada na metodologia oficial do Diário Oficial da Comunidade Européia (L 248, publicado em 05 de setembro de 1991), porém, com algumas modificações. Como este método foi utilizado pela primeira vez no laboratório foram realizado alguns ensaios preliminares onde foi possível observar que:

- 1) Na etapa de extração da matéria insaponificável, a lavagem com água destilada, para retirada do KOH, formava emulsão levando à perda do analito;
- 2) Na etapa de concentração dos insaponificáveis, observou-se a importância da utilização do rotaevaporador para redução do volume do extrato e a secagem final sob fluxo de nitrogênio. Tal fato se fez importante para se evitar a

aderência dos insaponificáveis na parede do balão, que dificultava sua transferência para a cromatoplaça;

3) Na preparação dos insaponificáveis para transferência para a placa de cromatografia, foi necessário utilizar 2 ou 3 mL de hexano para sua dissolução, devido à forte aderência ao balão de fundo chato.

Como as amostras de óleos apresentaram níveis mais elevados de esteróis que as amostras de azeite, utilizou-se 1,5 mL de PI, permanecendo com adição de 0,5 mL para as amostras de azeite.

As taxas de recuperação obtidas com a adição de dois níveis de concentrações para os padrões de β -sitosterol e estigmasterol em amostra de azeite foram baixas para o β -sitosterol (50 ± 13 e $70 \pm 26\%$) e altos para o estigmasterol (106 ± 1 e $114 \pm 4\%$). A recuperação para o estigmasterol foi maior que 100%, tanto para o nível I como para o nível II. No entanto, para o β -sitosterol, que é o fitosterol com maior quantidade encontrada nas amostras, as taxas de recuperação foram menores, o que pode estar relacionado com as possíveis perdas devido às inúmeras etapas realizadas durante a extração, principalmente na etapa de isolamento da placa preparativa. O alto valor para o desvio padrão (13 e 26) confirma a ocorrência de elevada variação entre as determinações.

A adição de padrão interno, desde o início da extração dos fitosteróis, é imprescindível para a obtenção de resultados confiáveis, pois o mesmo corrige possíveis perdas dos analitos durante as várias etapas da metodologia.

Os resultados obtidos pela comparação dos métodos encontram-se na **Tabela 8**. Foram analisados 5 amostras de óleo (girassol, canola, milho, soja e

azeite) e de cada óleo foram analisadas 3 marcas em duplicata. Os resultados individuais obtidos para cada marca de óleo, em cada método, podem ser visualizados nas **Tabelas 9 e 10**.

Tabela 8. Teores dos principais fitosteróis (mg/100g) em óleos vegetais e azeites obtidos por dois métodos analíticos

Oleos	Campesterol		Estigmasterol		β-Sitosterol	
Vegetais	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2	Método 1	Método 2
	M (DP) *	M (DP) *	M (DP) *	M (DP) *	M (DP) *	M (DP) *
Girassol	65,73 (6,67) ^a	30,60 (1,38) ^b	32,33 (3,61) ^a	26,00 (3,21) ^a	207,72 (7,74) ^a	229,43 (17,15) ^a
Canola	270,79 (93,5) ^a	146,38 (44,62) ^b	8,77 (4,28) ^a	6,49 (2,66) ^a	338,99 (107,34) ^a	316,38 (99,28) ^a
Milho	219,02 (3,51) ^a	118,97 (7,98) ^b	56,72 (5,21) ^a	47,10 (4,27) ^a	540,62 (34,52) ^a	577,58 (37,58) ^a
Soja	96,70 (3,15) ^a	50,12 (2,73) ^b	62,81 (7,45) ^a	54,08 (0,81) ^a	174,89 (15,67) ^a	161,73 (42,57) ^a
Azeite	14,31(9,55) ^a	4,87 (1,85) ^b	7,40 (4,82) ^a	1,89 (1,43) ^a	185,61 (93,47) ^a	172,26 (74,67) ^a

*Média e estimativa de desvio padrão de 6 análises (3 marcas em duplicata). Valores na mesma linha com letras iguais não apresentaram diferença significativa ao nível de 5%. **Método 1:** Metodologia desenvolvida e validada no presente trabalho. **Método 2:** Metodologia de acordo com a método oficial da AOCS (FIRESTONE, 2004), tendo a cromatografia em camada delgada.

Observa-se que os resultados obtidos para o campesterol nas amostras de óleo de girassol, milho e soja foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre os dois métodos utilizados, sendo sempre maiores os obtidos pelo Método 1.

Os teores de β-sitosterol e estigmasterol, obtidos pelos dois métodos analíticos utilizados, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) para todos os óleos vegetais analisados.

Tabela 9. Teores dos principais fitosteróis (mg/100g) em diferentes marcas de óleos vegetais e azeites obtidos pelo método validado

Óleos Vegetais	Campesterol M (DP) *	Estigmasterol M (DP) *	β-Sitosterol M (DP) *
Girassol			
Marca M	71,20 (0,26)	28,5 (0,08)	201,54 (0,29)
Marca S	58,30 (0,6)	33,70 (0,30)	216,4 (0,17)
Marca Z	67,7 (1,29)	34,79 (0,29)	205,22 (1,07)
Canola			
Marca M	163,90 (3,74)	13,30 (0,46)	221,05 (3,59)
Marca S	337,30 (3,05)	8,20 (0,13)	430,98(10,67)
Marca Z	311,18 (2,35)	4,80 (0,40)	364,93 (3,73)
Milho			
Marca M	222,99 (2,16)	62,56 (0,15)	564,04 (0,60)
Marca S	216,30 (1,96)	55,07 (0,11)	556,84 (4,14)
Marca Z	217,78 (0,89)	52,54 (0,81)	500,97 (1,09)
Soja			
Marca D	94,10 (4,69)	58,56 (0,11)	161,33 (0,28)
Marca I	95,79 (0,64)	71,41 (0,81)	171,30 (4,49)
Marca Z	100,20 (0,19)	58,46 (0,58)	192,05 (5,37)
Azeite			
Marca C	9,25 (0,00)	5,60 (0,04)	146,78 (1,29)
Marca E	8,36 (0,11)	3,74 (0,08)	117,81 (1,35)
Marca L	25,33 (0,36)	12,87 (0,05)	292,24 (1,71)

*Média e estimativa de desvio padrão de 6 análises (3 lotes em duplicata).

Tabela 10. Teores dos principais fitosteróis (mg/100g) em diferentes marcas de óleos vegetais e azeites obtidos pelo método oficial da AOCS (Firestone, 2004).

Óleos Vegetais	Campesterol M (DP) *	Estigmasterol M (DP) *	β-Sitosterol M (DP) *
Girassol			
Marca M	31,4 (0,28)	22,30 (0,14)	212,05 (2,90)
Marca S	29,00 (0,21)	27,70 (0,42)	229,90 (6,93)
Marca Z	31,40 (1,41)	28,0 (0,85)	246,35 (10,25)
Canola			
Marca M	94,87 (1,14)	9,51 (0,02)	201,74 (3,58)
Marca S	171,06 (0,61)	5,46 (0,09)	373,60 (1,96)
Marca Z	173,20 (4,81)	4,50 (0,14)	373,80 (7,07)
Milho			
Marca M	110,60 (1,13)	52,00 (0,49)	539,85 (13,79)
Marca S	126,50 (1,70)	45,10 (0,71)	615,00 (1,56)
Marca Z	119,80 (4,88)	44,20 (1,13)	577,90 (33,09)
Soja			
Marca D	51,25 (0,35)	53,15 (0,49)	165,84 (0,93)
Marca I	47,00 (0,28)	54,60 (0,00)	117,25 (4,74)
Marca Z	52,10 (1,41)	54,50 (1,98)	202,10 (11,88)
Azeite			
Marca C	3,70 (0,14)	1,40 (0,00)	132,30 (1,13)
Marca E	3,90 (0,00)	0,76 (0,04)	126,07 (1,06)
Marca L	7,00 (0,00)	3,50 (0,14)	258,40 (0,14)

*Média e estimativa de desvio padrão de 6 análises (3 lotes em duplicata).

Em geral, as médias dos teores dos três principais fitosteróis determinados nas amostras de óleos vegetais analisados foram menores quando obtidos pelo método oficial da AOCS (FIRESTONE, 2004) demonstrando que a etapa preparativa com CCD para a separação dos esteróis causa perda dos mesmos.

4.2. Teores dos principais fitosteróis em óleos vegetais e azeite

Como o método otimizado e validado no presente trabalho mostrou-se mais eficiente todas as amostras foram analisadas por este método e os resultados dos principais fitosteróis estão apresentados na **Tabela 11**.

Observa-se que houve diferença significativa para os teores de fitosteróis encontrados nas três marcas de óleo de girassol e canola analisados. Para o óleo de milho apenas o β -sitosterol da marca C diferiu significativamente das demais e para o óleo de soja foi observada diferença significativa nos teores de estigmasterol das marcas analisadas.

Os teores de campesterol variaram de 54,30 mg/100g no óleo de girassol da marca S a 316,55 mg/100g no óleo de canola da marca L. Os teores de estigmasterol variaram de 6,33 mg/100g no óleo de canola de marca S a 62,16 mg/100g no óleo de soja de marca SD. A variação dos teores de β -sitosterol foi de 155,49 mg/100g no óleo de soja de marca SY a 540,35 mg/100g no óleo de milho de marca L.

Dentre todas as amostras analisadas alguns lotes apresentaram altos valores de estimativas dos desvios padrão (%CV > 10) demonstrando variação nos resultados.

Esta variabilidade observada nos teores de fitosteróis, tanto entre os lotes para uma mesma marca, quanto entre as marcas analisadas, pode estar relacionada com a dificuldade da indústria manter a uniformidade no processo utilizado como também pode estar relacionada com as diferentes variedades vegetais (matéria-prima) utilizadas na obtenção dos respectivos óleos. Haddada et al. (2007) analisaram 6 variedades de azeite de oliva e encontraram valores de fitosteróis significativamente diferentes demonstrando a grande variabilidade entre as cultivares e atribuíram exclusivamente aos fatores genéticos.

Os azeites apresentaram valores menores de campesterol que os óleos, variando de 8,15 a 41,93 mg/100g, bem como de β -sitosterol variando de 121,95 a 259,46 mg/100g, embora o óleo de soja (155 a 159 mg/100g) tenha apresentado valores menores que alguns azeites. Por outro lado, os valores de estigmasterol nos azeites variaram desde não detectado (limite de detecção < 1,95 mg/100g) até 29,56 mg/100g sendo menores que os encontrados nos óleos de girassol, milho e soja.

