



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



**OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS
POR ELETROFORESE CAPILAR E ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO
EM ÁCIDOS GRAXOS DE AZEITE DE OLIVA EXTRAVIRGEM**

Cristiano Augusto Ballus

Químico Industrial de Alimentos

Profª Dra. Helena Teixeira Godoy

Orientadora

Profº Dr. Roy Edward Bruns

Coorientador (IQ-UNICAMP)

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

Campinas

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B214o Ballus, Cristiano Augusto
Otimização da separação de compostos fenólicos por eletroforese capilar e análise da composição em ácidos graxos de azeite de oliva extravirgem / Cristiano Augusto Ballus. -- Campinas, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Helena Teixeira Godoy.
Co-orientador: Roy Edward Bruns.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Azeite de oliva. 2. Ácidos graxos. 3. Compostos fenólicos.
4. Eletroforese capilar. I. Godoy, Helena Teixeira. II. Bruns, Roy Edward. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Titulo em inglês: Optimization of phenolic compound separation by capillary electrophoresis and analysis of extra-virgin olive oil fatty acid profiles

Palavras-chave em inglês (Keywords): Olive oil, Fatty acids, Phenolic compounds, Capillary electrophoresis

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Helena Teixeira Godoy
Jesuí Vergílio Visentainer
Marcelo Alexandre Prado
Paulo Afonso da Costa
Renato Grimaldi

Data de defesa: 11/03/2010

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dra. Helena Teixeira Godoy

Orientadora

Dr. Paulo Afonso da Costa

Membro

Dr. Renato Grimaldi

Membro

Dr. Jesuí Vergílio Visentainer

Membro

Dr. Marcelo Alexandre Prado

Membro

“Os químicos são uma estranha classe de mortais, impelidos por um impulso quase insano a procurar seus prazeres em meio à fumaça e vapor, fuligem e chamas, venenos e pobreza e, no entanto, entre todos esses males, tenho a impressão de viver tão agradavelmente que preferiria morrer a trocar de lugar com o rei da Pérsia.”

Johann Joachim Becher, Physica Subterranea (1667)

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Dedico este trabalho
aos meus pais, Virgínio e Maria Eli,
às minhas irmãs, Patrícia e Bianca,
ao Robson, meu grande amigo,
e a todos que já foram meus professores
nesta longa jornada.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Virgínio e Maria Eli, e às minhas irmãs, Patrícia e Bianca, por todo o amor, carinho, por estarem sempre ao meu lado, compreendendo a ausência e sempre me incentivando a seguir em frente. Devo tudo a vocês.

À minha orientadora, professora Dra. Helena Teixeira Godoy, por todo seu apoio, carinho, ensinamentos e, principalmente, pela amizade, da qual sinto muito orgulho. Você é uma pessoa muito especial, um exemplo que irei carregar por toda a minha vida.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa de estudos concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela aprovação do projeto (processo nº 08/57548-0) cujo financiamento tornou possível a aquisição dos materiais e reagentes para a realização dos experimentos desta dissertação.

Ao meu coorientador, professor Dr. Roy Edward Bruns, do Instituto de Química da UNICAMP, pela disponibilidade e apoio de fundamental importância na realização dos planejamentos experimentais e na análise estatística dos dados.

Aos professores da banca examinadora, Dr. Jesuí Vergílio Visentainer, Dr. Marcelo Alexandre Prado, Dr. Paulo Afonso da Costa e Dr. Renato Grimaldi, pelas valiosas correções e sugestões que colaboraram muito para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Robson, meu grande amigo e companheiro, com o qual dividi não apenas apartamento, mas todas as conquistas, derrotas, alegrias e tristezas durante estes dois anos. Muito obrigado por fazer parte da minha vida.

À professora Dra. Juliana Azevedo Lima-Pallone, pelo carinho, pela amizade e pelas conversas estimulantes. Fiquei muito feliz em te conhecer, e foi muito gratificante poder trabalhar contigo nos estágios PED.

Ao professor Dr. Marcelo Alexandre Prado e à sua esposa, Simone, os quais se tornaram grandes amigos. Agradeço ao Marcelo principalmente pelas brincadeiras, pelo apoio e pelas oportunidades de estágio docente.

Ao Seu Dirceu, pelo exemplo de profissional dedicado e sempre disposto a ajudar. Seu trabalho foi inestimável e facilitou a condução dos experimentos descritos neste trabalho.

Às técnicas do Laboratório de Análise de Alimentos, Cristina e Gislaine, por todo o apoio, não apenas em questões técnicas, mas de convivência também.

Ao pessoal da Secretaria de Pós-Graduação, em especial ao Cosme e ao Marcos, por todo o suporte e paciência, principalmente durante o processo de defesa.

Ao pessoal da Secretaria do DCA, Jardete, Guiomar e todos os demais, que foram muito importantes durante todo o período do mestrado.

Às colegas e amigas do Laboratório de Análise de Alimentos, Adriana, Carol e Ciça, pois não há como descrever tudo que passamos juntos nestes dois anos, mas posso afirmar que vocês deixaram uma marca que jamais poderá ser apagada, e aos demais amigos do Laboratório de Análise de Alimentos, Cíntia, Dani Bio, Dani Ferreira, Dani Pane, Elede, Fernanda, Grasiela, Jéssica, Joyce, Lucíula, Merenice, Paula, Pollyane, Raquel, Romina, Stanislau, Vivian (e Batata!), pois sem vocês certamente não teria sido tão incrível fazer parte deste laboratório! Muito obrigado pelas piadas, momentos de descontração, de aprendizado, de dúvidas, de certezas, pelas festas, mas principalmente pelo carinho e pela amizade. Todos vocês são pessoas muito importantes em minha vida!

Aos colegas e amigos Gustavo, Isabela, Ana Elizabeth, Renan e Poli, que ingressaram na UNICAMP junto comigo, cursamos várias disciplinas juntos, e sempre lembrarei com carinho de todos vocês! Obrigado por tudo!

A todos que já foram meus professores durante esta longa jornada acadêmica.

E agradeço também a todos que, mesmo não tendo sido citados, colaboraram para a realização deste trabalho e para que eu pudesse chegar até aqui.

ÍNDICE GERAL

RESUMO GERAL	xix
ABSTRACT.....	xxi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	4

CAPÍTULO 1

COMPOSTOS FENÓLICOS EM AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM: PROPRIEDADES, BENEFÍCIOS À SAÚDE E MÉTODOS DE ANÁLISE.....	7
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
1.1. Azeite de Oliva – Definição.....	8
1.2. Azeite de Oliva e Saúde.....	10
1.3. Composição Química do Azeite de Oliva.....	12
1.4. Compostos Fenólicos em Azeite de Oliva	14
1.4.1. <i>Análise de Compostos Fenólicos em Azeite de Oliva.....</i>	<i>21</i>
1.4.1.1. <i>Extração dos Compostos Fenólicos</i>	<i>21</i>
1.4.1.2. <i>Separação e Quantificação dos Compostos Fenólicos</i>	<i>23</i>
1.4.2. <i>Emprego de Técnicas Multivariadas para a Otimização de Métodos de Separação</i>	<i>27</i>
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

CAPÍTULO 2

COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DE AZEITES DE OLIVA EXTRA VIRGEM COMERCIALIZADOS NO BRASIL	47
RESUMO.....	48
1. INTRODUÇÃO	49
2. MATERIAL E MÉTODOS	51
2.1. Reagentes.....	51

2.2. Amostras	51
2.3. Preparo dos ésteres metílicos	52
2.4. Condições cromatográficas GC-FID.....	53
2.5. Confirmação da identidade dos ésteres metílicos por GC/MS	54
2.6. Análise Estatística	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.1. Validação do processo de preparação dos ésteres metílicos	55
3.2. Quantificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos por GC-FID.....	56
3.3. Confirmação dos ésteres metílicos da amostra por GC/MS	63
3.4. Análise de Componentes Principais (PCA)	64
4. CONCLUSÃO	67
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

CAPÍTULO 3

OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE 13 COMPOSTOS FENÓLICOS PRESENTES EM AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM POR ELETROFORESE CAPILAR	73
RESUMO.....	74
1. INTRODUÇÃO	75
2. MATERIAL E MÉTODOS	77
2.1. Reagentes.....	77
2.2. Equipamento	78
2.3. Planejamento dos experimentos e tratamento dos dados.....	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
3.1. Seleção da resposta para o planejamento composto central.....	81
3.1.1. Validação dos modelos construídos com a resposta Resolução (R_S).....	82
3.1.2. Validação dos modelos construídos com a resposta Retenção Relativa (R_R).....	85

3.1.3. Validação dos modelos construídos com a resposta fator de “migração” (<i>k</i>)	89
3.2. Condição ótima de separação	92
4. CONCLUSÃO	95
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

CAPÍTULO 4

USO DA ESTATÍSTICA MULTIVARIADA NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE 13 COMPOSTOS FENÓLICOS EM AZEITE DE OLIVA EXTRAVIRGEM POR ELETROFORESE CAPILAR	101
RESUMO.....	102
1. INTRODUÇÃO	103
2. MATERIAL E MÉTODOS	105
2.1. Reagentes	105
2.2. Equipamento	106
2.3. Planejamento dos experimentos e tratamento dos dados	107
2.4. Pré-concentração on-line (<i>stacking</i>)	110
2.5. Validação do método por eletroforese capilar	112
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
3.1. Variação da concentração de ácido bórico	112
3.2. Validação dos modelos construídos com a resposta Resolução (<i>R_S</i>) ...	114
3.3. Emprego da pré-concentração on-line (<i>stacking</i>)	124
3.4. Validação do método	126
4. CONCLUSÃO	129
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	130
CONCLUSÃO GERAL.....	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estruturas de alguns compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva virgem. Identificação: 1) Ácido Gálico; 2) Ácido *p*-hidroxibenzoico; 3) Ácido 3,4-dihidroxibenzoico; 4) Ácido Vanílico; 5) Ácido Cinâmico; 6) Ácido Cafeico; 7) Ácido *p*-cumárico; 8) Ácido Ferrúlico; 9) Tirosol; 10) Hidroxitirosol; 11) Luteolina; 12) Apigenina; 13) Oleuropeína Glicosídeo. 17

Figura 2.1. Perfil cromatográfico obtido para a análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos por GC-FID. As condições cromatográficas encontram-se descritas no item 2.4 da seção Material e Métodos. Identificação dos picos: 16:0 - éster metílico do ácido palmítico; 18:0 - éster metílico do ácido esteárico; 18:1 (n-9) - éster metílico do ácido oleico; 18:2 (n-6) - éster metílico do ácido linoleico; 18:3 (n-3) - éster metílico do ácido α -linolênico; 20:0 - éster metílico do ácido araquídico; 20:1 (n-9) - éster metílico do ácido gadoleico. 59

