

# COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE FITOSTERÓIS E QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE FITOSTERÓIS E COLESTEROL EM ÓLEOS VEGETAIS

KARINA I. SILVA<sup>1</sup>; SUELI R. BAGGIO<sup>2\*</sup>, CLÁUDIA A. SILVA ALMEIDA<sup>3</sup>

Nº 0801036

## Resumo

Os fitosteróis estão naturalmente presentes em vegetais, sendo os óleos vegetais umas das principais fontes. Os principais fitosteróis encontrados são: campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. O presente trabalho teve como objetivo comparar duas metodologias para a determinação de fitosteróis e quantificar simultaneamente os fitosteróis e o colesterol em óleos vegetais. A composição de fitosteróis e o colesterol foram determinados por cromatografia gasosa, utilizando coluna capilar de fase estacionária HP-5MS (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25  $\mu$ m de filme). O  $\beta$ -sitosterol foi o fitosterol encontrado em maiores concentrações entre os óleos analisados, variando de 161,73 no óleo de soja a 577,58 mg/100g no óleo de milho, em seguida o campesterol variando de 4,87 no azeite a 270,79 mg/100g no óleo de canola. Os teores de estigmasterol variaram de 1,89 no azeite a 62,81 mg/100g no óleo de soja. Dos esteróis determinados, o colesterol apresentou os menores teores, variando de não detectado no óleo de girassol e no azeite a 2,20 mg/100g no óleo de milho. Dos óleos vegetais analisados, o azeite apresentou os menores teores de esteróis totais (207,32 mg/100g) e o óleo de milho os maiores teores (818,56 mg/100g).

## Abstract

The phytosterols are naturally found in vegetables, where the vegetable oils are one of the main sources. The main phytosterols found are: campesterol, stigmasterol and  $\beta$ -sitosterol. The objective of this work was to compare two methodologies for the determination of phytosterols and quantify simultaneously phytosterols and cholesterol in vegetable oils. The composition of phytosterols and cholesterol was determined by gas chromatography, using a capillary column HP-5MS (30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 (m of film). The  $\beta$ -sitosterol was the fitosterol found in higher concentrations among the oils tested, varying from 161.73 in

---

<sup>1</sup>Bolsista CNPq: Faculdade de Ciências Biológicas, PUC-Campinas, SP.

<sup>2\*</sup>Orientadora: Pesquisadora, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos - CCQA/ITAL, 13070-178, Campinas, SP, Brasil, Email: [sueli@ital.sp.gov.br](mailto:sueli@ital.sp.gov.br)

<sup>3</sup>Co-orientadora: Assistente de Pesquisa - CCQA/ITAL, 13070-178, Campinas, SP, Brasil.

soybean oil to 577.58 mg/100g in corn oil, and then the campesterol varying from 4.87 in olive-oil to 270.79 mg/100g in canola oil. The levels of stigmasterol varied from 1.89 in olive-oil to 62.81 mg/100g in soybean oil. The cholesterol showed the lowest levels, varying from not detected in sunflower oil and olive-oil to 2.20 mg/100g of corn oil. From all of the vegetable oils analyzed, the olive-oil presented the less contents of total sterol (207.32 mg/100g) and the corn oil the higher contents (818.56 mg/100g).

## **Introdução**

Os esteróis são substâncias presentes e essenciais nas membranas celulares dos animais e dos vegetais. Os esteróis de origem vegetal, denominados fitosteróis, são substâncias químicas biologicamente ativas encontradas nos vegetais, no entanto, o esterol mais conhecido é o colesterol, encontrado principalmente nos produtos de origem animal.

A estrutura básica dos fitosteróis é conhecida como ciclopentanoperidrofenantreno, sendo muito semelhante à estrutura do colesterol, diferenciando-se apenas na cadeia lateral. A maior parte dos fitosteróis possui cadeias longas com 28 ou 29 átomos de carbono e com uma ou duas ligações duplas. Os principais fitosteróis encontrados em alimentos são: campesterol,  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitostanol (MOREAU, 2002).