Tabela 11. Teores dos principais fitosteróis (mg/100g) em óleos vegetais e azeites

<i>Óleo</i>	<i>Campesterol</i> <i>M (DP)*</i>	<i>Estigmasterol</i> <i>M (DP)*</i>	<i>β-Sitosterol</i> <i>M (DP)*</i>
Girassol*			
Marca S	54,30 (3,69) ^A	32,42 (1,08) ^A	211,33 (10,84) ^A
Marca L	66,55 (5,42) ^B	32,67 (1,58) ^A	213,41 (7,17) ^A
Marca C	60,45 (8,96) ^{AB}	27,02 (3,40) ^B	183,33 (16,75) ^B
Canola*			
Marca S	314,70 (17,88) ^A	6,33 (1,55) ^B	387,12 (32,40) ^A
Marca L	316,55 (13,39) ^A	6,66 (2,94) ^B	367,91 (7,90) ^A
Marca C	209,23 (40,31) ^B	13,70 (0,58) ^A	264,06 (49,86) ^B
Milho*			
Marca S	231,51 (11,82) ^A	50,71 (3,68) ^A	522,82 (32,14) ^A
Marca L	239,75 (30,50) ^A	56,03 (8,20) ^A	540,72 (49,83) ^A
Marca C	243,69 (33,04) ^A	51,03 (3,55) ^A	455,35 (37,93) ^B
Soja*			
Marca SY	84,94 (12,37) ^A	61,39 (8,85) ^{AB}	155,49 (12,61) ^A
Marca L	92,00 (7,22) ^A	55,25 (3,56) ^B	158,24 (24,52) ^A
Marca SD	91,44 (2,58) ^A	62,16 (3,35) ^A	159,37 (2,40) ^A
Azeite de oliva**			
Marca M	34,46 (26,57) ^{BC}	22,56 (16,36) ^{AB}	172,36 (48,31) ^A
Marca FF	33,66 (25,42) ^B	26,32 (11,57) ^A	206,17 (31,82) ^A
Marca CB	7,93 (1,06) ^C	5,03 (1,06) ^C	133,99 (8,83) ^A
Marca CT	8,56 (1,16) ^A	11,59 (1,04) ^{ABC}	259,46 (26,80) ^A
Marca AD	19,78 (4,58) ^C	ND	127,74 (6,37) ^A
Azeite de oliva extra virgem**			
Marca LE	9,17 (0,82) ^B	4,10 (0,45) ^B	121,95 (9,71) ^C
Marca G	9,40 (1,43) ^B	4,38 ((0,60) ^B	125,04 (5,58) ^C
Marca BO	8,15 (0,22) ^B	ND	139,54 (3,99) ^{BC}
Marca BU	41,93 (34,87) ^A	29,56 (20,92) ^A	159,06 (25,50) ^A
Marca AN	14,29 (2,35) ^B	4,20 (0,38) ^B	159,97 (18,06) ^{AB}

*Média e estimativa de desvio padrão de 27 análises (3 marcas, 3 lotes em triplicata).

** Média e estimativa de desvio padrão de 6 análises (3 lotes em triplicata).

ND= Não detectado (limite de detecção < 1,95 mg/100g)

A **Tabela 12** compara a média dos teores dos principais fitosteróis obtidos entre os diferentes óleos vegetais analisados.

Tabela 12. Teores dos principais fitosteróis (mg/100g) em óleos vegetais e azeites

Óleos Vegetais	Campesterol M (DP)*	Estigmasterol M (DP)*	β -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 de oliva	20,77 (19,46)	13,11 (13,17)	180,34 (56,07)	214,22
Azeite de oliva (EV)	14,76 (16,41)	6,52 (11,99)	140,97 (22,49)	164,06

*Média e estimativa de desvio padrão de 27 análises (3 marcas, 3 lotes em triplicata) para os óleos de soja, milho, canola e girassol e 90 análises (10 marcas, 3 lotes em triplicata) para azeite de oliva. EV= extra virgem

** Fitosteróis totais = campesterol + estigmasterol e β -Sitosterol

Os maiores teores de campesterol foram encontrados no óleo de canola 289,03 mg/100g, seguido do óleo de milho 237,64 mg/100g. O óleo de soja apresentou maiores teores de estigmasterol (59,60 mg/100g) e o óleo de canola os menores valores (8,30 mg/100g). Os teores de β -sitosterol variaram de 140,97 mg/100g no azeite a 512,66 mg/100g no óleo de milho.

Para todos os óleos vegetais estudados, o β -sitosterol foi o fitosterol encontrado em maiores concentrações, enquanto que o estigmasterol apresentou os menores teores.

A **Tabela 13** expressa os resultados em percentagem dos principais fitosteróis nos azeites, com o objetivo de comparar os teores de fitosteróis das amostras analisadas com os limites determinados pela legislação brasileira, RDC

270 de 22/09 de 2005, Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gordura vegetal e Creme Vegetal (ANVISA).

Tabela 13. Percentual dos principais fitosteróis encontrado em azeites

Amostras	Campesterol	Estigmasterol	β -Sitosterol
Azeite de oliva comum			
Marca M	15	10	75
Marca FF	13	10	78
Marca CB	5	3	91
Marca CT	3	4	93
Marca AD	13	-	87
Azeite de oliva extra virgem			
Marca LE	7	3	90
Marca G	7	3	90
Marca BO	5	-	94
Marca BU	18	13	69
Marca A	8	2	90

A RDC 270 (ANVISA, 2005) determina que o percentual de campesterol em azeite de oliva deve ser no máximo 4%, o estigmasterol deve ser inferior ao campesterol e o β -Sitosterol e isômeros deve ter um percentual mínimo de 93%. Como foram determinado apenas os principais fitosteróis (campesterol, estigmasterol e o β -Sitosterol) logo, pode-se indicar uma possível adulteração com outro óleo vegetal nas marcas M, FF, AD e BU que apresentam teor de β -sitosterol entre 69 a 87 %. Além disso, três marcas (M, FF e BU) apresentaram valores de estigmasterol acima do valor determinado. A adulteração de azeite de oliva

virgem, por exemplo, pela adição de óleos de sementes pode ser identificada pelo aumento dos teores de campesterol e estigmasterol e redução de β -sitosterol.

A legislação brasileira também determina um teor mínimo de 1000 mg/kg para esteróis totais. Baseado neste limite as 10 marcas de azeites analisadas apresentaram valores dentro do permitido (**Tabela 14**). No entanto, 4 amostras apresentaram valores de fitosteróis totais maiores que 2000 mg/kg.

Tabela 14. Teor dos fitosteróis totais em mg/kg em azeites

Amostras	Fitosteróis Totais*
Azeite de oliva comum	
Marca M	<u>2.229,38</u>
Marca FF	<u>2.650,85</u>
Marca CB	1.469,70
Marca CT	<u>2.796,10</u>
Marca AD	1.471,80
Azeite de oliva extra virgem	
Marca LE	1.352,22
Marca G	1.382,20
Marca BO	1.479,90
Marca BU	<u>2.305,50</u>
Marca AN	<u>1.784,60</u>

*Fitosteróis totais = campesterol + estigmasterol + β -sitosterol

Becker et al. (2005) analisaram 25 amostras de azeite de oliva sendo 14 de azeite de oliva extra virgem, 8 de azeite de oliva e 3 de azeite de oliva puro e encontraram 3 amostras adulteradas cujos teores de esteróis totais foram elevados (1947, 2187 e 2292 mg/kg) indicando fraude por adição de óleo de bagaço de oliva. Além disso, uma das amostras adulteradas apresentou também

teor de β -sitosterol (88%) abaixo do recomendado para azeite de oliva legítimo. Segundo Antoniassi et al. (1998), 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 do teor de β -sitosterol.

A **Tabela 15** apresenta os percentuais dos principais fitosteróis encontrados nos óleos de girassol, canola, milho e soja estudados. Observa-se que, apenas o campesterol está acima dos percentuais encontrados na literatura (PIIRONEN E LAMPI, 2004) e também dos limites estabelecidos pela RDC 270.

A RDC 270 determina as seguintes faixas de percentuais de fitosteróis para os óleos vegetais:

- Óleo de soja: campesterol de 15,8 a 24,2 %, estigmasterol de 14,0 a 19,1 % e β -sitosterol de 47,0 a 60,0 %;
- Óleo de girassol: campesterol de 6,5 a 13,0 %, estigmasterol de 6,0 a 13,0% e β -sitosterol de 50,0 a 70,0 %;
- Óleo de milho: campesterol de 16,0 a 24,1%, estigmasterol de 4,3 a 8,0% e β -sitosterol de 54,8 a 66,6%;
- Óleo de canola: campesterol de 24,7 a 38,6%, estigmasterol de 0,2 a 1,0 % e β -sitosterol de 45,1 a 57,9%;

Tabela 15. Percentual dos principais fitosteróis encontrado em óleos vegetais

Óleos	Campesterol	Estigmasterol	β -Sitosterol
Soja	29	19	51
Milho	29	6	63
Canola	45	1	54
Girassol	20	10	69

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, mas, para detectar fraudes em azeite de oliva virgem com outro azeite é necessário a quantificação de compostos como o estigmasta-3,5-dieno.

O estigmasta-3,5-dieno e outros compostos orgânicos são originários da desidratação dos esteróis produzidos nas etapas de clarificação e desodorização durante o processo de refino. Portanto, estes compostos não devem estar presentes em azeite de oliva extra virgem. A RDC 270 estabelece um limite máximo de 0,15 mg/kg de estigmasta-3,5-dieno em azeite de oliva virgem.

4.3. Teores de colesterol em óleos vegetais e azeite

Considerando que a estrutura básica dos fitosteróis é muito semelhante à estrutura do colesterol, diferenciando-se apenas na cadeia lateral, a metodologia otimizada e validada para fitosteróis foi também validada para a determinação simultânea de colesterol e fitosteróis.

As porcentagens de recuperação para o colesterol, obtidos pela adição de 6 mg/100g, 12 mg/100g e 30 mg/100g estão apresentados na **Tabela 16**.

A precisão do método, avaliada através da repetitividade e precisão intermediária foi em ambos de $1,6 \pm 0,1$ mg/100g demonstrando pelo baixo valor dos desvios padrões que estes parâmetros apresentaram ótimos resultados (**Tabela 17**).

Os limites de detecção e de quantificação foram de 0,3 e 1,0 mg/100g (**Tabela 18**)

Tabela 16 - Exatidão (taxa de recuperação) do método para determinação simultânea de colesterol e fitosteróis em óleo de milho.

Taxas de colesterol	Recuperação (%)
Nível I	93,5 (2.6)*
Nível II	94,0 (1.2)*
Nível III	98,1(3.0)*

*Média e desvio padrão de 5 repetições analíticas

Tabela 17 - Precisão do método para determinação simultânea de colesterol e fitosteróis em óleo de milho.