Figura 2.2. Perfil cromatográfico obtido para a análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos por GC/MS. As condições cromatográficas encontram-se descritas no item 2.5 da seção Material e Métodos. Identificação dos picos: 16:0 - éster metílico do ácido palmítico; 18:0 - éster metílico do ácido esteárico; 18:1 (n-9) - éster metílico do ácido oleico; 18:2 (n-6) - éster metílico do ácido linoleico; 18:3 (n-3) - éster metílico do ácido α -linolênico; 20:0 - éster metílico do ácido araquídico; 20:1 (n-9) - éster metílico do ácido gadoleico. 64

Figura 2.3. Gráfico dos pesos (“*loading graph*”) mostrando o primeiro e o segundo componentes principais para os valores das respostas. 65

Figura 2.4. Gráfico dos escores (“*score graph*”) mostrando o primeiro e o segundo componentes principais para os valores das respostas. Siglas dos países de origem: GRE = Grécia; ESP = Espanha; POR = Portugal; ITA = Itália; ARG = Argentina. 67

Figura 3.1. Separação de 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem por eletroforese capilar de zona. Capilar de 50 μm d. i. x 72 cm comprimento efetivo com bulbo estendido, eletrólito tetraborato de sódio 35 mmol L^{-1} , pH 9,1, 30 kV, 25°C, injeção de 50 mbar por 5 s e detecção em 210 nm. Identificação dos picos: 0) Solvente; 1) Tirosol; 2) Oleuropeína Glicosídeo; 3) Hidroxitirosol; 4) Ácido Cinâmico; 5) Ácido Ferrúlico; 6) Apigenina; 7) Ácido *p*-cumárico; 8) Luteolina; 9) Ácido Vanílico; 10) Ácido *p*-hidroxibenzoico; 11) Ácido Cafeico; 12) Ácido Gálico; 13) Ácido 3,4-dihidroxibenzoico. 93

Figura 3.2. Curva de mobilidade efetiva para os 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem. Eletrólito: TBS 35 mmol L^{-1} 94

Figura 4.1. Variação da concentração de ácido bórico em pH 9,0. A) BOR 50 mmol L^{-1} ; B) BOR 100 mmol L^{-1} ; C) BOR 150 mmol L^{-1} ; D) BOR 175 mmol L^{-1} ; E) BOR 200 mmol L^{-1} ; F) BOR 250 mmol L^{-1} . Identificação dos picos: 0) Solvente; 1) Tirosol; 2) Oleuropeína Glicosídeo; 3) Hidroxitirosol; 4) Ácido Cinâmico; 5) Ácido Ferrúlico; 6)

Ácido *p*-cumárico; 7) Apigenina; 8) Ácido Vanílico; 9) Luteolina; 10) Ácido *p*-hidroxibenzoico; 11) Ácido Cafeico; 12) Ácido Gálico; 13) Ácido 3,4-dihidroxibenzoico. 113

Figura 4.2. Gráficos de valores preditos vs valores observados para a resolução entre pares de compostos e para o tempo de corrida. 118

Figura 4.3. Condições experimentais (A-C) que fornecem valores das respostas próximos aos alvos estipulados nas funções de desejabilidade individuais e gráficos das funções de desejabilidade individuais (D-I) com os valores preditos pelos modelos para cada resposta. 121

Figura 4.4. Condição ótima de separação para 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem por eletroforese capilar de zona. Capilar de 50 μm d. i. x 60 cm comprimento efetivo com bulbo estendido, eletrólito ácido bórico 50 mmol L^{-1} , pH 10,2, 30 kV, 25°C, injeção de 50 mbar por 5 s e detecção em 210 nm. Identificação dos picos: 0) Solvente; 1) Oleuropeína Glicosídeo; 2) Tirozol; 3) Hidroxitirozol; 4) Ácido Cinâmico; 5) Luteolina; 6) Apigenina; 7) Ácido Ferrúlico; 8) Ácido Cafeico; 9) Ácido *p*-cumárico; 10) Ácido Vanílico; 11) Ácido 3,4-dihidroxibenzoico; 12) Ácido Gálico; 13) Ácido *p*-hidroxibenzoico. 122

Figura 4.5. Curva de mobilidade efetiva para os 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem. Eletrólito BOR 50 mmol L^{-1} 123

Figura 4.6. A) Extrato metanólico de compostos fenólicos obtido a partir de 15 g de azeite de oliva extravirgem, injetado com 50 mbar por 5 s. B) Extrato metanólico de compostos fenólicos obtido a partir de 2 g do mesmo azeite de oliva, injetado com 50 mbar por 25 s, e com posterior aplicação de voltagem inversa (-30 kV por 5 s). Identificação dos picos: 1) Tirozol; 2) Hidroxitirozol; 3) Luteolina; 4) Apigenina. 126

Figura 4.7. Eletroferograma com a separação dos 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem por eletroforese capilar. Mistura de padrões contendo 12,9 mg L^{-1} de cada composto. Capilar de 50 μm d. i. x 60 cm comprimento efetivo com bulbo estendido, eletrólito ácido bórico 50 mmol L^{-1} , pH 10,2, 30 kV, 25°C, injeção de 50 mbar por 25 s com aplicação de voltagem inversa (-30 kV por 5 s) e detecção em 210 nm. Identificação dos picos: 0) Solvente; 1) Oleuropeína Glicosídeo; 2) Tirozol; 3) Hidroxitirozol; 4) Ácido Cinâmico; 5) Luteolina; 6) Apigenina; 7) Ácido Ferrúlico; 8) Ácido Cafeico; 9) Ácido *p*-cumárico; 10) Ácido Vanílico; 11) Ácido 3,4-dihidroxibenzoico; 12) Ácido Gálico; 13) Ácido *p*-hidroxibenzoico. 129

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1. Classificação do azeite de oliva.	9
Tabela 2.1. Informações do rótulo das amostras de azeite de oliva extravirgem.....	52
Tabela 2.2. Teor de ácidos graxos em amostras de azeite de oliva extravirgem.....	57
Tabela 2.3. Teor médio de ácidos graxos para as diferentes marcas de azeite de oliva extravirgem.....	62
Tabela 3.1. Matriz do planejamento composto central utilizando TBS.	81
Tabela 3.2. Valores de resolução (R_S) calculados para os pares de compostos que coeluíram nas condições do planejamento.	83
Tabela 3.3. Resumo da ANOVA considerando a significância estatística da regressão e a falta de ajuste dos modelos quadráticos empregando-se a resolução como resposta.....	84
Tabela 3.4. Valores de retenção relativa (R_R) calculados para os pares de compostos que coeluíram nas condições do planejamento.....	87
Tabela 3.5. Resumo da ANOVA considerando a significância estatística da regressão e a falta de ajuste dos modelos quadráticos empregando-se a retenção relativa como resposta.....	88
Tabela 3.6. Valores de fator de “migração” (k) calculados para os 13 compostos fenólicos nas condições do planejamento.....	90
Tabela 3.7. Resumo da ANOVA considerando a significância estatística da regressão e a falta de ajuste dos modelos quadráticos empregando-se o fator de “migração” como resposta.	91
Tabela 4.1. Matriz do planejamento composto central utilizando BOR.....	109
Tabela 4.2. Valores das respostas nas condições do planejamento composto central.	115
Tabela 4.3. Resumo da ANOVA considerando a significância estatística da regressão e a falta de ajuste dos modelos quadráticos empregando-se resolução e tempo de corrida como respostas.....	116
Tabela 4.4. Coeficientes significativos para os modelos construídos empregando-se a resolução entre pares de compostos e o tempo de corrida como respostas.	117
Tabela 4.5. Figuras de mérito para a validação do método de separação de 13 compostos fenólicos em azeite de oliva.	128

RESUMO GERAL

Nos últimos anos, o interesse em relação ao consumo do azeite de oliva aumentou significativamente, em função da divulgação dos benefícios à saúde provenientes da sua ingestão. O azeite de oliva extravirgem é obtido das azeitonas somente por meios mecânicos, e a ausência de etapas posteriores de refino permite a retenção de diversos compostos minoritários, entre eles os compostos fenólicos. Além disso, possui elevado teor de ácidos graxos monoinsaturados. Este trabalho teve como objetivos empregar a técnica de Análise de Componentes Principais (PCA) para classificar as amostras de azeite de oliva extravirgem provenientes de diferentes países por meio da análise da composição em ácidos graxos por cromatografia em fase gasosa, bem como otimizar métodos para separação de 13 compostos fenólicos por eletroforese capilar (CE). Sete ácidos graxos foram determinados por cromatografia em fase gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID), e os compostos foram positivamente identificados utilizando-se espectrometria de massas. Dentre as amostras analisadas, nenhuma apresentou indícios de adulteração, considerando-se apenas a composição em ácidos graxos. Com o emprego da PCA, foi possível agrupar separadamente uma amostra de azeite proveniente da Argentina em relação às demais, além da verificação de correlações entre grupos de ácidos graxos. A mistura de 13 compostos fenólicos consistiu em tirosol, hidroxitirosol, oleuropeína glicosídeo, ácido ferrúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido cafeico, luteolina, apigenina, ácido vanílico e ácido 3,4-dihidroxibenzoico. Técnicas estatísticas multivariadas foram empregadas para otimizar a separação, como o planejamento composto central, análise de

superfície de resposta e o método de otimização simultânea de Derringer e Suich. Dois tipos de eletrólito para CE foram avaliados: tetraborato de sódio e ácido bórico. Também foram estudadas técnicas de pré-concentração *on-line* para aumentar a sensibilidade. Os procedimentos multivariados foram eficientes na determinação da condição ótima de separação, usando como respostas a resolução entre pares de compostos e o tempo de corrida. Com o uso da pré-concentração *on-line*, foi possível reduzir em 7,5 vezes o consumo de amostra e de solventes orgânicos como hexano e metanol. O método com melhor eficiência e menor tempo de corrida utilizou capilar de 50 µm d. i. x 60 cm comprimento efetivo com bulbo estendido, eletrólito ácido bórico 50 mmol L⁻¹, pH 10,2, 25°C, injeção de 50 mbar por 25 s com aplicação de voltagem inversa (-30 kV por 5 s) antes da aplicação da voltagem de corrida (+30 kV) e detecção em 210 nm, promovendo a separação em 12 min.