Os óleos vegetais são as principais fontes de fitosteróis. O conteúdo e a composição dos mesmos podem variar de acordo com a espécie do vegetal, a parte do vegetal de onde foram extraídos, as condições climáticas, a qualidade da semente ou frutos, o sistema de extração e o processo de refino. A determinação dos fitosteróis é essencial para a avaliação analítica da qualidade e possível adulteração de óleos vegetais (MOREDA, 2000).

Devido às propriedades terapêuticas dos fitosteróis e a algumas propriedades adversas do colesterol, o interesse em quantificá-los em alimentos tem crescido muito. Existem vários métodos para a determinação de fitosteróis e colesterol, sendo a maior parte deles baseada em análises cromatográficas.

O presente trabalho teve como objetivo comparar duas metodologias analíticas para a determinação de fitosteróis em óleos vegetais e quantificar simultaneamente, por cromatografia gasosa, os teores de fitosteróis e de colesterol em óleos vegetais.

## **Materiais e Métodos**

### **Amostras**

Foram analisadas cinco amostras de óleos vegetais (azeite, óleo de soja, milho, canola e girassol), sendo três marcas diferentes para cada tipo de óleo. As amostras foram adquiridas no comércio da cidade de Campinas/SP.

### **Métodos**

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

Para a determinação dos teores de fitosteróis em óleos vegetais, foram comparadas duas metodologias analíticas, sendo uma validada no Laboratório de Bromatologia do Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos do ITAL, utilizando cromatografia gasosa, e a outra uma metodologia oficial da AOCS (FIRESTONE, 1998), contendo uma etapa preparativa utilizando cromatografia em camada delgada de sílica, seguida da quantificação por cromatografia gasosa. A metodologia para a determinação de fitosteróis, desenvolvida no Laboratório de Bromatologia do ITAL, apresenta as seguintes etapas: saponificação a quente, extração da matéria insaponificável com hexano e quantificação dos fitosteróis por cromatografia gasosa. A cromatografia gasosa foi realizada em um cromatógrafo HP, modelo 6890, equipado com amostrador automático, injetor split (razão 15:1), coluna capilar de fase estacionária (5 % Fenil 95 % dimetilpolisiloxano, 30m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm de filme) e detector por ionização em chama (FID). A identificação dos picos foi realizada através de comparação do tempo de retenção das amostras com os padrões e por co-cromatografia e a quantificação por padronização interna, utilizando como padrão interno dihidrocolesterol (Sigma-Aldrich).

#### **Determinação simultânea de colesterol e fitosteróis por CG**

Para a determinação simultânea de colesterol e fitosteróis em óleos vegetais, por cromatografia gasosa, foi utilizada uma metodologia baseada em Mazalli et al. (2003), com as seguintes etapas: saponificação a quente, extração da matéria insaponificável com hexano e quantificação. A quantificação foi realizada por cromatografia gasosa, utilizando um cromatógrafo HP, modelo 6890, equipado com amostrador automático; injetor split, razão 15:1; coluna capilar HP-5MS (30 m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm de filme); detector por ionização em chama (FID).

## Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresentada uma comparação dos teores médios de fitosteróis encontrados nos óleos vegetais obtidos pelas duas metodologias empregadas no presente trabalho, sendo o Método 1, o método validado no Laboratório de Bromatologia do ITAL, o qual não apresenta a etapa preparativa da cromatoplaça; e o Método 2, o método oficial da AOCS (FIRESTONE, 1998), que apresenta a etapa de cromatografia em camada delgada.

**TABELA 1** - Teores de fitosteróis (mg/100g) em óleos vegetais obtidos por dois métodos analíticos.

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

\*Média e estimativa de desvio padrão de 6 amostras (3 marcas em duplicata). Valores na mesma linha com letras iguais não apresentaram diferença significativa ao nível de 5%. **Método 1**: Metodologia desenvolvida no Laboratório de Bromatologia do ITAL. **Método 2**: Metodologia de acordo com a método oficial da AOCS (FIRESTONE, 1998), empregando 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, não apresentaram diferença significativa para todos os óleos vegetais analisados.