Precisão	Colesterol (mg/100g)
Repetitividade	1,6 (0,0)*
Precisão intermediária	1,6 (0,1)*

*Média e desvio padrão de 4 repetições analíticas

Tabela 18. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para a determinação simultânea de colesterol e fitosteróis em óleos vegetais.

Esterol	LD (mg/100g)	LQ (mg/100g)
Colesterol (mg/100)	0,3	1,0

Na **Tabela 19** estão apresentados os resultados de colesterol obtidos pela determinação simultânea de colesterol e fitosteróis nas diferentes marcas para cada um dos óleos vegetais estudados. No entanto, quando o colesterol foi confirmado por CG-MS apenas as amostras de milho confirmaram a presença de colesterol ficando evidente que quando o colesterol está presente em pequenas quantidades em amostras de óleo vegetal deve ser confirmado por MS.

De acordo com a Legislação Brasileira (RDC 270 de 22 de setembro de 2005), que regulamenta a qualidade e identidade de óleos vegetais no Brasil, a quantidade de colesterol em relação ao teor de esteróis totais pode variar de não detectado a 0,7% no óleo de girassol, de não detectado a 1,3 % para o óleo de canola, de 0,2 a 0,6 % para o óleo de milho, de 0,2 a 1,4 % para o óleo de soja e de menor ou igual a 0,5 % para o azeite de oliva. Embora o colesterol tenha sido confirmado apenas no óleo de milho, todos os óleos analisados estão de acordo com a legislação em relação ao colesterol.

Tabela 19. Teores de colesterol (mg/100g) obtidos em diferentes marcas de óleos vegetais e azeites

Óleos Vegetais	Colesterol M (DP)*
Girassol	
Marca M	ND
Marca S	ND
Marca Z	ND
Canola	
Marca M	2,98 (0,52)**
Marca S	1,14 (0,27)**
Marca Z	1,80 (0,05)**
Milho	
Marca M	2,27 (0,17) ^{AB}
Marca S	2,87 (0,40) ^A
Marca Z	1,47 (0,13) ^B
Soja	
Marca D	1,19 (0,18)**
Marca I	1,45 (0,11)**
Marca Z	1,97 (0,05)**
Azeite	
Marca C	ND
Marca E	ND
Marca L	ND

*Média e estimativa de desvio padrão de 6 amostras (3 lotes em duplicata); Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente a um nível de segurança de 5% ($p > 0,05$); ND = Não detectado (limite de detecção = 1,0 mg/100g). ** não confirmados pelo CG-MS

4.4. Parâmetros de qualidade e identidade de óleos vegetais e azeites

Os parâmetros de qualidade (ácidos graxos livres e índice de peróxido) e identidade (índice de refração) estudados entre os lotes para os óleos vegetais e suas respectivas marcas estão expressos na **Tabela 20**.

Tabela 20. Comparação de parâmetros físico-químicos entre as marcas de óleo vegetais e azeites

Amostras	Índice de Peróxido (meq/kg)	Ácidos Graxos Livres (g/100g de Ácido Oléico)	Índice de Refração (40°C)
Canola			
Marca C	1,82 (0,10) ^A	0,02 (0,00) ^A	1,466 (0,000) ^A
Marca L	0,87 (0,18) ^B	0,03 (0,00) ^A	1,466 (0,000) ^A
Marca S	0,88 (0,29) ^B	0,04 (0,01) ^A	1,466 (0,000) ^A
M (DP)*	1,11 (0,47)	0,03 (0,00)	1,466 (0,002)
Milho			
Marca C	1,51 (0,23) ^A	0,03 (0,00) ^A	1,466 (0,000) ^A
Marca L	0,92 (0,65) ^{A C}	0,05 (0,00) ^B	1,466 (0,000) ^A
Marca S	0,57 (0,26) ^C	0,05 (0,00) ^B	1,466 (0,000) ^A
M (DP)*	0,94 (0,56)	0,04 (0,11)	1,467 (0,000)
Soja			
Marca L	1,41 (1,00) ^A	0,06 (0,02) ^A	1,468 (0,000) ^A
Marca S	0,82 (0,27) ^A	0,04 (0,01) ^{A B}	1,468 (0,000) ^A
Marca S	0,94 (0,68) ^A	0,03 (0,0005) ^B	1,467 (0,000) ^A
M (DP)*	0,94 (0,68)	0,048 (0,02)	1,468 (0,004)
Girassol			
Marca C	2,37 (0,40) ^A	0,03 (0,02) ^A	1,468 (0,000) ^A
Marca L	1,49 (0,12) ^B	0,04 (0,00) ^A	1,467 (0,000) ^B
Marca S	2,97 (0,39) ^C	0,03 (0,00) ^A	1,466 (0,000) ^C
M (DP)*	2,28 (0,70)	0,03 (0,01)	1,468 (0,001)
azeite de oliva¹			
Marca M	4,48 (1,11) ^B	0,20 (0,02) ^{BC}	1,469 (0,002) ^B
Marca CB	6,69 (2,99) ^B	0,31 (0,01) ^{AC}	1,469 (0,00) ^B
Marca FF	4,43 (1,25) ^B	0,41 (0,20) ^{AB}	1,471 (0,001) ^{AB}
Marca CT	5,17 (2,92) ^B	0,23 (0,19) ^{BC}	1,470 (0,00) ^{AB}
Marca AD	12,92 (0,44) ^A	0,45 (0,03) ^A	1,469 (0,00) ^B
M (DP)**	6,74 (3,75)	0,31 (0,15)	1,470 (0,001)
azeite de oliva (EV)¹			
Marca LE	8,54 (2,78) ^{AB}	0,37 (0,05) ^{AB}	1,469 (0,000) ^A
Marca G	7,72 (0,53) ^B	0,36 (0,08) ^{AC}	1,469 (0,001) ^A
Marca BO	7,67(1,19) ^B	0,31(0,02) ^{BC}	1,469 (0,000) ^A
Marca BU	6,03 (1,52) ^B	0,18(0,04) ^C	1,472 (0,003) ^B
Marca A	12,21 (3,95) ^A	0,48 (0,18) ^A	1,470 (0,000) ^A
M (DP)**	8,60 (3,02)	0,35 (0,13)	1,470 (0,001)

Para cada tipo de óleo letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente a um nível de segurança de 5% (p<0,05). M (DP)* = *Média e estimativa de desvio padrão de 27 análises (3 marcas, 3 lotes em duplicata). **Média e estimativa de desvio padrão de 45 análises (5 marcas, 3 lotes em duplicata). ¹Índice de Refração realizado a 20°C

Todas as marcas analisadas apresentaram resultados de ácidos graxos livres, índice de refração e peróxido dentro dos limites estabelecido pela RDC 270 para cada tipo de óleo vegetal.

A análise de acidez e peróxido é um parâmetro muito importante para avaliar alterações sofridas pelo óleo em consequência de processos industriais ou de inadequada conservação.

Nas amostras de azeite analisadas os ácidos graxos livres variaram de 0,18 a 0,48 %. A legislação determina um valor de acidez máximo de 0,8 g/100g de ácido oléico para azeite de oliva extra virgem e 1 g/100g para azeite de oliva.

As **Tabelas 21 a 26** relacionam as composições em ácidos graxos (g/100g) encontrados nos azeites e óleos vegetais analisados. Os principais ácidos graxos encontrados foram: C18:1, C18:2 ω 6, C16:0, C18:0 e o C18:3 ω 3, não necessariamente na mesma ordem.

Tabela 21. Composição em ácidos graxos (g/100g) em azeite de oliva.

Ácidos Graxos	Marca M M (DP)*	Marca CB M (DP)*	Marca FF M (DP)*	Marca CT M (DP)*	Marca AD M (DP)*
C14:0	0,10 (0,00)	nd	nd	nd	nd
C16:0	10,13 (0,58)	11,28 (1,13)	10,26 (0,22)	10,45 (0,38)	10,36 (0,34)
C16:1	0,41 (0,28)	0,92 (0,20)	0,57 (0,17)	0,70 (0,15)	0,76 (0,10)
C17:0	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)	0,07 (0,06)	0,10 (0,00)
C17:1	0,10 (0,00)	0,13 (0,05)	0,13 (0,06)	0,10 (0,00)	0,13 (0,05)
C18:0	2,96 (0,34)	3,09 (0,05)	2,84 (0,36)	2,65 (0,20)	3,18 (0,06)
C18:1 <i>trans</i>	0,19 (0,00)	0,03 (0,06)	0,24 (0,07)	0,13 (0,05)	nd
C18:1	55,00 (27,11)	71,48 (2,98)	59,40 (20,56)	69,82 (1,12)	73,10 (1,67)
C18:2 ω 6 <i>trans</i>	0,76 (0,00)	0,06 (0,11)	0,19 (0,00)	0,07 (0,06)	Nd
C18:2 ω 6	23,42 (24,02)	6,95 (1,85)	18,99 (18,08)	9,78 (0,65)	6,24 (1,54)
C20:0	0,45 (0,06)	0,41 (0,06)	0,45 (0,06)	0,51 (0,05)	0,41 (0,06)
C18:3 ω 6	0,38 (0,00)	nd	0,10 (0,00)	nd	nd
C20:1	0,25 (0,06)	0,22(0,06)	0,25 (0,06)	0,32 (0,05)	0,19 (0,00)
C18:3 ω 3	1,59 (1,60)	0,48 (0,10)	1,82 (2,07)	0,57 (0,00)	0,48 (0,00)
C22:0	0,29 (0,17)	0,10 (0,00)	0,25 (0,11)	0,19 (0,00)	0,10 (0,00)
C23:0	nd	0,26 (0,06)	nd	0,10 (0,09)	0,41 (0,06)
C22:5 ω 3	nd	0,03 (0,06)	nd	nd	0,10 (0,00)
C24:0	0,13 (0,06)	0,07 (0,06)	0,10	0,10 (0,00)	0,03 (0,06)
C24:1	nd	nd	0,10 (0,00)	nd	nd
Saturados	14,16	15,31	14,0	13,97	14,59
Monoinsaturado	55,73	72,75	60,4	70,94	74,18
Poliinsaturados	25,39	7,46	20,91	10,35	6,82
Total ω 6	23,8	6,95	19,09	9,78	6,24
Total ω 3	1,59	0,51	1,82	0,57	0,58
Total <i>trans</i>	0,95	0,09	0,20	0,20	nd

*Média e estimativa de desvio padrão entre os 3 lotes analisados.

nd = não detectado, limite de detecção = 0,01g/100g

Tabela 22. Composição em ácidos graxos (g/100g) em azeite de oliva extra virgem.