Palavras-chave: azeite de oliva extravirgem; ácidos graxos; compostos fenólicos; eletroforese capilar; cromatografia em fase gasosa; superfície de resposta; PCA; método Derringer e Suich; espectrometria de massas

ABSTRACT

In recent years, interest concerning olive oil consumption has increased significantly, owing to the divulgation of health benefits that come from its ingestion. Extra-virgin olive oil is obtained from olives only by mechanical means, and the absence of subsequent refinement stages allows the retention of several minor compounds, phenolic compounds being among them. Moreover, it has a high level of monounsaturated fatty acids. The aims of this work were to employ Principal Component Analysis (PCA) for classifying extra-virgin olive oil samples obtained from different countries by means of fatty acids composition analysis by gas chromatography, as well as to optimize methods for the separation of 13 phenolic compounds by capillary electrophoresis (CE). Seven fatty acids were determined by gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID), and the compounds were positively identified using mass spectrometry. Considering just the fatty acid profiles, none of the analyzed samples showed adulteration evidences. Employing PCA, it was possible to group an Argentinian sample separately from the others, as well as to verify certain correlations among fatty acids groups. The 13 phenolic compound mixture consisted of tyrosol, hydroxytyrosol, oleuropein glycoside, ferulic acid, *p*-coumaric acid, cinnamic acid, *p*-hydroxybenzoic acid, gallic acid, caffeic acid, luteolin, apigenin, vanillic acid and 3,4-dihydroxybenzoic acid. Multivariate statistical techniques were employed to optimize the separation, central composite central design, response surface analysis and Derringer and Suich's simultaneous optimization method. Two CE electrolytes were assessed: sodium tetraborate and boric acid. Preconcentration techniques were also studied to improve CE sensitivity. Multivariate procedures were efficient to

determine the optimal separation condition, using peak-pair resolution and running time as the responses. Using on-line preconcentration it was possible to reduce sample and toxic organic solvents, such as methanol and hexane, by a factor of 7,5. The method with the best efficiency and lowest running time employs a capillary column with 50 μm i. d. x 60 cm effective length with extended light path, 50 mmol L^{-1} of boric acid electrolyte, pH 10,2, 25°C, injection of 50 mbar for 25 s with application of reversed voltage (–30 kV for 5 s) before setting running voltage (+30 kV), and detection at 210 nm, performing the separation at 12 min.

Keywords: extra-virgin olive oil; fatty acids; phenolic compounds; capillary electrophoresis; gas chromatography; response surface optimization; PCA; Derringer and Suich method; mass spectrometry

INTRODUÇÃO GERAL

O azeite de oliva extravirgem é obtido do fruto das oliveiras (*Olea europaea* L.) somente por meios mecânicos, sem nenhum outro tratamento além de lavagem, filtração, decantação ou centrifugação. Assim, os componentes minoritários provenientes do fruto da oliveira permanecem no produto final, ao contrário de outros óleos vegetais que foram submetidos aos processos de refino. Graças aos estudos que demonstraram as qualidades do azeite de oliva em relação aos seus benefícios à saúde, seu consumo vem aumentando muito nos últimos anos, inclusive no Brasil. Entre os principais responsáveis por estes efeitos estariam o elevado teor de ácidos graxos monoinsaturados, a presença de ácido α -linolênico (18:3, n-3) e os compostos fenólicos, que agem como antioxidantes e seqüestradores de radicais livres (MURKOVIC et al., 2004; CARRASCO-PANCORBO et al., 2005).

O mercado de azeites de oliva no Brasil apresenta vendas de aproximadamente 32.000 toneladas, posicionando-o entre os 10 países de maior consumo no mundo. Entretanto, ainda há um grande potencial de crescimento para o azeite de oliva no país, pois o consumo *per capita* ainda é muito baixo (170 g/ano) (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES, IMPORTADORES E COMERCIANTES DE AZEITE DE OLIVA, 2010).

Embora muito modestas, existem hoje no Brasil algumas tentativas no que se refere ao cultivo de oliveiras para a posterior produção de azeite de oliva nacional. A EMBRAPA Clima Temperado (Pelotas-RS) está desenvolvendo um projeto chamado Introdução e Desempenho Agronômico de Cultivares de Oliveiras no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina (EMBRAPA, 2008). A extração do azeite de oliva das azeitonas produzidas em Dom Pedrito

(RS) foi realizada no INIA (*Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria*), no Uruguai. A EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais) está produzindo azeite de oliva extravirgem na Fazenda Experimental de Maria da Fé (FEMF), no sul de Minas Gerais. A primeira extração de azeite de oliva extravirgem no Brasil foi feita na EPAMIG/Maria da Fé, em fevereiro de 2008 (EPAMIG, 2008).

A principal característica do azeite de oliva é a abundância de ácido oleico (18:1, n-9), que varia entre 55 e 83% do total de ácidos graxos (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005; SERVILI et al., 2009). Este elevado teor de ácido oleico o torna menos susceptível à oxidação, o que colabora para sua estabilidade (OWEN et al., 2000). Em função do elevado valor agregado do produto, adulterações do azeite de oliva extravirgem são bastante recorrentes, e a composição em ácidos graxos pode ser empregada como um dos parâmetros em estudos de verificação de adulterações, pois é uma característica dos diferentes óleos vegetais.

Na análise de compostos fenólicos em azeite de oliva virgem são necessárias poderosas técnicas de separação e quantificação. A eletroforese capilar pode representar um bom compromisso entre tempo de análise e caracterização satisfatória para algumas classes de compostos fenólicos do azeite de oliva. A velocidade, resolução e simplicidade da eletroforese capilar, combinadas aos baixos custos de operação e praticamente ausência de resíduos gerados, tornam a técnica uma opção atrativa para o desenvolvimento de métodos para análise de compostos fenólicos em azeite de oliva (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005; GÓMEZ-CARAVACA et al., 2005).

Dada a importância dos compostos fenólicos presentes no azeite de oliva, o desenvolvimento e a validação de metodologias analíticas, bem como estudos que determinem a composição e a quantidade dos mesmos são de fundamental importância frente ao crescente interesse da população no consumo desse produto no Brasil. No momento, praticamente inexistem estudos que tenham determinado a composição de compostos fenólicos nos azeites de oliva comercializados no país. O emprego de eletroforese capilar para este tipo de análise vem crescendo na comunidade científica, mas estudos de desenvolvimento e otimização de metodologias para compostos fenólicos em azeite de oliva ainda não foram realizados no Brasil.

Assim, os objetivos deste trabalho foram otimizar e validar uma metodologia para análise de compostos fenólicos em azeite de oliva extravirgem por eletroforese capilar. Os compostos fenólicos estudados foram tirosol, hidroxitirosol, ácido gálico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido cinâmico, ácido ferrúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, luteolina, apigenina e oleuropeína glicosídeo, sendo este último pertencente à classe dos secoiridóides, característica do fruto da oliveira e do azeite de oliva. Além disso, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (PCA), utilizando os dados da composição em ácidos graxos obtidos por cromatografia em fase gasosa, para avaliar a possibilidade de classificação das amostras provenientes de diferentes países.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES, IMPORTADORES E

COMERCIANTES DE AZEITE DE OLIVA. Disponível em:

<<http://oliva.org.br/index.asp>>. Acesso em: 03 de janeiro de 2010.

CARRASCO-PANCORBO, A.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; SEGURA-

CARRETERO, A.; GALLINA-TOSCHI, T.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.

Analytical determination of polyphenols in olive oils. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 837-858, 2005.

EMBRAPA. Introdução e Desempenho Agronômico de Cultivares de Oliveiras

no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina. Disponível em:

<http://www.cpact.embrapa.br/programas_projetos/projetos/oliveiras/>

Acesso em: 28 set. 2008.

EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais). Deputados

Estaduais vão conhecer pesquisas da EPAMIG sobre azeitonas e a

produção de azeite no Sul. Disponível em: <<http://www.epamig.br>> Acesso

em: 28 set. 2008.

GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; CARRASCO-PANCORBO, A.; CAÑABATE-DÍAZ,

B.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.

Electrophoretic identification and quantitation of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil. **Electrophoresis**, v. 26, p.

3538-3551, 2005.

MURKOVIC, M.; LECHNER, S.; PIETZKA, A.; BRATACOS, M.;

KATZOGIANNOS, E. Analysis of minor components in olive oil. **Journal of**

Biochemical and Biophysical Methods, v. 61, p. 155-160, 2004.

OWEN, R. W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; HAUBNER, R.; WÜRTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. **The Lancet Oncology**, v. 1, p. 107-112, 2000.

SERVILI, M.; ESPOSTO, S.; FABIANI, R.; URBANI, S.; TATICCHI, A.; MARIUCCI, F.; SELVAGGINI, R.; MONTEDORO, G. F. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. **Inflammopharmacology**, v. 17, p. 76-84, 2009.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

COMPOSTOS FENÓLICOS EM AZEITE DE OLIVA EXTRAVIRGEM: PROPRIEDADES, BENEFÍCIOS À SAÚDE E MÉTODOS DE ANÁLISE

Cristiano Augusto Ballus, Helena Teixeira Godoy

**Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de
Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121,
13083-862, Campinas, SP, Brasil**

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Azeite de Oliva – Definição

A oliveira (*Olea europaea* L.), conforme é conhecida atualmente, teve sua origem há cerca de 5.000 anos na região que hoje corresponde à antiga Pérsia e Mesopotâmia. Posteriormente, a oliveira se espalhou a partir destes países para os territórios mais próximos que hoje correspondem à Síria e à Palestina (HARWOOD & APARICIO, 2000).

O azeite de oliva virgem é único entre os diferentes tipos de óleos vegetais, pois é obtido do fruto das oliveiras (*Olea europaea* L.) somente por meios mecânicos. Este tipo de processamento retém os compostos minoritários originalmente presentes no fruto da oliveira, diferentemente de outros óleos vegetais, onde estes compostos geralmente são removidos durante as diferentes etapas de refino (CARRASCO-PANCORBO et al., 2004; CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b). O fruto da oliveira (azeitona) é classificado como uma drupa, sendo que o mesocarpo responde por 70-90% do peso total, o endocarpo por 9-27% e a semente por 2-3%. O mesocarpo contém cerca de 30% de óleo, e a semente é constituída por 27% de óleo. O óleo proveniente do mesocarpo corresponde a mais de 95% do óleo total extraído do fruto (CONDE, DELROT & GERÓS, 2008).

A legislação brasileira define azeite de oliva virgem como o produto obtido do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.) somente por processos mecânicos ou outros meios físicos, em condições térmicas que não produzam alteração do azeite, e que não tenha sido submetido a outros tratamentos além de lavagem, decantação, centrifugação e filtração (BRASIL, 2005). Essa

definição está de acordo com as diretrizes do Codex Alimentarius para o azeite de oliva (CODEX STAN 33, 2009). A **Tabela 1.1** traz a classificação do azeite de oliva conforme os limites máximos para alguns parâmetros físico-químicos.

