

COMUNICADO
TÉCNICO

231

Rio de Janeiro, RJ
Dezembro, 2018

Embrapa

Método de Análise de Tocoferóis em Azeite de Oliva por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa

Adelia Ferreira de Faria-Machado¹
Rosemar Antoniassi²
Andrea Madalena Maciel Guedes³
Allan Eduardo Wilhelm⁴

Método de Análise de Tocoferóis em Azeite de Oliva por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa¹

¹ Engenheira de Alimentos, D.Sc. em Ciência de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

² Engenheira de Alimentos, D.Sc. em Engenharia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

³ Engenheira Química, D.Sc. em Tecnologia de Alimentos, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

⁴ Farmacêutico Bioquímico, M.Sc. em Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ.

Os tococromanóis (tocoferóis e tocotrienóis) fazem parte da fração insaponificável de óleos vegetais, sendo a sua presença muito importante para estabilidade oxidativa do óleo, em especial para evitar a oxidação de ácidos graxos insaturados. Os quatro membros de cada subfamília (α -, β -, γ -, δ -) diferem entre si no número e posição de grupos metila no anel cromanol (Kamal-Eldin, 2005).

Os métodos oficiais da AOCS e IUPAC para análise de tocoferóis e tocotrienóis em óleos são baseados em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase normal, usando coluna cromatográfica de sílica e uma mistura de isopropanol e hexano como fase móvel (AOCS, 2009; International Union of Pure and Applied Chemistry, 1992). Essa recomendação se deve ao fato

de que a cromatografia em fase normal para a análise de tococromanóis permite a separação dos isômeros γ e β que coeluem quando se utiliza cromatografia em fase reversa. Por outro lado, a cromatografia em fase reversa permite o uso de solventes com menor volatilidade na fase móvel, reduzindo a exposição das pessoas que trabalham no laboratório a vapores de solvente, além de apresentar melhor reprodutibilidade e tempos mais curtos para equilíbrio da fase estacionária (Rupérez et al., 2001).

No caso do azeite de oliva, o principal tococromanol presente é o α -tocoferol (cerca de 90 % do total de tococromanóis) com pequenas quantidades dos demais isômeros (Boskou et al., 2006). Assim, para essa matriz o uso de cromatografia líquida em fase reversa para análise de tocoferóis é uma alternativa viável,

sendo esta técnica empregada neste trabalho para adaptar e validar o método.

As análises foram realizadas em um sistema cromatográfico Alliance, modelo 2695, da Waters Technologies, equipado com bomba quaternária, desgaseificador *on-line*, injetor automático com válvula Rheodyne (Rheodyne LCC, Rohnert Park, EUA) e forno externo para coluna cromatográfica, conectado em série com os detectores de arranjo de diodos (DAD), Waters modelo 2998, e de fluorescência (FLD, do inglês *fluorescence detector*), Waters modelo 2424. Os tocoferóis foram separados em coluna de fase reversa de C₁₈ X-Bridge (3,5 µm, 150 x 3,0 mm d.i., Waters), mantida a 35 °C, utilizando como fase móvel metanol/acetonitrila 1:1 em condição isocrática, com fluxo de 0,5 mL/min e tempo de corrida de 20 min. Os espectros de absorção foram obtidos entre 200 e 800 nm. O detector FLD foi operado com comprimentos de onda de excitação e emissão de 290 nm e 330 nm, respectivamente. Os dados foram adquiridos e processados utilizando o software Empower 2 (Waters).

Para a adaptação e validação do método foi utilizado o padrão de α -tocoferol da Sigma® (pureza aproximada 95%) e um total de 51 amostras de azeites de oliva virgem brasileiros, de diferentes variedades de azeitona, provenientes da Serra da Mantiqueira e do Rio Grande do Sul, das safras de 2015, 2016 e 2017. As amostras foram armazenadas sob congelamento (a -18 °C) e, imediatamente antes da análise, os

azeites foram fundidos em temperatura ambiente. As amostras foram pesadas (0,05 ± 0,01 g), dissolvidas em 2 mL de isopropanol e injetadas no cromatógrafo. A quantificação foi realizada por meio de curva de calibração de α -tocoferol de acordo com o método Ce 8-89 da AOCS (2009).

Os solventes utilizados, tanto para dissolução do padrão e das amostras, quanto para a fase móvel do cromatógrafo, foram grau cromatográfico das marcas Tedia ou Merck.