Ácidos Graxos	Marca BO M (DP)*	Marca LE M (DP)*	Marca BU M (DP)*	Marca G M (DP)*	Marca A M (DP)*
C14:0	nd	nd	nd	nd	nd
C16:0	10,39 (0,34)	10,58 (0,70)	9,47(0,54)	9,69 (1,38)	14,05 (3,41)
C16:1	0,83 (0,06)	0,80 (0,15)	0,39 (0,40)	0,67(0,19)	1,53 (0,75)
C17:0	nd	0,10 (0,00)	nd	0,13 (0,06)	0,07 (0,06)
C17:1	0,10 (0,0)	0,10 (0,00)	0,1 (0,00)	0,16 (0,06)	0,10 (0,00)
C18:0	3,38 (0,05)	3,15 (0,10)	3,59 (0,06)	2,96 (0,10)	2,45 (0,20)
C18:1 <i>trans</i>	nd	nd	0,10 (0,13)	nd	0,13 (0,22)
C18:1	74,03 (0,83)	72,94 (1,34)	49,28 (36,03)	73,68 (1,65)	63,39 (6,63)
C18:2 ω 6 <i>trans</i>	nd	nd	0,48 (0,68)	nd	nd
C18:2 ω 6	5,19 (0,59)	6,31 (0,75)	28,30 (32,32)	6,66 (0,24)	12,27 (3,02)
C20:0	0,38 (0,00)	0,38 (0,00)	0,38 (0,00)	0,38 (0,00)	0,41 (0,06)
C18:3 ω 6	nd	nd	0,29 (0,40)	nd	nd
C20:1	0,19 (0,00)	0,19 (0,00)	0,38 (0,27)	0,19 (0,00)	0,22 (0,06)
C18:3 ω 3	0,57 (0,00)	0,51 (0,06)	2,15 (2,23)	0,57 (0,00)	0,64 (0,06)
C22:0	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)	0,38 (0,27)	0,10 (0,00)	0,13 (0,05)
C23:0	0,38 (0,00)	nd	0,19 (0,27)	nd	0,03 (0,06)
C22:5 ω 3	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)	nd	0,10 (0,00)	nd
C24:0	nd	nd	0,15 (0,07)	nd	0,03 (0,06)
C24:1	nd	nd	nd	nd	nd
Saturados	14,63	14,31	14,16	13,43	17,17
Monoinsaturado	75,15	74,03	49,66	74,70	65,24
Poliinsaturados	5,86	6,92	30,74	7,33	12,91
Total ω 6	5,19	6,31	28,59	6,66	12,27
Total ω 3	0,67	0,61	2,15	0,67	0,64
Total <i>trans</i>	nd	nd	0,58	nd	0,13

*Média e estimativa de desvio padrão entre os 3 lotes analisados.

nd = não detectado, limite de detecção = 0,01g/100g

Tabela 23. Composição em ácidos graxos (g/100g) em óleo de canola.

Ácidos Graxos	Marca S M (DP)*	Marca L M (DP)*	Marca C M (DP)*
C14:0	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)	0,09 (0,00)
C16:0	4,30 (0,16)	4,62 (0,39)	5,74 (0,40)
C16:1	0,19 (0,00)	0,19 (0,00)	0,19 (0,00)
C17:0	nd	nd	0,09 (0,00)
C17:1	nd	0,10 (0,00)	nd
C18:0	2,49 (0,00)	2,49 (0,00)	2,82 (0,20)
C18:1 <i>trans</i>	nd	nd	0,09 (0,00)
C18:1	61,50 (0,36)	60,00 (1,07)	54,06 (2,50)
C18:2 ω 6 <i>trans</i>	0,25 (0,11)	0,10 (0,00)	2,44 (2,23)
C18:2 ω 6	18,36 (0,09)	19,63 (0,84)	22,51 (0,20)
C20:0	0,67 (0,00)	0,67 (0,00)	0,62 (0,07)
C18:3 ω 6	0,48 (0,16)	0,16 (0,06)	1,15 (0,27)
C20:1	1,34 (0,29)	0,92 (0,11)	1,39 (0,61)
C18:3 ω 3	5,03 (0,81)	5,86 (0,15)	2,29 (2,62)
C22:0	0,32 (0,05)	0,29 (0,00)	0,33 (0,07)
C20:3 ω 6	0,19 (0,00)	0,13 (0,06)	0,19 (0,00)
C24:0	0,19 (0,00)	0,19 (0,00)	0,19 (0,00)
C24:1	0,10 (0,00)	0,13 (0,06)	0,09 (0,00)
Saturados	8,00	8,36	9,88
Monoinsaturados	63,13	61,34	55,73
Poliinsaturados	24,06	25,78	26,14
Total ω 6	19,03	19,92	23,85
Total ω 3	5,20	5,86	2,29
Total <i>trans</i>	0,25	0,1	2,53

*Média e estimativa de desvio padrão entre os 3 lotes analisados.

nd = não detectado, limite de detecção = 0,01g/100g

Tabela 24. Composição em ácidos graxos (g/100g) em óleo de girassol.

Ácidos Graxos	Marca S M (DP)*	Marca L M (DP)*	Marca C M (DP)*
C14:0	nd	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)
C16:0	5,23 (0,11)	5,51 (0,36)	7,07 (0,83)
C16:1	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)
C18:0	3,19 (0,15)	3,35 (0,19)	3,54 (0,10)
C18:1 <i>trans</i>	nd	nd	0,10 (0,00)
C18:1	37,86 (2,95)	28,46 (4,88)	27,15 (9,36)
C18:2 ω 6 <i>trans</i>	0,38 (0,19)	0,25 (0,06)	4,56 (2,69)
C18:2 ω 6	47,29 (2,88)	56,12 (4,55)	50,44 (5,57)
C20:0	0,29 (0,00)	0,25 (0,06)	0,35 (0,06)
C18:3 ω 6	nd	nd	0,22 (0,06)
C20:1	0,10 (0,00)	0,19 (0,00)	0,25 (0,11)
C18:3 ω 3	0,13 (0,06)	0,32 (0,11)	0,38 (0,10)
C22:0	0,76 (0,00)	0,67 (0,00)	0,70 (0,06)
C24:0	0,29 (0,00)	0,25 (0,06)	0,19 (0,00)
C24:1	nd	0,10 (0,00)	nd
Saturados	9,75	10,13	11,95
Monoinsaturados	38,06	28,85	27,75
Poliinsaturados	47,42	56,40	51,04
Total ω 6	47,29	56,12	50,66
Total ω 3	0,13	0,32	0,38
Total <i>trans</i>	0,38	0,25	4,66

*Média e estimativa de desvio padrão entre os 3 lotes analisados.

nd = não detectado, limite de detecção = 0,01g/100g

Tabela 25. Composição em ácidos graxos (g/100g) em óleo de milho.

Ácidos Graxos	Marca S M (DP)*	Marca L M (DP)*	Marca C M (DP)*
C16:0	11,66 (0,51)	11,50 (0,34)	10,61 (0,41)
C16:1	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)
C17:0	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)
C17:1	0,10 (0,00)	nd	nd
C18:0	2,29 (0,10)	2,42 (0,11)	2,77 (0,00)
C18:1 <i>trans</i>	nd	nd	0,10 (0,00)
C18:1	35,18 (1,01)	34,07 (0,70)	32,65 (0,20)
C18:2 ω 6 <i>trans</i>	0,16 (0,06)	0,16 (0,06)	3,06 (2,84)
C18:2 ω 6	44,01 (1,07)	45,44 (0,72)	43,26 (3,45)
C20:0	0,57 (0,00)	0,51 (0,06)	0,48 (0,14)
C18:3 ω 6	nd	nd	0,29 (0,00)
C20:1	0,25 (0,06)	0,22 (0,06)	0,29 (0,00)
C18:3 ω 3	0,83 (0,28)	0,70 (0,06)	0,91 (0,74)
C22:0	0,19 (0,00)	0,19 (0,00)	0,33 (0,07)
C24:0	0,19 (0,00)	0,19 (0,00)	0,24 (0,07)
Saturados	15,01	14,72	14,53
Monoinsaturados	35,63	34,40	33,04
Poliinsaturados	44,84	46,14	44,46
Total ω 6	44,01	45,44	43,55
Total ω 3	0,83	0,70	0,91
Total <i>trans</i>	0,16	0,16	3,16

*Média e estimativa de desvio padrão entre os 3 lotes analisados.

nd = não detectado, limite de detecção = 0,01g/100g

Tabela 26. Composição em ácidos graxos (g/100g) em óleo de soja.

Ácidos Graxos	Marca SY M (DP)*	Marca SD M (DP)*	Marca L M (DP)*
C14:0	0,09 (0,00)	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)
C16:0	10,36 (0,22)	10,20 (0,06)	9,88 (0,56)
C16:1	0,09 (0,00)	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)
C17:0	0,09 (0,00)	0,10 (0,00)	0,10 (0,00)
C18:0	3,09 (0,05)	3,15 (0,10)	3,47 (0,24)
C18:1	23,45 (0,72)	24,22 (2,38)	24,12 (3,31)
C18:2 ω 6 <i>trans</i>	0,25 (0,11)	0,25 (0,06)	0,54 (0,24)
C18:2 ω 6	52,04 (0,61)	50,99 (2,52)	50,41 (2,46)
C20:0	0,29 (0,00)	0,32 (0,06)	0,38 (0,00)
C18:3 ω 6	0,16 (0,05)	0,16 (0,06)	0,38 (0,19)
C20:1	0,19 (0,00)	0,22 (0,06)	0,32 (0,31)
C18:3 ω 3	4,75 (0,39)	5,08 (0,37)	4,88 (1,08)
C22:0	0,48 (0,00)	0,48 (0,00)	0,48 (0,00)
C24:0	0,19 (0,00)	0,19 (0,00)	0,19 (0,00)
Saturados	14,40	14,54	14,60
Monoinsaturados	23,71	24,54	24,54
Poliinsaturados	56,95	56,23	55,67
Total ω 6	52,30	51,15	50,79
Total ω 3	4,75	5,08	4,88
Total <i>trans</i>	0,25	0,25	0,54

*Média e estimativa de desvio padrão entre os 3 lotes analisados.

nd = não detectado, limite de detecção = 0,01g/100g

As amostras de azeite de oliva apresentaram maiores variações entre os lotes analisados para uma mesma marca, sendo encontrados desvios padrão de 16,87 e 15,04 para o ácido graxo C18:1 e C18:2 ω 6, respectivamente (**Tabela 27**).

Tabela 27. Composição em ácidos graxos (g/100g) em óleos vegetais e azeites.