Tabela 1.1. Classificação do azeite de oliva.

Classificação	Acidez em Ácido Oleico (g/100 g)	Índice de Peróxidos (meq/kg)
Azeite de Oliva Extravirgem	Máximo 0,8	-
Azeite de Oliva Virgem	Máximo 2,0	Máximo 20,0
Azeite de Oliva	Máximo 1,0	Máximo 15,0
Azeite de Oliva Refinado	Máximo 0,3	Máximo 5,0

Fonte: BRASIL, 2005; CODEX STAN 33, 2009.

A produção mundial de azeite de oliva é de aproximadamente 2,5 milhões de toneladas, sendo Espanha, Itália, Grécia e Portugal os maiores produtores (MURKOVIC et al., 2004; SONI et al., 2006). Os países do Mediterrâneo produzem 98% de todo o azeite de oliva comercializado no mundo. Para alguns países como a Tunísia, a importância econômica da exportação de azeite de oliva chega a 38% (HARWOOD & APARICIO, 2000). O mercado de azeite de oliva no Brasil apresenta vendas de aproximadamente 32.000 toneladas, similar ao Japão e superior à Austrália e ao Canadá. O Brasil está posicionado entre os 10 países de maior consumo no mundo. O aumento contínuo desse mercado demonstra que, cada vez mais, o brasileiro aprecia as características únicas do azeite de oliva. Diversos tipos de azeites, provenientes principalmente de Portugal, Itália, Espanha e Argentina, são comercializados no Brasil. Entretanto, há um grande potencial de crescimento para o azeite de oliva no país, pois o consumo *per capita* ainda é muito baixo

(170 g/ano), em comparação aos gregos que consomem 25 kg/ano e aos italianos e espanhóis com 12 kg/ano. Em termos do tipo de azeite de oliva consumido, a participação de mercado do azeite extravirgem representa 37% do consumo no Brasil e Austrália, 50% no Japão, 54% nos EUA, 61% no Canadá, 78% na Itália e 85% na Grécia (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES, IMPORTADORES E COMERCIANTES DE AZEITE DE OLIVA, 2010).

1.2. Azeite de Oliva e Saúde

Nos últimos 30 anos o interesse no uso culinário do azeite de oliva vem aumentando, principalmente pelas virtudes da dieta mediterrânea e seus efeitos benéficos à saúde, provenientes em grande parte do consumo de azeite de oliva (SERVILI & MONTEDORO, 2002; CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b). É importante mencionar, entretanto, que se deve tomar cuidado com o termo “dieta mediterrânea”, já que não há uma única, mas sim várias “dietas mediterrâneas”, visto que os países ao longo do Mediterrâneo possuem diferentes religiões, tradições econômicas e culturais, e a dieta é afetada por todos estes fatores (SIMOPOULOS, 2001).

Existe uma significativa correlação entre as dietas mediterrâneas e uma redução nas taxas de mortalidade por diversas causas, além dos efeitos favoráveis desta dieta sobre os níveis das lipoproteínas, vasodilatação, resistência à insulina, capacidade antioxidante e síndrome metabólica. Os estudos indicam que há nove componentes de grande importância nas dietas mediterrâneas: elevada razão de ácidos graxos monoinsaturados/saturados (derivada do alto consumo de azeite de oliva); consumo moderado de etanol

(principalmente vinho); elevado consumo de legumes; alto consumo de cereais (principalmente cereais não refinados e pães); alto consumo de frutas; elevado consumo de vegetais; baixo consumo de carne e produtos cárneos; consumo moderado de leite e produtos lácteos; elevado consumo de peixe e produtos derivados (SAURA-CALIXTO & GOÑI, 2009).

Radicais livres e outros compostos reativos são gerados por substâncias químicas exógenas ou processos metabólicos endógenos em alimentos ou no corpo humano. Estes radicais podem causar danos oxidativos, os quais possuem um papel patológico importante em algumas doenças humanas como aterosclerose, câncer e artrite (ZULLO & CIAFARDINI, 2008). Acredita-se que os componentes do azeite de oliva presente na dieta mediterrânea, a qual é basicamente vegetariana por natureza, podem contribuir para a menor incidência de doenças coronárias e câncer de cólon e de próstata. A dieta mediterrânea inclui o consumo elevado de azeite de oliva, o qual contém grandes quantidades de substâncias fenólicas. Estes compostos fenólicos são fortes antioxidantes e seqüestradores de radicais livres (OWEN et al., 2000a; BENKHALTI et al., 2002; MURKOVIC et al., 2004; PERONA, CABELLO-MORUNO & RUIZ-GUTIERREZ, 2006; SÁNCHEZ et al., 2007; LEE et al., 2008). Os compostos fenólicos do azeite de oliva também atuam como agentes anti-inflamatórios, antivirais e anticarcinogênicos. Assim, os frutos da oliveira e seus derivados podem ser considerados uma fonte potencial de antioxidantes naturais, os quais poderiam ser usados pela indústria de alimentos e farmacêutica (SAVARESE, DE MARCO & SACCHI, 2007).

1.3. Composição Química do Azeite de Oliva

A composição química do azeite de oliva consiste em componentes majoritários e minoritários. Os triacilgliceróis respondem por 98% do peso total. A principal característica do azeite de oliva é a abundância de ácido oleico (18:1, n-9), que varia entre 55 e 83% do total de ácidos graxos (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b; SERVILI et al., 2009). Este elevado teor de ácido oleico é importante porque ele é menos susceptível à oxidação do que os ácidos graxos poli-insaturados que predominam em outros óleos, o que colabora para sua estabilidade (OWEN et al., 2000b). A elevada proporção de ácido oleico ajuda a diminuir os níveis de colesterol LDL (*“low-density lipoprotein”*) e aumentar os níveis de colesterol HDL (*“high-density lipoprotein”*) no sangue. Isto é extremamente importante, visto que as lipoproteínas HDL transportam o colesterol das artérias para o fígado, enquanto que as lipoproteínas LDL transportam o colesterol a partir do fígado, depositando-o nas artérias, onde pode causar aterosclerose e, assim, aumentar o risco de doenças cardiovasculares. O azeite de oliva é considerado um alimento funcional, pois além do elevado teor de monoinsaturados também possui outros componentes minoritários com importantes propriedades biológicas. Alguns compostos fenólicos e o ácido α -linolênico (18:3, n-3) colaboram para reduzir o risco de doenças do coração, diminuir a pressão sanguínea e proteger contra a formação de placas nas artérias (COVAS, 2007; CONDE, DELROT & GERÓS, 2008; CICERALE et al., 2009).

A adulteração do azeite de oliva com vários óleos vegetais é um problema comum, afetando a qualidade e o valor comercial do produto. Esta prática é um abuso comercial do azeite de oliva e causa uma grande perda do

valor econômico do produto. Os principais critérios de pureza para azeites de oliva baseiam-se principalmente no teor de ácidos graxos livres, na extinção específica, na composição em ácidos graxos e na composição de esteróis (DOURTOGLOU et al., 2003). Assim, verifica-se que a composição em ácidos graxos pode ser útil, quando usada em conjunto com outros parâmetros, para determinar possíveis adulterações do azeite de oliva. O Codex Alimentarius especifica os limites legais para os ácidos graxos encontrados no azeite de oliva, a serem determinados por cromatografia em fase gasosa (CODEX STAN 33, 2009).

Os componentes minoritários perfazem os 2% restantes do peso total do azeite de oliva. São mais de 230 compostos químicos, como álcoois triterpênicos e alifáticos, esteróis, hidrocarbonetos, compostos voláteis e antioxidantes (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b). Os compostos voláteis mais abundantes são aldeídos com seis átomos de carbono [hexanal, 3(*Z*)-hexenal e 2(*E*)-hexenal] e alcoóis [hexanol, 3(*Z*)-hexenol e 2(*E*)-hexenol], e seus acetil ésteres [hexil acetato e 3(*Z*)-hexenil acetato], os quais representam 80% dos compostos voláteis totais, sendo 2(*E*)-hexenal o composto mais proeminente (CONDE, DELROT & GERÓS, 2008).

Os principais antioxidantes são carotenóides e os compostos fenólicos, incluindo fenólicos lipofílicos e hidrofílicos. Entre os fenóis lipofílicos estão os tocoferóis, os quais em sua maioria podem ser encontrados em outros óleos vegetais, enquanto que alguns fenóis hidrofílicos do azeite de oliva não são comumente encontrados em outros óleos (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b). A presença de compostos fenólicos hidrofílicos no azeite de oliva virgem e sua elevada atividade antioxidante podem ser explicadas pelo

“paradoxo polar”, o qual diz que “antioxidantes polares são mais efetivos em lipídeos não polares, enquanto que antioxidantes não polares são mais ativos em emulsões de lipídeos polares”. Em sistemas oleosos os antioxidantes hidrofílicos, como os fenóis polares, são orientados para a interface ar-óleo (uma pequena quantidade de ar sempre está presa dentro do óleo) e tornam-se mais efetivos contra a oxidação do que os antioxidantes lipofílicos, como os tocoferóis, os quais permanecem em solução no óleo (BENDINI et al., 2007). É importante mencionar que, mesmo o fruto da oliveira sendo rico em compostos fenólicos, apenas 2% do conteúdo total é transferido para a fase oleosa, enquanto que os 98% restantes se dividem entre a água residual e a fase sólida, resultantes do processo de prensagem. Estes resíduos estão sendo estudados como fonte de extratos ricos em compostos antioxidantes, de modo a agregar valor aos subprodutos e reduzir o impacto ambiental (DEJONG & LANARI, 2009; RODRÍGUEZ et al., 2009).

1.4. Compostos Fenólicos em Azeite de Oliva

O clima distinto da bacia mediterrânea, caracterizado por tempo quente e irradiação prolongada de luz solar, permitiu o desenvolvimento de plantas, tais como as oliveiras, cujos frutos precisam de uma elevada proporção de moléculas antioxidantes. A síntese de compostos fenólicos como antocianinas, flavonóides e ácidos fenólicos, de fato, é ativada pela irradiação de luz branca, e resulta em frutos de coloração escura que, assim, protegem a si mesmos dos efeitos nocivos da prolongada exposição à luz solar (VISIOLI, BELLOMO & GALLI, 1998; VISIOLI & GALI, 2002). Os compostos fenólicos também agem nas plantas como antimicrobianos, fotorreceptores, atrativos visuais e

repelentes de predadores, como herbívoros (PIETTA, 2000; NICHENAMETLA et al., 2006).