Em relação ao preparo de amostra para análise, em se tratando de óleos vegetais, os métodos oficiais recomendam a dissolução da amostra em solvente apropriado e injeção no cromatógrafo, sem necessidade de extração prévia (AOCS, 2009; International Union of Pure and Applied Chemistry, 1992). Seguindo a mesma lógica, e considerando os trabalhos de outros autores que também utilizaram cromatografia em fase reversa para análise de tocoferóis em óleos (Gliszczynska-Swigło; Sikorska, 2004; Lara-Ortega et al., 2017; Di Serio et al., 2016), adotou-se o mesmo procedimento neste trabalho. O isopropanol foi selecionado para a dissolução dos azeites devido a sua capacidade de dissolver completamente o óleo e à compatibilidade com a fase móvel selecionada. O solvente escolhido mostrou-se adequado para dar continuidade nas análises uma vez que não houve ocorrência de material em suspensão, nem formação de emulsão, assim como não provocou alterações

no comportamento cromatográfico dos analitos de interesse.

A escolha da fase móvel foi feita buscando a retenção necessária dos analitos de interesse, bem como a resolução adequada dos mesmos, considerando as combinações de solventes empregados em outros trabalhos similares relatados na literatura (Gliszczynska-Swigo; Sikorska, 2004; Gruszka; Kruk, 2007). Assim, a combinação acetonitrila/metanol (1:1) em condição isocrática foi avaliada e se mostrou adequada para a separação das substâncias de interesse, como pode ser observado na Figura 1.

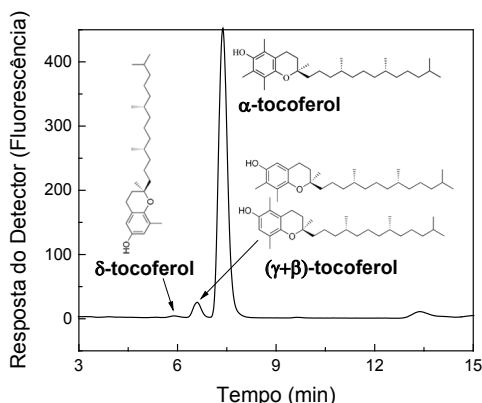


Figura 1. Cromatograma, obtido por CLAE-FLD, dos tocoferóis do azeite de oliva virgem da variedade Arbosana, produzido no Rio Grande do Sul. Condições de análise descritas no método.

No caso da análise de tococromanóis por CLAE, a seletividade do método está diretamente relacionada às condições cromatográficas, em especial ao tipo de detector escolhido. De acordo com Rupérez et al. (2001), há quatro tipos

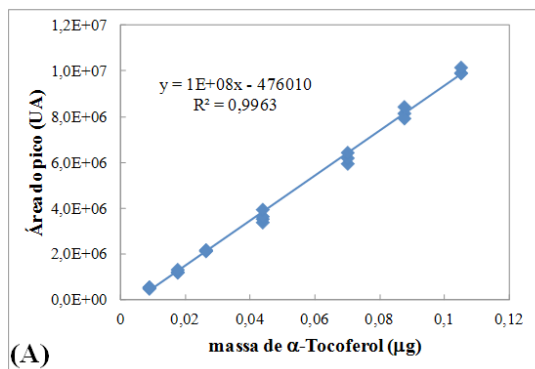
de detectores usuais para a análise de tococromanóis: eletroquímico (ED, do inglês *electrochemical detector*), por fluorescência (FLD), por absorvância em UV e por *light scattering* (ELSD, do inglês *evaporative light scattering*), em ordem decrescente de sensibilidade. Sendo que os métodos oficiais recomendam o FLD e, na ausência deste, um detector baseado na absorvância em UV (detector com comprimento de onda fixo ou DAD).

O detector de fluorescência é um dos mais utilizados em função de sua alta sensibilidade e seletividade para tococromanóis, além de ser de mais fácil operação, quando comparado ao ED, e compatível tanto com as fases móveis de cromatografia em fase normal como de cromatografia em fase reversa (o que não ocorre com o ED, por exemplo). A detecção por absorvância em UV apresenta uma sensibilidade cerca de 10^3 vezes menor que a sensibilidade do FLD (Rupérez et al., 2001). Há ainda a possibilidade de usar o detector por espectrometria de massas (EM ou MS, do inglês *mass spectrometry*), mas para quantificação por meio desse detector é necessário ter padrão para cada um dos analitos de interesse, o que nem sempre é viável, seja pelo custo dos padrões, seja pela disponibilidade comercial dos mesmos.

Assim, o detector selecionado para os ensaios deste trabalho foi o FLD. O registro dos dados do DAD foi mantido para confirmar a identificação dos compostos, bem como verificar a

ocorrência de coeluição que pudesse interferir nos resultados da análise, o que não ocorreu com as amostras avaliadas.