Ácidos Graxos	Óleo Soja M (DP)*	Óleo Milho M (DP)*	Óleo Canola M (DP)*	Óleo Girassol M (DP)*	Azeite M (DP)*
C14:0	0,09 (0,00)	nd	0,09 (0,00)	0,09 (0,00)	0,09 (0,00)
C16:0	10,14 (0,37)	11,34 (0,58)	4,78 (0,67)	5,94 (0,97)	10,16 (0,79)
C16:1	0,09 (0,00)	0,09 (0,00)	0,19 (0,00)	0,09 (0,00)	0,62 (0,22)
C17:0	0,09 (0,00)	0,09 (0,00)	0,09 (0,00)	nd	0,10 (0,03)
C17:1	nd	0,09 (0,00)	0,09 (0,00)	nd	0,12 (0,04)
C18:0	3,24 (0,22)	2,46 (0,21)	2,57 (0,17)	3,36 (0,20)	2,98 (0,25)
C18:1 <i>trans</i>	nd	0,09 (0,00)	0,09 (0,00)	0,09 (0,00)	0,21 (0,05)
C18:1	23,93 (2,10)	34,13 (1,24)	59,08 (3,37)	31,15 (7,46)	65,25 (16,87)
C18:2 ω 6 <i>trans</i>	0,35 (0,20)	0,88 (1,72)	0,74 (1,35)	1,73 (2,51)	0,48 (0,40)
C18:2 ω 6	51,15 (1,92)	44,36 (1,75)	19,87 (1,79)	51,28 (5,48)	13,85 (15,04)
C20:0	0,33 (0,05)	0,52 (0,07)	0,66 (0,03)	0,30 (0,06)	0,41 (0,05)
C18:3 ω 6	0,23 (0,15)	0,29 (0,00)	0,52 (0,43)	0,22 (0,05)	0,24 (0,20)
C20:1	0,24 (0,17)	0,25 (0,49)	1,19 (0,36)	0,18 (0,09)	0,22 (0,05)
C18:3 ω 3	4,90 (0,62)	0,80 (0,33)	4,66 (1,69)	0,28 (0,14)	1,12 (1,27)
C22:0	0,48 (0,00)	0,23 (0,07)	0,31 (0,04)	0,71 (0,05)	0,18 (0,12)
C20:3 ω 6	nd	nd	0,17 (0,04)	nd	nd
C22:5 ω 3	nd	nd	nd	nd	0,09 (0,00)
C24:0	0,19 (0,00)	0,20 (0,03)	0,19 (0,00)	0,26 (0,04)	0,11 (0,04)
C24:1	nd	nd	1,11 (0,03)	0,09 (0,00)	nd
Saturados	14,55	14,84	8,70	10,66	14,03
Monoinsaturados	24,26	34,56	61,66	31,51	66,21
Poliinsaturados	56,28	45,45	25,22	51,78	15,30
Total ω 6	51,38	44,65	20,56	51,50	14,09
Total ω 3	4,90	0,80	4,66	0,28	1,21
Total <i>trans</i>	0,35	0,97	0,83	1,82	0,39

*Média e estimativa de desvio padrão de 9 amostras (3 marcas e 3 lotes) para os óleos de soja, milho, canola e girassol e 12 amostras (4 marcas e 3 lotes) para o azeite.
nd = não detectado, limite de detecção = 0,01g/100g

As composições em ácidos graxos dos óleos vegetais apresentaram diferenças entre as marcas analisadas, embora não significativas. As maiores

variações foram encontradas entre as marcas de azeite, onde os teores de ácidos graxos monoinsaturados variaram de 49,66 a 75,15 g/100g e de poliinsaturados 5,86 a 30,74 g/100g.

Das 3 marcas analisadas do óleo de girassol apenas a marca S está em desacordo com a RDC 270 no que diz respeito ao ácido C18:2 ω 6. Se levarmos em consideração o desvio apresentado nos 3 lotes a marca S ficaria dentro do estabelecido.

Das 3 marcas analisadas do óleo de canola apenas a marca C está em desacordo com a RDC 270 no que diz respeito ao ácido C18:3 ω 3, apresentando teor abaixo do estabelecido pela RDC 270.

A presença dos isômeros *trans* nos óleos analisados (milho, canola, girassol e soja) pode estar relacionada com as temperaturas utilizadas nos processos de refino (DHARMA, 2005).

Diante da composição dos ácidos graxos das amostras de azeite é possível afirmar que as marcas M e BU apresentaram adulteração com outro óleo vegetal, pois o ácido linoléico está acima do estabelecido pela RDC 270. Estas mesmas marcas apresentaram valores irregulares de isômeros *trans* e C18:3 ω 3. Das 10 marcas analisadas somente as marcas identificadas como LE, CB, AD, BO e G estão de acordo com a RDC 270.

Nas Figuras 17 a 19 pode-se observar cromatogramas característicos da composição em ácidos graxos dos padrões e de uma amostra de óleo de soja e uma de azeite de oliva, respectivamente.

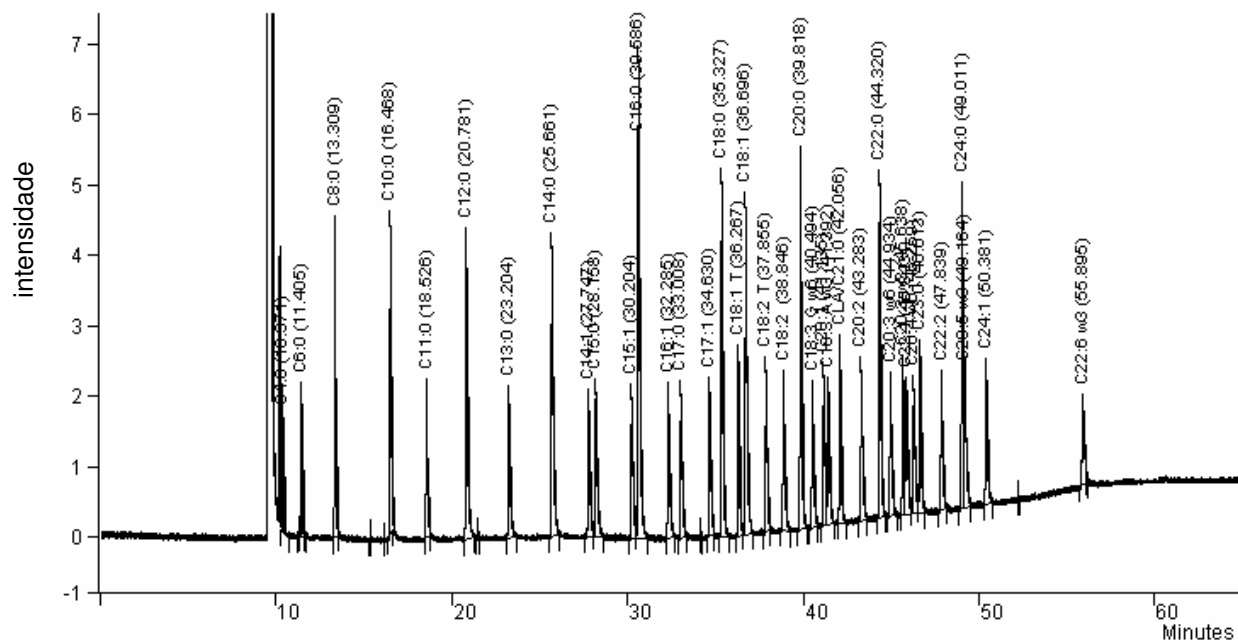


Figura 17. Cromatograma característico da composição em ácidos graxos da mistura de 37 padrões (Supelco 37 component FAME Mix). Coluna capilar CP-SIL 88, 100m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,20 µm.

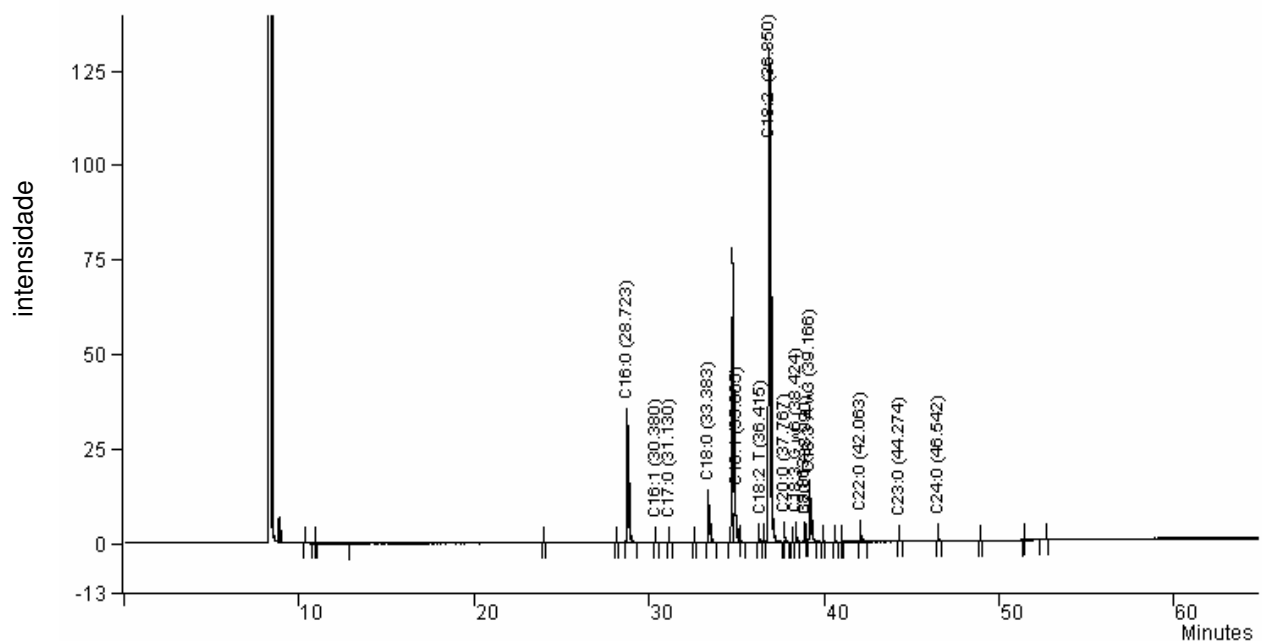


Figura 18. Cromatograma característico da composição em ácidos graxos de óleo de soja. Coluna capilar CP-SIL 88, 100m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,20 µm.