Os compostos fenólicos possuem um importante papel na qualidade do azeite de oliva, visto que contribuem significativamente para a estabilidade oxidativa do óleo. Além disso, os fenólicos são os principais responsáveis pelo sabor amargo, adstringência e pungência do azeite de oliva (RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, APETREI & DE SAJA, 2008; INAREJOS-GARCIA et al., 2009). Em geral, assume-se que os responsáveis pelo estímulo “pungente” e “amargo” do azeite de oliva virgem sejam os compostos tirosol, hidroxitirosol e seus derivados (ESTI et al., 2009; SERVILI, et al., 2009). O azeite de oliva virgem apresenta uma notável resistência à oxidação, a qual tem sido relacionada à sua composição em ácidos graxos e aos elevados níveis de antioxidantes naturais, tais como os compostos fenólicos hidrofílicos e lipofílicos (PAPADIMITRIOU et al., 2006).

Existem ao menos 36 compostos fenólicos hidrofílicos estruturalmente distintos já identificados no azeite de oliva virgem. Nem todos os fenólicos estão presentes em cada azeite de oliva virgem, e há variação na concentração de fenólicos entre os azeites de oliva virgem (CICERALE et al., 2009). Basicamente, costuma-se agrupar os compostos fenólicos nas seguintes categorias: 1) fenóis, ácidos fenólicos e ácidos fenilacéticos; 2) ácidos cinâmicos, cumarinas, isocumarinas e cromonas; 3) lignanas; 4) dez grupos de flavonóides; 5) ligninas; 6) taninos; 7) benzofenonas, xantonas e estilbenos; 8) quinonas; 9) betacianinas. A maioria dos compostos fenólicos é encontrada na natureza em uma forma conjugada, principalmente com moléculas de açúcares (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b). A glicosilação dos compostos

fenólicos resulta em menor atividade antioxidante do que aquela apresentada pela aglicona correspondente (HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; CHOE & MIN, 2009).

Os compostos fenólicos já identificados e quantificados em azeite de oliva pertencem às classes de fenil-etil-álcoois (como hidroxitirosol e tirosol), ácidos fenólicos (como o ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, etc.), lignanas [(+)-pinoresinol e (+)-1-acetoxipinoresinol], secoiridóides (vários derivados agliconas da oleuropeína e ligstrosídeo) e flavonóides (luteolina e apigenina) (CARRASCO-PANCORBO et al., 2006a). A **Figura 1.1** ilustra alguns dos compostos fenólicos já encontrados em azeite de oliva virgem.

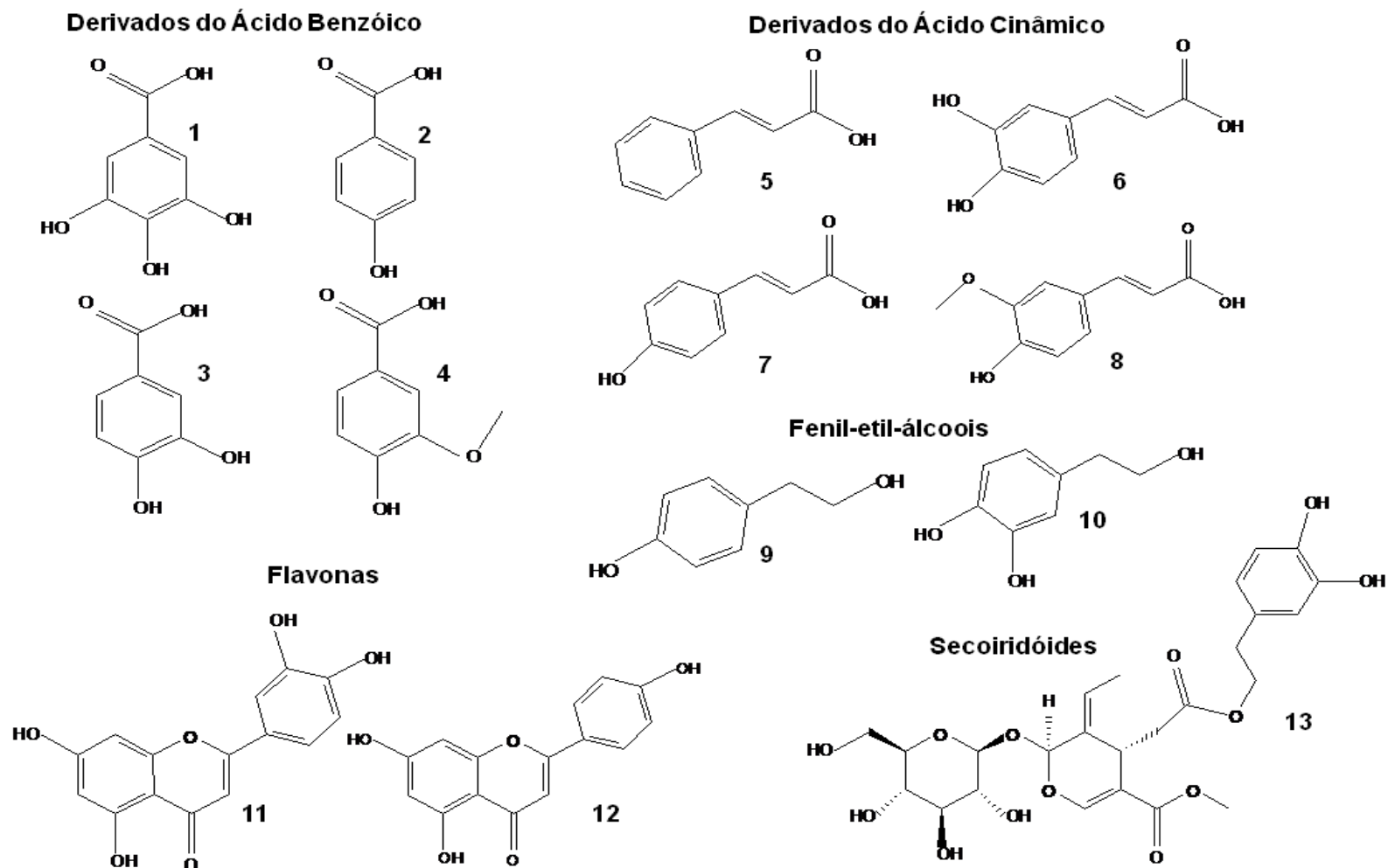


Figura 1.1. Estruturas de alguns compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva virgem. Identificação: 1) Ácido Gálico; 2) Ácido *p*-hidroxibenzoico; 3) Ácido 3,4-dihidroxibenzoico; 4) Ácido Vanílico; 5) Ácido Cinâmico; 6) Ácido Cafeico; 7) Ácido *p*-cumárico; 8) Ácido Ferrúlico; 9) Tiroso; 10) Hidroxitiroso; 11) Luteolina; 12) Apigenina; 13) Oleuropeína Glicosídeo.

Entre os compostos fenólicos mencionados, aqueles pertencentes à classe dos secoiridóides são característicos dos frutos da oliveira e do azeite de oliva virgem produzido a partir destes (OBIED et al., 2008). Em particular, eles são formados pela esterificação de um fenil-etil-álcool (hidroxitirosol ou tirosol) com o ácido elenólico. Eventualmente podem exibir açúcares glicosilados ao ácido elenólico. A aglicona oleuropeína e seus derivados (*o*-difenois) estão presentes em grande quantidade no azeite de oliva virgem e possuem uma comprovada atividade contra radicais livres. Durante a prensagem e a malaxagem, os secoiridóides glicosídeos presentes no fruto da oliveira são hidrolisados pelas β -glicosidases endógenas, liberando as agliconas. Estas possuem características anfifílicas e sofrem partição entre a camada oleosa e a água do fruto. Durante a estocagem, reações hidrolíticas podem promover a liberação de hidroxitirosol e tirosol a partir dos secoiridóides mais complexos. Através do seqüestro de radicais livres, o qual resulta na interrupção das reações em cadeia da fase de propagação da oxidação, estas moléculas exibem um importante papel no aumento da vida-de-prateleira do azeite de oliva (GALLINA-TOSCHI et al., 2005; BENDINI et al., 2007; CONDE, DELROT & GERÓS, 2008). Hidroxitirosol e oleuropeína exibiram atividade antioxidante mais efetiva do que os tocoferóis e alguns antioxidantes sintéticos aprovados para uso em alimentos, como o butil hidroxitolueno (BHT) (MEDINA et al., 1999; BENDINI et al., 2007).

Tirosol, hidroxitirosol e seus derivados secoiridóides respondem por cerca de 90% do teor total de fenólicos do azeite de oliva virgem. Hidroxitirosol é o fenólico antioxidante mais potente do azeite de oliva, cuja atividade biológica tem estimulado pesquisas sobre o seu provável papel na proteção

cardiovascular (OWEN et al., 2000b; O'DOWD et al., 2004; DE LA TORRE, 2008; BROUK & FISHMAN, 2009; CHOE & MIN, 2009).

Compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas, com uma grande diversidade estrutural e uma ampla distribuição filogenética (VINHA et al., 2005; BOUDET, 2007). Dentre suas diferentes ações, os compostos fenólicos são antioxidantes que impedem as reações em cadeia da fase de propagação da oxidação lipídica ao doarem um átomo de hidrogênio para o radical lipídico (MENDOZA-WILSON & GLOSSMAN-MITNIK, 2006; SAMANIEGO SÁNCHEZ et al., 2007). O radical fenoxil resultante é estabilizado pela delocalização do par de elétrons por ressonância. Os compostos fenólicos são aptos a seqüestrar radicais peroxil e alcóxil, além de quelarem íons de metais de transição presentes em quantidades traço, o que dificulta a fase de iniciação da oxidação (HEIM, TAGLIAFERRO & BOBILYA, 2002; BENDINI et al., 2007; ZHAO & MOGHADASIAN, 2008). Tiroso e hidroxitiroso seqüestram radicais livres através de um mecanismo similar ao dos tocoferóis, através da transferência de hidrogênio. Os hidrogênios fenólicos do tiroso e do hidroxitiroso são transferidos aos radicais do alimento, com a produção de radicais semiquinonas. Os radicais semiquinonas do tiroso e do hidroxitiroso podem seqüestrar outros radicais do alimento, transformando-se em quinonas, ou sofrerem reação de desproporcionamento com outros radicais semiquinonas para reconstituir os fenólicos originais e liberar quinonas, ou reagirem com o oxigênio para produzir quinonas e radicais hidroperóxil (CHOE & MIN, 2009).