Na maioria das amostras analisadas, os teores de fitosteróis obtidos pelo Método 1 foram maiores, com exceção somente dos teores de β-sitosterol encontrados nos óleos de girassol e milho que foram maiores quando obtidos pelo Método 2, embora a diferença não tenha sido significativa, ao nível de 5%.

A Tabela 2 apresenta os teores de fitosteróis (campesterol, estigmasterol e β-sitosterol) e de colesterol obtidos simultaneamente, por cromatografia gasosa, nos óleos vegetais analisados no presente trabalho.

**TABELA 2** - Teores de fitosteróis e colesterol (mg/100g) obtidos em óleos vegetais.

<b>Óleos Vegetais</b>	<b>Campesterol M (DP)*</b>	<b>Estigmasterol M (DP)*</b>	<b><math>\beta</math>-Sitosterol M (DP)*</b>	<b>Colesterol M (DP)*</b>	<b>Esteróis Totais</b>
<b>Girassol</b>	65,73 (6,67)	32,33 (3,61)	207,72 (7,74)	nd**	305,78
<b>Canola</b>	270,79 (93,5)	8,77 (4,28)	338,99 (107,34)	1,97 (0,87)	620,52
<b>Milho</b>	219,02 (3,51)	56,72 (5,21)	540,62 (34,52)	2,20 (0,66)	818,56
<b>Soja</b>	96,70 (3,15)	62,81 (7,45)	174,89 (15,67)	1,54 (0,37)	335,94
<b>Azeite</b>	14,31(9,55)	7,40 (4,82)	185,61 (93,47)	nd**	207,32

\*Média e estimativa de desvio padrão de 6 amostras (3 marcas em duplicata).

\*\*Não detectado, limite de detecção = 1,0 mg/100g

O  $\beta$ -sitosterol foi o fitosterol encontrado em maiores concentrações entre os óleos analisados, variando de 174,89 no óleo de soja a 540,62 mg/100g no óleo de milho, em seguida o campesterol variando de 14,31 no azeite a 270,79 mg/100g no óleo de canola. Os teores de estigmasterol variaram de 7,40 no azeite a 62,81 mg/100g no óleo de soja.

Dos esteróis determinados, o colesterol apresentou os menores teores, variando de não detectado no óleo de girassol e azeite a 2,20 mg/100g no óleo de milho. A presença do colesterol em concentrações baixas era esperada, uma vez que este é um esterol encontrado principalmente em produtos de origem animal.

Os teores de esteróis totais, obtidos nos óleos vegetais analisados, variaram de 207,32 no azeite a 818,56 mg/100g no óleo de milho.

## **Conclusão**

As duas metodologias analíticas propostas, para a determinação de fitosteróis em óleos vegetais, não apresentaram diferenças significativas entre as mesmas. Portanto, o método oficial da AOCS (FIRESTONE, 1998) pode ser substituído com segurança pelo método validado no Laboratório de Bromatologia do ITAL, o qual, além de ser seguro, é mais rápido e menos trabalhoso.

A determinação simultânea de fitosteróis e colesterol, por cromatografia gasosa, em óleos vegetais apresentou como vantagem a redução de custos e tempo de análise.

Dentre os fitosteróis analisados, o  $\beta$ -sitosterol foi encontrado em maiores concentrações, enquanto que as menores foram obtidas para o estigmasterol. Os maiores teores de esteróis totais foram obtidos no óleo de milho, seguido do óleo de canola, o azeite apresentou os menores teores. Os óleos vegetais apresentaram baixas concentrações de colesterol.

## **Referências Bibliográficas**

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

MAZALLI, M.R., SALDANHA, T., BRAGAGNOLO, N. Determinação de colesterol em ovos: comparação entre um método enzimático e um método por cromatografia líquida de alta eficiência. Revista do IAL, 62: 1, 49-53, 2003.

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, 41, 457-500, 2002.

MOREDA, W. Chromatographic Analysis of Minor Constituents in Vegetable Oils. Journal of Chromatography A, 881, 131-148, 2000.

## **Agradecimentos**

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