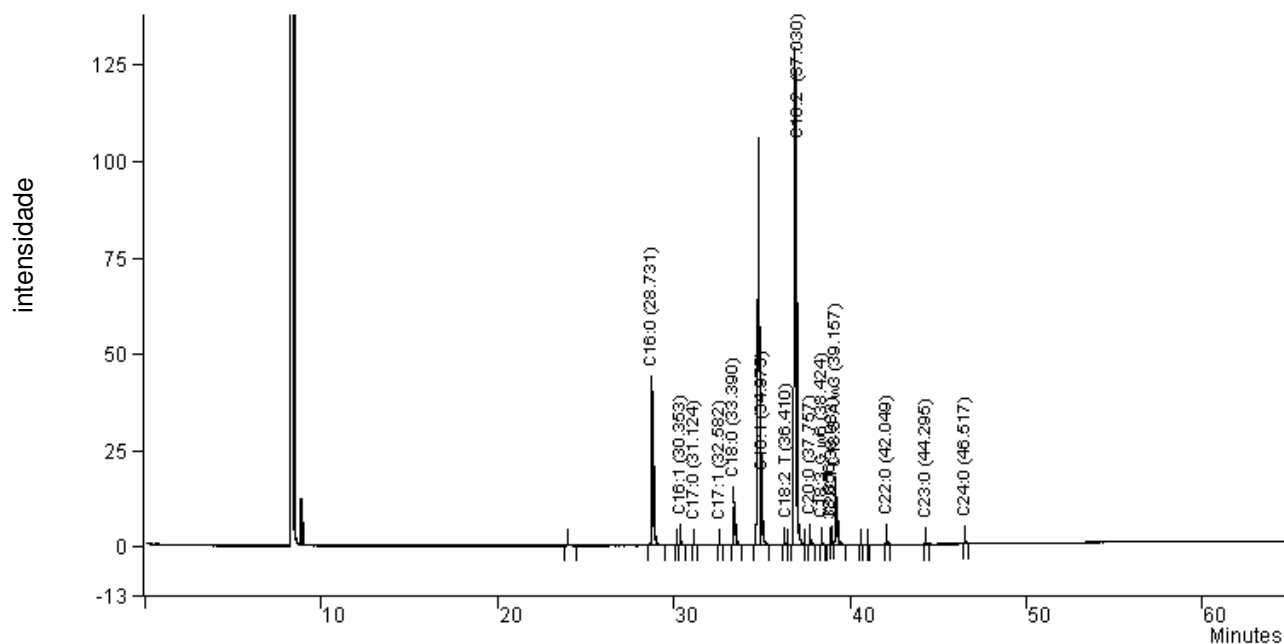


Figura 19. Cromatograma característico da composição em ácidos graxos de azeite. Coluna capilar CP-SIL 88, 100m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,20 μm .

4.5. Correlação entre os teores dos principais fitosteróis e os ácidos graxos *trans* usando análise estatística multivariada

A correlação entre os teores dos principais fitosteróis e os ácidos graxos *trans* foi realizada através da análise do componente principal (ACP) e análise hierárquica por agrupamento. Pela Figura 20 podemos observar que os azeites de oliva apresentaram um comportamento diferenciado dos óleos vegetais onde os azeites de oliva estão separados dos óleos por apresentarem menores níveis de campesterol, estigmasterol e β -sitosterol e serem isentos de ácidos graxos *trans*.

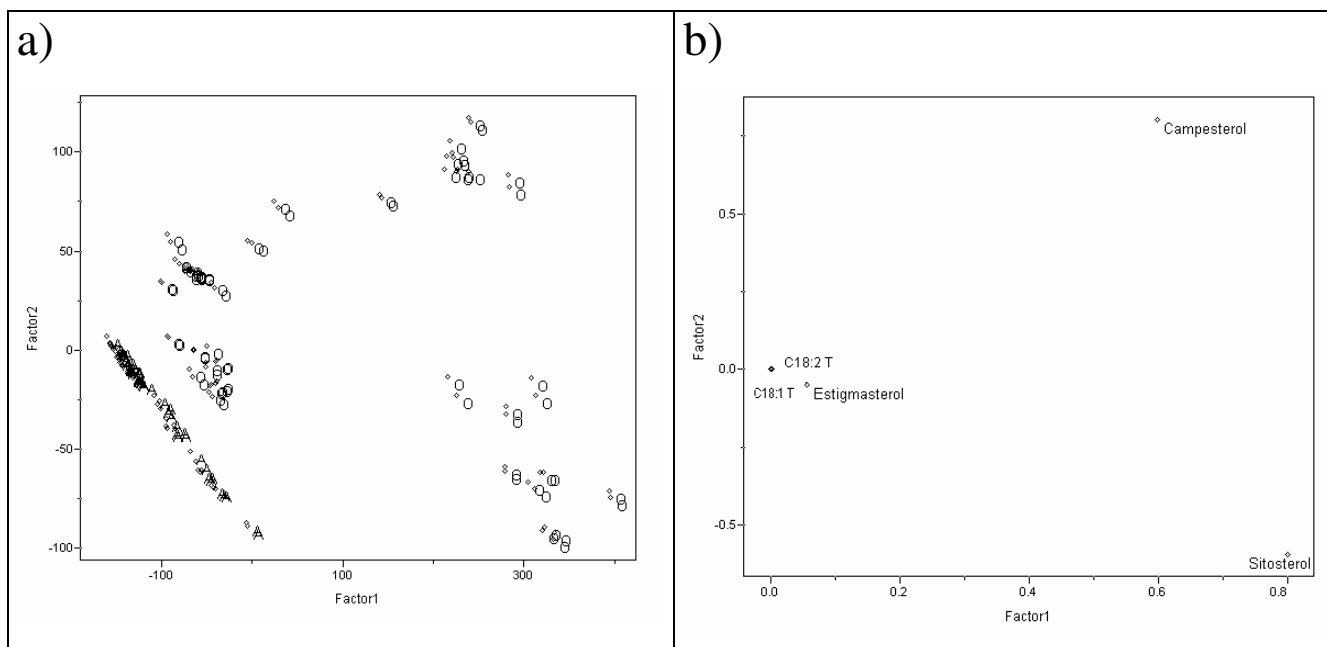


Figura 20. Análise do componente principal (a) em relação a estigmasterol, campesterol, β -sitosterol e ácidos graxos *trans* (b) em azeite de oliva (A) e óleos vegetais (O).

Considerando o conjunto de dados dos óleos vegetais e azeites de oliva (Figura 21), não foi possível observar correlação entre nenhum dos parâmetros analisados, apenas o β -sitosterol demonstrou correlação positiva com o campesterol ($r = 0,82$). Esperava-se obter correlação entre os teores de fitosteróis e os ácidos graxos *trans*, no entanto, isto não foi evidenciado tanto pela análise do componente principal como pela análise hierárquica por agrupamento.

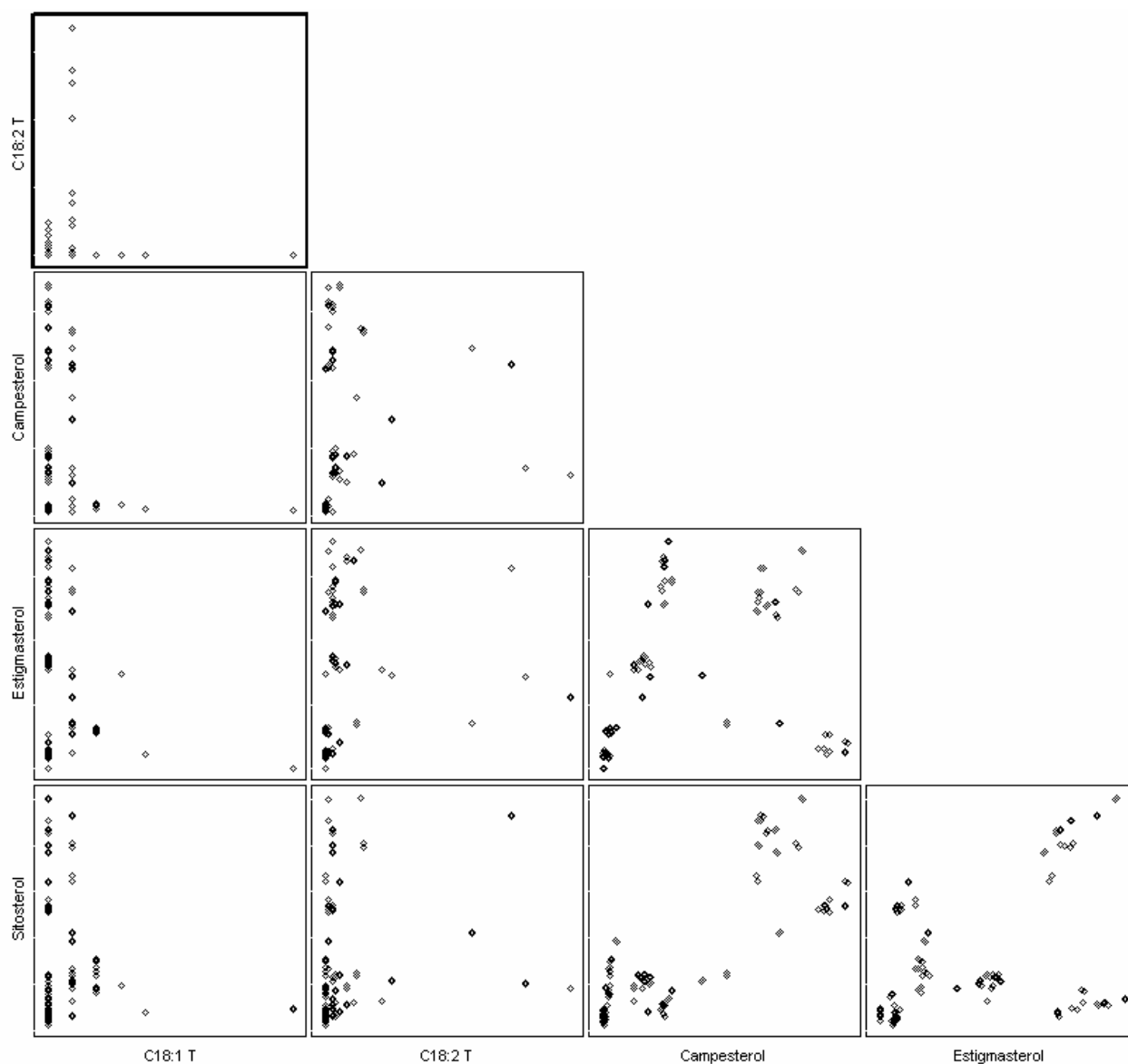


Figura 21. Correlação entre os parâmetros avaliados.

A análise hierárquica por agrupamento dos azeites de oliva demonstrou não ser possível a diferenciação dos os azeites de oliva comum com os azeites de oliva extra virgem através dos parâmetros campesterol, estigmasterol e β -sitosterol (Figura 22). Por outro lado, análise hierárquica por agrupamento dos óleos vegetais (Figura 23) mostrou claramente que os óleos de milho (CM, AM e LM) se diferenciam dos demais óleos vegetais. Isto foi evidenciado na análise do

componente principal (ACP) onde os óleos de milho apresentaram os maiores teores de campesterol e β -sitosterol.