Os flavonóides precisam de características estruturais especiais para seqüestrar radicais livres: grupo *o*-dihidroxil no anel B e conjugação da dupla

ligação entre as posições 2,3 do anel B ao grupo oxo na posição 4 do anel C (RICE-EVANS, MILLER & PAGANGA, 1996; PANNALA et al., 2001; FERNANDEZ-PANCHON et al., 2008; CHOE & MIN, 2009). Quercetina, rutina e luteolina satisfazem estes requerimentos e são conhecidas como alguns dos mais eficientes seqüestradores de radicais livres entre os fenóis não-vitamínicos das plantas (CHOE & MIN, 2009). Compostos com grupo funcional *o*-dihidroxil apresentam alta atividade antioxidante em função da formação de ligações de hidrogênio intramoleculares durante a reação com os radicais livres. A presença de apenas um grupo hidroxila ligado ao anel benzênico confere somente uma limitada atividade antioxidante. Além disso, substituintes doadores de elétrons na posição “*orto*” enfraquecem a ligação oxigênio–hidrogênio (O–H) do fenol, proporcionando maior estabilidade ao radical fenoxil (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005a; SERVILI et al., 2009). Apesar de sua atividade antioxidante mais fraca quando comparado ao hidroxitirosol, o tirosol foi efetivo ao preservar as defesas antioxidantes das células, possivelmente devido à sua acumulação intracelular (BENEDETTO et al., 2007).

A quantidade e a composição da fração fenólica estão relacionadas ao cultivar de oliveira, à região geográfica, aos métodos de cultivo, ao grau de amadurecimento e à tecnologia de extração. A avaliação das variáveis tecnológicas é de grande interesse, de modo a maximizar o teor de fenólicos no azeite de oliva virgem. A forma de estocagem do azeite de oliva virgem (garrafas transparentes ou não, incidência de luz, temperatura, tempo de estocagem) pode promover a redução no teor de alguns compostos fenólicos, assim como o emprego de temperaturas elevadas no preparo de frituras (OKOGERI & TASIOULA-MARGARI, 2002; AGUILERA et al., 2005; BELTRÁN

et al., 2005; GALLINA-TOSCHI et al., 2005; TURA et al., 2007; CICERALE et al., 2009; LERMA-GARCÍA et al., 2009; VEILLET et al., 2009). Conforme demonstrado por Brenes et al. (2001), a principal alteração na composição dos fenólicos durante a estocagem no escuro à 30°C foi a hidrólise dos secoiridóides agliconas, produzindo um aumento no teor de fenólicos livres, como hidroxitirosol e tirosol. Em contraste, a concentração de lignanas como 1-acetoxipinoresinol e pinoresinol permaneceu constante durante a estocagem. Campanella et al. (2008) concluíram que a temperatura na qual o azeite de oliva é utilizado é um fator crucial para o tempo máximo de estabilidade em que ele pode ser empregado com segurança para o preparo de alimentos.

Considerando-se a importância dos compostos fenólicos para o azeite de oliva virgem, deve-se notar o fato de que esta classe de compostos ainda não foi completamente caracterizada, devido à complexidade da sua natureza química e à complexidade da matriz onde eles são encontrados (BENDINI et al., 2007).

1.4.1. Análise de Compostos Fenólicos em Azeite de Oliva

1.4.1.1. Extração dos Compostos Fenólicos

As formas glicosiladas dos compostos fenólicos presentes nos frutos da oliveira em geral não são encontrados no azeite de oliva, apenas suas agliconas (HARWOOD & APARICIO, 2000; BENDINI et al., 2007).

No que se refere ao processo de extração dos compostos fenólicos do azeite de oliva virgem, duas principais técnicas foram reportadas na literatura:

extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE) (TURA & ROBARDS, 2002).

O solvente mais usado para LLE é o metanol, misturado com diferentes níveis de água que variam entre 0 e 40%. Após a partição, o solvente é evaporado, e o resíduo é ressuspenso em um volume conhecido e então filtrado. Alguns métodos de LLE adicionam um solvente lipofílico ao óleo antes da partição com metanol/água. O solvente mais usado é o hexano, mas éter de petróleo e clorofórmio também já foram propostos (PIRISI et al., 2000; SERVILI et al., 2004; CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b). Diversos trabalhos utilizaram LLE como técnica de extração dos compostos fenólicos do azeite de oliva virgem e das azeitonas (MONTEDORO et al., 1992a; MONTEDORO et al., 1992b; MONTEDORO et al., 1993; BENDINI et al., 2003; BONOLI et al., 2003; BONOLI et al., 2004; CARRASCO-PANCORBO et al., 2004; HRNCIRIK & FRITSCHÉ, 2004; MURKOVIC et al., 2004; GALLINA-TOSCHI et al., 2005; GÓMEZ-CARAVACA et al., 2005; BENDINI et al., 2006; OBIED et al., 2007; SAVARESE, DE MARCO & SACCHI, 2007; CHRISTOPHORIDOU & DAIS, 2009).

No caso da SPE, bons resultados foram obtidos utilizando-se uma fase sólida de C_{18} , mas apenas para fenólicos mais simples. Entretanto, no caso dos derivados de secoiridóides, a recuperação foi muito baixa (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b). Em um estudo comparativo das duas técnicas de extração, Bendini et al. (2003) demonstraram que a LLE proporcionou os melhores resultados de recuperação para uma mistura de 15 padrões de compostos fenólicos, adicionados à óleo de amendoim refinado. Para amostras de azeite de oliva virgem, tanto LLE quanto SPE mostraram elevadas

recuperações das principais classes de compostos, com desempenho equivalente. Porém, em termos de custo, a LLE é mais acessível. Experimentos conduzidos por Hrnčirik & Fritsche (2004) revelaram que o emprego de SPE produziu resultados ambíguos, o que não ocorreu com a LLE. A técnica de SPE foi utilizada em inúmeros trabalhos da literatura (BENDINI et al., 2003; HRNČIRIK & FRITSCHÉ, 2004; GÓMEZ-CARAVACA et al., 2005; TORRE-CARBOT et al., 2005; CARRASCO-PANCORBO et al., 2006a; CARRASCO-PANCORBO et al., 2006b; CARRASCO-PANCORBO et al., 2009).

Para análise dos compostos fenólicos nos frutos da oliveira, uma etapa de hidrólise foi incluída para minimizar interferências na etapa de separação (cromatográfica ou não) e para simplificar os dados, principalmente quando os padrões apropriados não estavam disponíveis comercialmente. A hidrólise ácida é a abordagem tradicional para medição das agliconas e ácidos fenólicos a partir dos flavonóides glicosilados e ésteres de ácidos fenólicos, respectivamente (TURA & ROBARDS, 2002; CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b).

1.4.1.2. Separação e Quantificação dos Compostos Fenólicos

Para a separação e determinação de compostos fenólicos individuais nos extratos de azeite de oliva obtidos através de LLE ou SPE, normalmente utiliza-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção no ultravioleta (UV), eletroquímica, por fluorescência ou por espectrometria de massas (MS) (MERKEN & BEECHER, 2000; CARRASCO-PANCORBO et al., 2006a).

A cromatografia em fase gasosa (GC) possui as vantagens de menores limites de detecção e maior eficiência de separação, comparada à técnica de HPLC. O acoplamento GC/MS permite a obtenção direta de informações qualitativas, através do espectro de massas, sendo o modo mais simples de identificar compostos fenólicos (SAITTA et al., 2009). Porém, a análise por cromatografia em fase gasosa não é muito utilizada, em função da necessidade de uma etapa de derivatização, já que os compostos fenólicos possuem baixa volatilidade (CARRASCO-PANCORBO et al., 2006a).

A maioria dos trabalhos na literatura determina o teor de fenólicos totais em azeite de oliva através de análise espectrofotométrica e caracterizam o perfil de compostos fenólicos por cromatografia em fase gasosa (GC) ou, principalmente, por HPLC em fase reversa (RP-HPLC). Apesar do sucesso da técnica de HPLC para análise de compostos fenólicos, a mesma precisa de um acurado preparo de amostra e, geralmente, possui um tempo de análise demorado, devido à complexidade da matriz. A análise de compostos fenólicos em azeite de oliva por HPLC pode demorar mais de 90 minutos (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b). Diversos trabalhos empregaram HPLC para a análise de compostos fenólicos em azeite de oliva virgem (MONTEDORO et al., 1992a; MONTEDORO et al., 1992b; MONTEDORO et al., 1993; PIRISI et al., 1997; BENDINI et al., 2003; BONOLI et al., 2004; HRNCIRIK & FRITSCHÉ, 2004; WANG & HUANG, 2004; GALLINA-TOSCHI et al., 2005; BENDINI et al., 2006; SAVARESE, DE MARCO & SACCHI, 2007).

A espectrometria de massas acoplada à cromatografia líquida (LC/MS) tem sido amplamente aceita como a principal ferramenta na identificação, caracterização estrutural e análise quantitativa dos compostos fenólicos em

azeite de oliva. O emprego do espectrômetro de massas para a detecção oferece inegáveis vantagens, como a independência em relação à presença de cromóforos, limites de detecção menores que o UV na maioria dos casos, a possibilidade de obtenção de informação estrutural e fácil separação de picos que coeluem, utilizando-se as informações de m/z (massa/carga) como uma segunda dimensão. A sensibilidade depende da interface utilizada. Na análise de compostos fenólicos por LC/MS, as fontes de APCI (*“Atmospheric Pressure Chemical Ionization”*) e ESI (*“Electrospray”*) são as mais utilizadas, em modo positivo e negativo. De modo geral, os compostos fenólicos são detectados com grande sensibilidade no modo negativo, mas o modo positivo apresenta fragmentos com significativa informação estrutural. Os resultados de ambos os modos são complementares. Diversos analisadores de m/z podem ser empregados, como Quadrupolo (Q) e Tempo de Voo (TOF), assim como a espectrometria de massas seqüencial (MS^n), onde temos como exemplo o Triplo Quadrupolo (QqQ) e o *“Ion Trap”* (IT), entre outros (LAFONT et al., 1999; STOBIECKI, 2000; MURKOVIC et al., 2004; TORRE-CARBOT et al., 2005; BENDINI et al., 2006; BENDINI et al., 2007; SAVARESE, DE MARCO & SACCHI, 2007).