A linearidade do método foi avaliada por meio da curva de calibração de α -tocoferol (Figura 2A) que foi obtida



por meio de análise em triplicata para cada ponto da curva. De acordo com os resultados obtidos, o método apresentou boa linearidade ($R^2 \geq 0,995$) e os dados apresentaram distribuição homocedástica (Figura 2B).

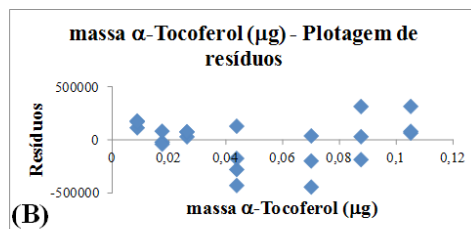


Figura 2. Curva de calibração de α -tocoferol, obtida por CLAE-FLD. Condições de análise descritas no método.

A partir dos dados da curva de calibração, foram determinados os limites de detecção e quantificação de acordo com a recomendação do ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005) para validação de procedimentos analíticos. Os valores encontrados foram $2,5 \pm 0,7$ ng e $7,4 \pm 2,1$ ng de α -tocoferol para os limites de detecção e quantificação, respectivamente.

O método em estudo apresentou ainda boa repetitividade, a análise de variância (ANOVA) dos resultados obtidos para as amostras de azeite de oliva analisadas mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as replicatas de cada amostra.

O teor de tocoferóis totais variou de 146 mg/kg (para um azeite da variedade Arbequina) a 385 mg/kg (para um azeite da variedade Koroneiki) sendo o α -tocoferol o principal componente (78 a 96 %), seguido de $(\gamma+\beta)$ -tocoferol (3 a 21 %) e δ -tocoferol (não detectado a 2 %). O α -tocoferol variou de 133 a 350 mg/kg, sendo este resultado muito significativo já que esta substância é o tococromanol com maior atividade de vitamina E.

O método adaptado e validado neste estudo mostrou-se bastante apropriado, simples, rápido e conveniente para a análise de tocoferóis em azeites de oliva.

Referências

AOCS. American Oil Chemists' Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 6 ed. Champaign, EUA: AOCS, 2009.

BOSKOU, D.; BLEKAS, G.; TSIMIDOU, M. Olive Oil Composition. In: BOSKOU, D. (Ed.). **Olive Oil: Chemistry and Technology**. 2 ed. Champaign, EUA: AOCS Press, 2006.

GLISZCZYNSKA-SWIGŁO, A.; SIKORSKA, E. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. **Journal of Chromatography A**, 1048, p. 195-198, 2004.

GRUSZKA, J.; KRUK, J. RP-LC for Determination of Plastochromanol, Tocotrienols and Tocopherols in Plant Oils. **Chromatographia**, 66, p. 909-913, 2007.

ICH Harmonised Tripartite Guideline. **Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1)**. Current Step 4 version. 2005. 17 p.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives**. 7 ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992. 1 supp.

KAMAL-ELDIN, A. Minor Components of Fats and Oils. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 6 ed. Hoboken, EUA: John Wiley & Sons, 2005. v. 3, cap. 12.

DI SERIO, M. G.; DI GIACINTO, L.; DI LORETO, G.; GIANSANTE, L.; PELLEGRINO, M.; VITO, R.; PERRI, E. Chemical and sensory characteristics of Italian virgin olive oils from Grossa di Gerace cv. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 118, p. 288-298, 2016.

LARA-ORTEGA, F. J.; GILBERT-LÓPEZ, B.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A. Fast Automated Determination of Total Tocopherol Content in Virgin Olive Oil Using a Single Multicommuted Luminescent Flow Method. **Food Analytical Methods**, v.10, p. 2125-2131, 2017.

RUPÉREZ, F. J.; MARTÍN, D.; HERRERA, E.; BARBAS, C. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 935, p. 45-69, 2001.

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria de Alimentos
Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470, Rio de Janeiro, RJ
Fone: (0xx21) 3622-9600
Fax: (0xx21) 3622-9713
www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

1ª impressão (2018): 50 exemplares

Embrapa

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações da Embrapa Agroindústria de Alimentos

Presidente

Virgínia Martins da Matta

Membros

André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares, Janine Passos Lima da Silva, Leda Maria Fortes Gottschalk, Marcos de Oliveira Moulin, Otniel Freitas Silva e Rogério Germani

Supervisão editorial

Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá

Revisão de texto

Marianna Ramos dos Anjos

Normalização bibliográfica

Elizabete Alves de Almeida Soares

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

André Luis do Nascimento Gomes

Foto da capa

Allan Eduardo Wilhelm