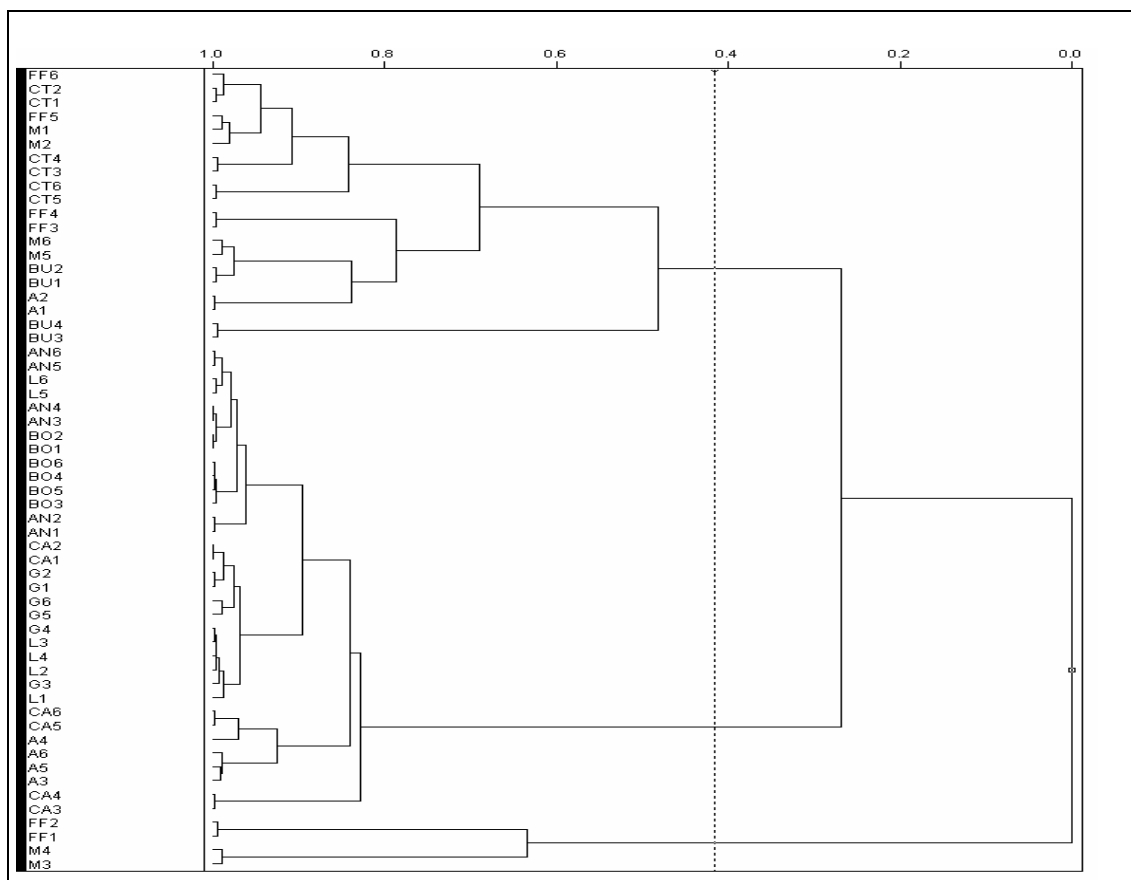


Figura 22 . Dendrograma das diferentes marcas de azeite de oliva. As letras representam diferentes marcas e os números diferentes lotes.

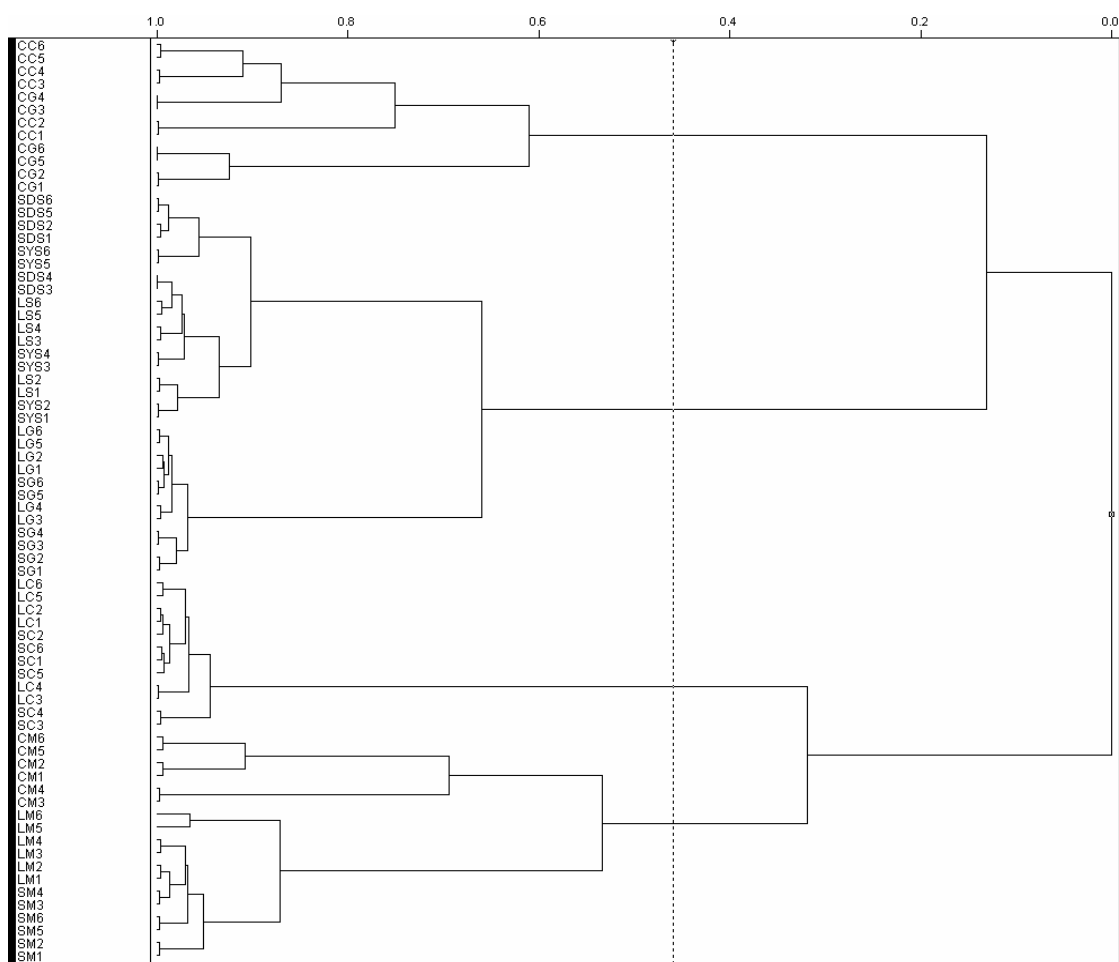


Figura 23. Dendrograma das diferentes marcas dos óleos vegetais. As letras iniciais representam diferentes marcas, a última letra representa os tipos de óleos (milho = M, soja = S, canola = C e girassol = G) e os números diferentes lotes

5. Conclusão

O método validado proposto para a determinação dos principais fitosteróis em óleos vegetais e azeites de oliva, por CG, não apresenta a etapa de cromatografia em camada delgada, como no método da AOCS, sendo de fácil execução, rápido, preciso e exato para a quantificação do campesterol, estigmasterol e β -sitosterol.

A metodologia para a determinação simultânea de colesterol e dos principais fitosteróis em óleos vegetais apresentou ótima precisão e exatidão.

Dos óleos vegetais analisados no presente trabalho, o menor teor de fitosterol total foi obtido no azeite e o maior no óleo de milho, havendo grandes variações entre os lotes analisados.

Quanto aos parâmetros índice de refração, ácidos graxos livres e índice de peróxidos todos os óleos vegetais analisados estão de acordo com a RDC 270.

Das 10 marcas de azeites de oliva analisadas, 4 amostras apresentaram teores de β -sitosterol abaixo do limite recomendado indicando possível adulteração. Além disso, duas marcas apresentaram indícios de adulteração por estarem também em desacordo em relação aos ácidos graxos C18:2 ω 6 (RDC 270).

6. Referências Bibliográficas

ABIDI S. L. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils
Journal of Chromatography A, 2001, 935, 173-201.

ABOISSA ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: <http://www.aboissa.com.br> acesso em 26\11\2007.

AITZETMÜLLER, K.; BRÜHL, L.; FIEBIG, H. J. Analysis of sterol content and composition in fats and oils by capillary-gas liquid chromatography using an internal standard. Comments on the German sterol method. **Fett-Lipid**, 1998, 100, 429-435.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC 270 de 22 de setembro de 2005, Regulamento Técnico para Óleos Vegetais, Gordura vegetal e Creme Vegetal.

ANTONIASSI, R.; PEREIRA, D. A.; SZPIZ, R. R.; JABLONKA, F. H.; LAGO, R.C.A. Avaliação das características de identidade e qualidade de amostras de azeite de oliva. **Brazilian Journal of Food Technology**. 1998, 1, 32-43.

APARICIO, R. Manual Del aceite de oliva. APARICIO, R.; HARWOOD, J. Eds; Madri Vicente, Ediciones y Mundi-prensa, Madri, 2003, cap. 14.

BANDEIRA C. M.; FERREIRA J. M.; BRAGAGNOLO N.; MARIUTTI L. R. B. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de colesterol em ração para ruminantes através de planejamento experimental fatorial. **Química Nova**, 2008, 31,6, 9p.

BECKER, D. F.; GONÇALVES, L. A. G.; GRIMALDI, R.; FERNANDES G. B. Quantificação de fitosteróis em azeite de oliva importados e disponíveis no comércio de Campinas utilizando cromatografia em fase gasosa. **Brazilian Journal of Food Technology**. 2005, 8: 190-199.

BORTOLOMEAZZI, R.; ZAN, M.; PIZZALE, L.; CONTE, L. S. Mass spectrometry characterization of the 5α -, 7α -, and 7β -hydroxy derivatives of β -sitosterol, campesterol, e stigmasterol, and brassicasterol. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. 1999, 47: 3069-3074.

BOSKOU, D. Olive oil: chemistry and technology, Champaing: **AOCS Press**, 1996.

BREINHÖLDER, P.; MOSCA, L.; LINDNER, W. Concept of sequential analysis of free and conjugated phytosterols in different plant matrices. **Journal of Chromatography B**, 2002, 777, 67-82.

CARDOSO, L.G.V. Características físico-químicas e avaliação do perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas em

Minas gerais- Brasil. 2006, 68f. Dissertação (mestrado em ciência de Alimentos) apresentada na Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2006

CARERI, M.; ELVIRI, L.; MANGIA, A. Liquid chromatography-UV determination and liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil. **Journal of Chromatography A**, 2001, 935, 249-257.

CLAYTON, P. T.; WHITFIELD, P.; IYER, K. The Role of Phytosterols in the Pathogenesis of Liver Complications of Pediatric Parenteral Nutrition. **Nutrition**. 1998, 14, 1, 158-164.

COCAMAR- Disponível em: <http://www.cocamar.com.br> acesso em 16/04/2008.