Técnicas espectroscópicas de alta resolução, e particularmente as espectroscopias de ressonância magnética (NMR) e no infravermelho (IR) foram empregadas de maneira eficaz para a análise de vários extratos contendo compostos fenólicos de alimentos. A aplicação da NMR é restrita no caso de misturas complexas, mas ela já vem sendo usada em acoplamento às técnicas de separação. A caracterização estrutural obtida por NMR é fundamental para uma identificação conclusiva, principalmente na

determinação da estrutura de compostos ainda não estudados (MONTEDORO et al., 1993; LIMIROLI et al., 1996; OWEN et al., 2003; BENDINI et al., 2007; CHRISTOPHORIDOU & DAIS, 2009).

Nos últimos anos, a eletroforese capilar (CE) mostrou-se uma técnica rápida, permitindo a combinação de tempos de análise curtos e alta eficiência de separação para a análise dos componentes dos alimentos, particularmente para os compostos fenólicos de azeite de oliva extravirgem (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2005).

A maioria dos métodos desenvolvidos para a análise de compostos fenólicos por CE empregam metodologias simples de eletroforese capilar de zona (CZE), com base em um tampão borato em pH alcalino. De acordo com a literatura, o modo de operação mais eficiente para separar compostos fenólicos tem sido a CZE com tampão borato, mas métodos de cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) com tampão borato ou fosfato e dodecilsulfato de sódio (SDS) como agente micelar também estão sendo empregados (MORIN, VILLARD & DREUX, 1993a; MORIN, VILLARD & DREUX, 1993b; MAMAN et al., 1996; JÁC, POLÁSEK & POSPÍSILOVÁ, 2006). Em resumo, a separação por CZE é baseada na migração diferencial de compostos ionizados (causada pelas diferenças na sua relação m/z) em um líquido condutor acondicionado em um capilar, sob a influência de um campo elétrico produzido por alta voltagem (JÁC, POLÁSEK & POSPÍSILOVÁ, 2006).

A CE pode representar um bom compromisso entre tempo de análise e caracterização satisfatória para algumas classes de compostos fenólicos do azeite de oliva. A velocidade, resolução e simplicidade da CE, combinadas aos baixos custos de operação, tornam a técnica uma opção atrativa para o

desenvolvimento de métodos aperfeiçoados de análise de alimentos (LIMA, DUARTE & ESTEVES, 2007). A eletroforese capilar é caracterizada pela alta eficiência de separação, pequeno volume de amostra, baixo consumo de eletrólito e a separação ocorre em um tempo reduzido. Esta última característica é a principal vantagem em relação às técnicas cromatográficas, o que torna a CE muito útil para análises de rotina. A técnica pode ser acoplada a diferentes detectores (UV, MS) (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b). Inúmeros estudos utilizaram CE para avaliar a composição de compostos fenólicos em azeite de oliva virgem (BENDINI et al., 2003; BONOLI et al., 2003; BONOLI et al., 2004; CARRASCO-PANCORBO et al., 2004; PRIEGO-CAPOTE, RUIZ-JIMÉNEZ & DE CASTRO, 2004; WANG & HUANG, 2004; GÓMEZ-CARAVACA et al., 2005; CARRASCO-PANCORBO et al., 2006a; CARRASCO-PANCORBO et al., 2006b; CARRASCO-PANCORBO et al., 2009).

1.4.2. Emprego de Técnicas Multivariadas para a Otimização de Métodos de Separação

Uma análise cromatográfica ou eletroforética geralmente envolve três etapas: preparo de amostra, separação dos compostos e quantificação dos compostos. Destas, as etapas de preparo de amostra e separação dos compostos podem ser otimizadas empregando-se técnicas estatísticas multivariadas. Os planejamentos mais comumente utilizados para determinar a superfície de resposta são os planejamentos fatoriais completos e fracionários e, os mais complexos, composto central, Box-Behnken, Doehlert e planejamento de misturas (FERREIRA et al., 2007).

A otimização multivariada de sistemas de separação pode ser realizada baseando-se no seguinte procedimento:

- (i) Escolher um planejamento estatístico para investigar a região experimental de interesse.
- (ii) Realizar os experimentos em ordem aleatória.
- (iii) Efetuar a análise de variância (ANOVA) sobre os resultados da regressão para que o modelo mais apropriado, sem evidência de falta de ajuste, possa ser usado para representar os dados. É muito comum esta validação não ser demonstrada em aplicações da superfície de resposta, mesmo sendo fundamental para saber se o sistema foi realmente otimizado ou não.

Modernos programas de computadores estatísticos estão comercialmente disponíveis para ajudar o pesquisador a realizar todos estes passos (BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2003; BOX, HUNTER & HUNTER, 2005; FERREIRA et al., 2007).

O desenvolvimento de um método de separação por eletroforese capilar é um procedimento em que muitas variáveis podem afetar a seletividade da separação, principalmente as características do tampão de corrida, a voltagem e a temperatura do capilar. Na literatura, é muito comum encontrar pesquisas aplicando um método clássico para determinação das condições ótimas de separação, variando um dos fatores enquanto os outros são mantidos em um nível especificado. Entretanto, esta abordagem unidimensional é muito laboriosa e freqüentemente falha em garantir a determinação das condições ótimas. Por outro lado, realizar experimentos com todas as possíveis combinações dos fatores analisados é impraticável, pois um grande número de

experimentos seria necessário. Para resolver estes problemas, emprega-se a metodologia da superfície de resposta. Esta abordagem multivariada possui vantagens em termos da redução no número de experimentos, possibilidades aperfeiçoadas de interpretação estatística e redução do tempo total necessário para a análise dos dados (RONDA et al., 2008). A metodologia da superfície de resposta foi aplicada com sucesso para melhorar os resultados analíticos em eletroforese capilar, como no estudo de Meinhart et al. (2010).

Quando o trabalho envolve muitos fatores, é comum a obtenção de muitas respostas, e é bastante improvável que a região ótima para todas elas seja a mesma. Assim, é necessário o emprego de ferramentas estatísticas que consigam lidar com um grande número de respostas, de maneira a fornecer uma resposta global adequada aos objetivos do pesquisador.

Neste sentido, pode-se trabalhar com a metodologia de otimização simultânea proposta por Derringer e Suich. Este método baseia-se na definição de uma função de desejabilidade para cada resposta, com valores restritos ao intervalo $[0,1]$. Zero significa um valor inaceitável e um o valor mais desejável. Uma vez que as funções de desejabilidade tenham sido especificadas para todas as respostas, deve-se combiná-las em uma desejabilidade global, normalmente dada pela média geométrica das m desejabilidades individuais. Com este artifício, a otimização simultânea das várias respostas se reduz à maximização de um único valor, a desejabilidade global, transformando o problema em descobrir quais os níveis dos fatores que maximizam o valor da desejabilidade global. Outra vantagem desta definição é que o uso da média geométrica faz com que a desejabilidade global se anule sempre que uma das respostas tiver um valor inaceitável, não importa o quão satisfatórios sejam os

valores das outras respostas. É necessário muito cuidado ao utilizar este tipo de ferramenta, pois a simples aplicação mecânica do algoritmo de busca podem produzir condições matematicamente “otimizadas”, porém sem viabilidade prática. As condições ótimas selecionadas devem ser submetidas à experimentos confirmatórios, para verificar se os resultados obtidos através do algoritmo realmente refletem os valores empíricos (BARROS NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2003; BREITKREITZ, 2007). A técnica de Derringer e Suich foi eficientemente aplicada em um recente trabalho (BREITKREITZ, JARDIM & BRUNS, 2009) para otimizar a separação de dois conjuntos, um contendo 10 compostos neutros e o outro 11 agrotóxicos, por cromatografia líquida de alta eficiência, com a obtenção de excelentes resultados.

Com base nisso, pode-se verificar que estas técnicas estatísticas multivariadas são poderosas ferramentas capazes de proporcionar um grande auxílio na separação dos compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem, cuja composição é bastante complexa e não foi ainda totalmente caracterizada.

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILERA, M. P.; BELTRÁN, G.; ORTEGA, D.; FERNÁNDEZ, A.; JIMÉNEZ, A.; UCEDA, M. Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: ‘Frantoio’ and ‘Leccino’, grown in Andalusia. **Food Chemistry**, v. 89, p. 387-391, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES, IMPORTADORES E COMERCIANTE DE AZEITE DE OLIVA. Disponível em: <<http://oliva.org.br/index.asp>>. Acesso em: 03 de janeiro de 2010.

- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2003.
- BELTRÁN, G.; PAZ AGUILERO, M.; DEL RIO, C.; SANCHEZ, S.; MARTINEZ, L. Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. **Food Chemistry**, v. 89, p. 207-215, 2005.
- BENDINI, A.; BONOLI, M.; CERRETANI, L.; BIGUZZI, B.; LERCKER, G.; GALLINA-TOSCHI, T. Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 425-433, 2003.
- BENDINI, A.; CERRETANI, L.; CARRASCO-PANCORBO, A.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; LERCKER, G. Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. **Molecules**, v. 12, p. 1679-1719, 2007.
- BENDINI, A.; CERRETANI, L.; VECCHI, S.; CARRASCO-PANCORBO, A.; LERCKER, G. Protective Effects of Extra Virgin Olive Oil Phenolics on Oxidative Stability in the Presence or Absence of Copper Ions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4880-4887, 2006.
- BENEDETTO, R. D.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; FILESI, C.; SANTANGELO, C.; GIOVANNINI, C.; MATARRESE, P.; D'ARCHIVIO, M.; MASELLA, R. Tyrosol, the major extra virgin olive oil compound, restored intracellular antioxidant defenses in spite of its weak antioxidative

- effectiveness. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 17, p. 535-545, 2007.
- BENKHALTI, F.; PROST, J.; PAZ, E.; PEREZ-JIMENEZ, F.; EL MODAFAR, C.; EL BOUSTANI, E. Effects of feeding virgin olive oil or their polyphenols on lipid of rat liver. **Nutrition Research**, v. 22, p. 1067-1075, 2002.
- BONOLI, M.; BENDINI, A.; CERRETANI, L.; LERCKER, G.; GALLINA-TOSCHI, T. Qualitative and Semiquantitative Analysis of Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oils as a Function of the Ripening Degree of Olive Fruits by Different Analytical Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7026-7032, 2004.
- BONOLI, M.; MONTANUCCI, M.; GALLINA-TOSCHI, T.; LERCKER, G. Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1011, p. 163-172, 2003.
- BOUDET, A.-M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2722-2735, 2007.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters**. 2. ed. New York: Wiley, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde, RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal**. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2005.
- BREITKREITZ, M. C. **Otimização Simultânea de Variáveis de Processo e Mistura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Campinas:

- UNICAMP, 2007. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BRUNS, R. E. Combined column-mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1439-1449, 2009.
- BRENES, M.; GARCÍA, A.; GARCÍA, P.; GARRIDO, A. Acid Hydrolysis of Secoiridoid Aglycons during Storage of Virgin Olive Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5609-5614, 2001.
- BROUK, M.; FISHMAN, A. Protein engineering of toluene monooxygenases for synthesis of hydroxytyrosol. **Food Chemistry**, v. 116, p. 114-121, 2009.
- CAMPANELLA, L.; NUCCILLI, A.; TOMASSETTI, M.; VECCHIO, S. Biosensor analysis for the kinetic study of polyphenols deterioration during the forced thermal oxidation of extra-virgin olive oil. **Talanta**, v. 74, p. 1287-1298, 2008.
- CARRASCO-PANCORBO, A.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; DEL CARLO, M.; GALLINA-TOSCHI, T.; LERCKER, G.; COMPAGNONE, D.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Evaluation of the Antioxidant Capacity of Individual Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 8918-8925, 2005a.
- CARRASCO-PANCORBO, A.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; GALLINA-TOSCHI, T.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 837-858, 2005b.