COSTA, P. A. Caracterização de Ácidos graxos, Tocoferóis e Fitosteróis em frutas e Castanhas das Regiões Norte e Nordeste do Brasil 2007, 183f Dissertação (Doutorado em Ciência de Alimentos)- Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.2007.

DHARMA, R. K. Trans Fats – Chemistry, Occurrence, Functional Need in Foods Pontential Solutions, In: Dharma Kodali and Gary R. List, editors. **Trans Fats Alternatives**. USA: ed. Champaign, Illinois; 2005. 1-25.

DOBARGANES, C. Olive Oil: Analytical criteria for quality and purity avaluation. **In International workshop on fats, oils and oilseeds analysis**, IUPAC/Embrapa, 2000.

DORSA, R. Tecnologia de óleos vegetais. 1 ed., Ideal, Campinas, 2004, 463.

DUTTA, P. C. Determination of phytosterol oxidation products in foods and biological samples. In Guardiola F, Dutta P, Codony R. Savage GP. Cholesterol and phytosterol oxidation products in foods and biological samples: analysis, occurrence and biological effects. 2002, 335-374. New York: **AOAC Press**.

ELLEGARD, H.L.; ANDERSSON, S. W.; NORMEN, L.A. Dietary plant sterols and cholesterol metabolism. **Nutrion Reviews**. 2007, 65, 1, 39-45.

FIRESTONE, D. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 5th ed. Champaign: **AOCS**. 2004.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; PADLEY, F. B. **The lipid handbook**, 2th ed, Chapman & Hall Scientific Data Division. 1986, .80-81.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practies**. 1973, 22 (8): 475-476.

HADDADA, F. M.; MANAI, H.; OUESLATI, I.; DAOUD, D.; SÁNCHEZ, J.; OSÓRIO, E.; ZARROUK, M. Fatty acid, triacylglycerol, and phytosterol composition in six Tunisian olive varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2007, 55: 10941-10946.

HUI, Y. H. **Bailey's Industrial oil and fat products**. New York: John Wiley & Sons. 1996, 1, cap.2, p.19-43.

INTERNATIONAL OLIVE OIL COUNCIL. Calculation of the difference between the actual and theoretical ECN 42 triglyceride content. **COI/T**. 20, 20, 2001.

JEKEL, A. A.; VAESSEN, H. A. M. G.; SCHOTHORST R. C. Capillary gas-chromatographic method for determining non-derivatized sterols - some results for duplicate 24 h diet samples collected in 1994. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, 1998, 360, 595-600.

JOHNSSON, L. Phytosterol Oxidation Products: Formation, Analysis and Occurrence. **Swedish University of Agricultural Sciences**. 2004, 59.

JONES, P.J. H.; MACDOUGLL D. E.; NTANIOUS, F.; VANSTONE, C. A. Dietary Phytosterols as Cholesterol-lowering Agents in Humans. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 1997, 75, 217-227.

KEITH, L.H.; CRUMMETT W.; DEEGAN, J. J, LIBBY, R. O.; TAYLOR, J. K.; WENTLER, G. Principles of Environmental Analysis. **Journal of the American Chemistry and Society**. 1983, 55, 2210-2217.

KING, J. W.; SAHLE-DEMESSIE, E.; TEMELLI, F.; TEEL, J. A. Thermal gradient fractionation of glyceride mixtures under supercritical fluid conditions. **The Journal of Supercritical Fluids**. 1997, 10, 127-137.

KOCHHAR, S. P. Influence of processing on sterols of edible vegetable-oils. **Progress in Lipid Research**. 1983, 22, 161-188.

KOVACS, M. I. P. Determination of cholesterol in pasta products using gas-liquid-chromatography. **Journal Cereal Science**. 1990, 11, 291-297.

KRITCHEVSKY, D.; CHEN, S. C. Phytosterols-health benefits and potential concerns: a review. **Nutrition Research**. 2005, 25, 413-428.

LAGARDA, M. J.; GARCÍA-LLATAS, G.; FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 2006, 41, 1486-1496.

LANZON, A.; CERT, A.; ALBI, T. Detection of refined olive oil in virgin olive oil. **Grasas y Aceites**. 1989, 40, 385-388.

MC CANCE AND WIDDOWSON'S. The Composition of Foods, Sixth Summary Edition. Cambridge. **Royal Society of Chemistry**. 2002, 537.

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 Instituto Adolfo Lutz**. 2003, 62,1, 49-54.

MAZALLI, M. R; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; BRAGAGNOLO, N. HPLC method for quantification and characterization of cholesterol and its oxidation products in eggs. **Lipids**. 2006, 41, 615-622.

MEGURO, S.; HASE, T.; OTSUKA, A.; TOKIMITSU, I.; ITAKURA, H. Effect of phytosterols in dietary diacylglycerol on atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Nutrition**. 2003, 19, 670-675.

MENÉNDEZ-CARREÑO, M.; GARCIA-HERREROS, C.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. Validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of sterol oxidation products in serum. **Journal of Chromatography B**. 2008, 864, 61-68.

MITCHEL, J. H.; KRAYBILL, H. R. Formation of conjugated material during bleaching of vegetable oils. **Journal of the American Chemistry and Society**, 1942, 64, 988-994.

MOREAU, R. A.; WHITAKER, B. D.; HICKS, K. B. Phytosterols, phytostanols and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis and health-promoting uses. **Progress in Lipid Research**. 2002, 41, 457-500.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. SP. 1998, 150.

NORMÉN, L.; BRYNGELSON, S.; JOHNSON, M.; EVHEDEN, P.; EIEGARD, L.; BRANTS, H.; ANDERSSON, H.; DUTTA, P. The phytosterols contents some cereal foods commonly consumed in Sweden and in the Netherlands. **Journal of Food Compositions and Analysis**. 2002, 15, 693-704.

NTANIOS, F. Y.; JONES, P. J. H. Effects of variable dietary sitostanol concentrations on plasma lipid profile and phytosterol metabolism in hamsters. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1998, 1390, 237-244.

NTANIOS, F. Plant sterol-ester-enriched spreads as an example of a new functional food. and **European Journal of Lipid Science Techonology**. 2001, 103, 2, 102-106.

O'CONNOR, R. T.; FIELD, E. T.; JEFERSSON, M. E.; DOLLEAR, F. G. The influence of processing on the spectral properties of vegetable oils. **Journal of the American Chemistry and Society**, 1949, 26, 710-718.

PATEL, M. D.; THOMPSON, P. D. Phytosterols and Vascular Disease. **Arteriosclerosis**. 2006, 186, 12-19.

PETERSON, D. W. Effect of Soy Bean Sterols in the Diet on Plasma and Liver Cholesterol in Chicks. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. 1951, 78, 143-147.

PEIXOTO, E. R. M.; SANTANA, D. M. N.; ABRANTES, S. Avaliação dos índices de identidade e qualidade do azeite de oliva - proposta para atualização da legislação brasileira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 1998, 18, 4, 444-452

PHILLIPS, K. M.; RUGGIO, D. M.; TOIVO, J. I.; SWANK, M. A.; SIMPKINS, A. H. Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. **Journal of Food Compositions and Analysis**. 2002, 15, 123-142.

PIIRONEN, V.; LINDSAY, D. G.; MIETTINEN, T. A.; TOIVO, J.; LAMPI, A. M. Plants sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. **Journal of Science of Food and Agriculture**. 2000, 80, 939-966.

PIIRONEN, V.; LAMPI, A. M. Occurrence and levels of phytosterols in foods. In DUTTA, P. C. (ed) *Phytosterols as functional food components and nutraceuticals*. New York: Marcel Dekker. 2004, 1- 33.

PIROUETTE. Multivariate Data Analysis for Windows, version 3.02. Woodinville, 2001.

RAMON, A. Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. **Journal of Chromatography A**. 2000, 881, p.93-104.

RODRIGUES, J. N.; MANCINI, J.; TORRES, R. P.; GIOIELLI, L. A. Caracterização Físico-Química de Creme Vegetal Enriquecido com Ésteres De Fitosteróis. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. 2004, 40, 4, 505-520.

RODRIGUES, M.I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. Casa do Pão Editora, Campinas, 2005.

SALDANHA, T.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; BRAGAGNOLO, N. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV and APCI-MS detectors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2006, 54, 4107-4113.

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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 1996, 44, 512-517.

STATSOFT Inc (2000). Statistic for Windows v. 5, 5. Tulsa: Stat soft Inc.

SYNDER, J. M.; KING, J. W.; TAYLOR, S. L.; NEESE, A. L. Concentration of phytosterols for analysis by supercritical fluid extraction. **Journal of the American Chemistry and Society**, 1999, 76, 717-721.

TOIVO, J.; PHILLIPS, K.; LAMPI, A. M.; PIIRONEN, V. Determination of sterols in foods: Recovery of free, esterified, and glycosidic sterols. **Journal of Food Composition and Analysis**, 2001, 14, 631-643.

TOIVO, V. ; PIIRONEN, V. ; KALO P. ; VARO, P. Gas chromatographic determination of major sterols in edible oils and fats using solid-phase extraction in sample preparation. **Chromatographia**, 1998, 48, 745-750.

TOIVO, J.; LAMPI, A. M.; AALTO, S.; PIIRONEN, V. Factors Affecting Sample Preparation in the Gas Chromatographic Determination of Plant Sterols in Whole Flour. **Food Chemistry**, 2000, 68, 239-245.

VERLEYEN, T.; FORCADES, M.; VERHE, R.; DEWETTINCK, A.; HUYGHEBAERT, A.; GREYT, W. Analysis of Free and Esterified Sterols in Vegetable Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 2002, 79, 2, 117-122.

VERLEYEN, T.; SOSINKA, U.; IOANNIDOU, S.; VERHE, R.; DEWETTINCK, K.; HUYGHEBAERT, A. D. E.; GREYT, W. Influence of the Vegetable Oil Refining Process on Free and Esterified Sterols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. 2002, 79, 10, 947-953.

WANG, T.; MOREAU, R. A.; HICKS, K. B. Antioxidant Activity of Phytosterols, Oryzanol and Other Phytosterol Conjugates. **Journal of the American Oil Chemists Society**. 2002, 79, 12, 1201-1206.

WEBER, N.; WEITKAMP, P.; MUKHERJEE, K. D. Cholesterol-lowering food additives: lipase-catalysed preparation of phytosterol and phytostanol esters. **Food Research International**. 2002, 35, 2-3, 177-181.

ZHANG, X.; JULIEN-DAVID, D.; MIESCH, M.; GEOFFROY, P.; RAUL, F.; ROUSSI, S.; AOUDE-WERNER, D.; MARCHIONI, E. Identification and quantitative analysis of β -sitosterol oxides in vegetable oils by capillary gas chromatography-mass spectrometry. **Steroids**. 2008, 70, 896-906.