- CARRASCO-PANCORBO, A.; CRUCES-BLANCO, C.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Sensitive Determination of Phenolic Acids in Extra-Virgin Olive Oil by Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 22, p. 6687-6693, 2004.
- CARRASCO-PANCORBO, A.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolic acids, and flavonoids in extra-virgin olive oil. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 2221-2233, 2006a.
- CARRASCO-PANCORBO, A.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Rapid Quantification of the Phenolic Fraction of Spanish Virgin Olive Oils by Capillary Electrophoresis with UV Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7984-7991, 2006b.
- CARRASCO-PANCORBO, A.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; SEGURA-CARRETERO, A.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Use of capillary electrophoresis with UV detection to compare the phenolic profiles of extra-virgin olive oils belonging to Spanish and Italian PDOs and their relation to sensorial properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 2144-2155, 2009.
- CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, p. 345-358, 2009.

- CHRISTOPHORIDOU, S.; DAIS, P. Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, p. 283-292, 2009.
- CICERALE, S.; CONLAN, X. A.; SINCLAIR, A. J.; KEAST, R. S. J. Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 218-236, 2009.
- CODEX STAN 33. **Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils**. Codex Alimentarius Commission, FAO/WHO. Revision 2 (2003). Amendment in 2009.
- CONDE, C.; DELROT, S.; GERÓS, H. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1545-1562, 2008.
- COVAS, M. Olive oil and the cardiovascular system. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 175-186, 2007.
- DE LA TORRE, R. Bioavailability of olive oil phenolic compounds in humans. **Inflammopharmacology**, v. 16, p. 245-247, 2008.
- DEJONG, S.; LANARI, M. C. Extracts of olive polyphenols improve lipid stability in cooked beef and pork: Contribution of individual phenolics to the antioxidant activity of the extract. **Food Chemistry**, v. 116, p. 892-897, 2009.
- DOURTOGLOU, V. G.; DOURTOGLOU, T.; ANTONOPOULOS, A.; STEFANOPOULOS, E.; LALAS, S.; POULOS, C. Detection of Olive Oil Adulteration Using Principal Component Analysis Applied on Total and Regio FA Content. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, p. 203-208, 2003.

- ESTI, M.; CONTINI, M.; MONETA, E.; SINESIO, F. Phenolic compounds and temporal perception of bitterness and pungency in extra-virgin olive oils: Changes occurring throughout storage. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1095-1100, 2009.
- FERNANDEZ-PANCHON, M. S.; VILLANO, D.; TRONCOSO, A. M.; GARCIA-PARRILLA, M. C. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds: From *In Vitro* Results to *In Vivo* Evidence. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 649-671, 2008.
- FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BARROS NETO; B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, p. 2-14, 2007.
- GALLINA-TOSCHI, T.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; BONOLI-CARBOGNIN, M.; LERCKER, G. Oxidative stability and phenolic content of virgin olive oil: An analytical approach by traditional and high resolution techniques. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 859-870, 2005.
- GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; CARRASCO-PANCORBO, A.; CAÑABATE-DÍAZ, B.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Electrophoretic identification and quantitation of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil. **Electrophoresis**, v. 26, p. 3538-3551, 2005.
- HARWOOD, J.; APARICIO, R. **Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties**. Maryland: Aspen Publishers, Inc., 2000.

- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572-584, 2002.
- HRNCIRIK, K.; FRITSCHÉ, S. Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 8, p. 540-549, 2004.
- INAREJOS-GARCIA, A. M.; ANDROULAKI, A.; SALVADOR, M. D.; FREGAPANE, G.; TSIMIDOU, M. Z. Discussion on the objective evaluation of virgin olive oil bitterness. **Food Research International**, v. 42, p. 279-284, 2009.
- JÁC, P.; POLÁSEK, M.; POSPÍSILOVÁ, M. Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 805-814, 2006.
- LAFONT, F.; ARAMENDIA, M. A.; GARCÍA, I.; BORAU, V.; JIMÉNEZ, C.; MARINAS, J. M.; URBANO, F. J. Analyses of Phenolic Compounds by Capillary Electrophoresis Electrospray Mass Spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 13, p. 562-567, 1999.
- LEE, O.-H.; LEE, B.-Y.; KIM, Y.-C.; SHETTY, K.; KIM, Y.-C. Radical Scavenging-Linked Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of Diverse Types of Extra Virgin Olive Oils. **Journal of Food Science**, v. 73, p. C519-C525, 2008.
- LERMA-GARCÍA, M. J.; SIMÓ-ALFONSO, E. F.; CHIAVARO, E.; BENDINI, A.; LERCKER, G.; CERRETANI, L. Study of Chemical Changes Produced in Virgin Olive Oils with Different Phenolic Contents during an Accelerated

- Storage Treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 7834-7840, 2009.
- LIMA, D. L. D.; DUARTE, A. C.; ESTEVES, V. I. Optimization of phenolic compounds analysis by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 72, p. 1404-1409, 2007.
- LIMIROLI, R.; CONSONNI, R.; RANALLI, A.; BIANCHI, G.; ZETTA, L. ^1H NMR Study of Phenolics in the Vegetation Water of Three Cultivars of *Olea europaea*: Similarities and Differences. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 2040-2048, 1996.
- MAMAN, O.; MARSEILLE, F.; GUILLET, B.; DISNAR, J.-R.; MORIN, P. Separation of phenolic aldehydes, ketones and acids from lignin degradation by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 755, n. 1, p. 89-97, 1996.
- MEDINA, I.; TERESA SATUÉ-GRACIA, M.; BRUCE GERMAN, J.; FRANKEL, E. N. Comparison of Natural Polyphenol Antioxidants from Extra Virgin Olive Oil with Synthetic Antioxidants in Tuna Lipids during Thermal Oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4873-4879, 1999.
- MEINHART, A. D.; BIZZOTTO, C. S.; BALLUS, C. A.; PRADO, M. A.; BRUNS, R. E.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H. T. Optimisation of a CE method for caffeine analysis in decaffeinated coffee. **Food Chemistry**, v. 120, p. 1155-1161, 2010.
- MENDOZA-WILSON, A. M.; GLOSSMAN-MITNIK, D. Theoretical study of the molecular properties and chemical reactivity of (+)-catechin and (-)-

- epicatechin related to their antioxidant ability. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 761, p. 97-106, 2006.
- MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 577-599, 2000.
- MONTEDORO, G.; SERVILI, M.; BALDIOLI, M.; MINIATI, E. Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 1. Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1571-1576, 1992a.
- MONTEDORO, G.; SERVILI, M.; BALDIOLI, M.; MINIATI, E. Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Initial Characterization of the Hydrolyzable Fraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1577-1580, 1992b.
- MONTEDORO, G.; SERVILI, M.; BALDIOLI, M.; SELVAGGINI, R.; MINIATI, E.; MACCHIONI, A. Simple and Hydrolyzable Compounds in Virgin Olive Oil. 3. Spectroscopic Characterizations of the Secoiridoid Derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 2228-2234, 1993.
- MORIN, P.; VILLARD, F.; DREUX, M. Borate complexation of flavonoid-O-glycosides in capillary electrophoresis. I. Separation of flavonoid-7-O-glycosides differing in their flavonoid aglycone. **Journal of Chromatography A**, v. 628, n. 1, p. 153-160, 1993a.
- MORIN, P.; VILLARD, F.; DREUX, M. Borate complexation of flavonoid-O-glycosides in capillary electrophoresis. II. Separation of flavonoid-3-O-

- glycosides differing in their sugar moiety. **Journal of Chromatography A**, v. 628, n. 1, p. 161-169, 1993b.
- MURKOVIC, M.; LECHNER, S.; PIETZKA, A.; BRATACOS, M.; KATZOGIANNOS, E. Analysis of minor components in olive oil. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 61, p. 155-160, 2004.
- NICHENAMETLA, S. N.; TARUSCIO, T. G.; BARNEY, D. L.; EXON, J. H. A Review of the Effects and Mechanisms of Polyphenolics in Cancer. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 161-183, 2006.
- O'DOWD, Y.; DRISS, F.; MY-CHAN DANG, P.; ELBIM, C.; GOUGEROT-POCIDALO, M.-A.; PASQUIER, C.; EL-BENNA, J. Antioxidant effect of hydroxytyrosol, a polyphenol from olive oil: scavenging of hydrogen peroxide but not superoxide anion produced by human neutrophils. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 2003-2008, 2004.
- OBIED, H. K.; BEDGOOD JR, D. R.; PRENZLER, P. D.; ROBARDS, K. Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 603, p. 176-189, 2007.
- OBIED, H. K.; PRENZLER, P. D.; RYAN, D.; SERVILI, M.; TATICCHI, A.; ESPOSTO, S.; ROBARDS, K. Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. **Natural Product Reports**, v. 25, p. 1167-1179, 2008.
- OKOGERI, O.; TASIOULA-MARGARI, M. Changes Occurring in Phenolic Compounds and α -Tocopherol of Virgin Olive Oil during Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1077-1080, 2002.

- OWEN, R. W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; HAUBNER, R.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 1235-1247, 2000a.
- OWEN, R. W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; HAUBNER, R.; WÜRTELE, G.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. **The Lancet Oncology**, v. 1, p. 107-112, 2000b.
- OWEN, R. W.; HAUBNER, R.; MIER, W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoids compounds in brined olive drupes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 703-717, 2003.
- PANNALA, A. S.; CHAN, T. S.; O'BRIEN, P. J.; RICE-EVANS, C. A. Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, p. 1161-1168, 2001.
- PAPADIMITRIOU, V.; SOTIROUDIS, T. G.; XENAKIS, A.; SOFIKITI, N.; STAVYIANNOUDAKI, V.; CHANIOTAKIS, N. A. Oxidative stability and radical scavenging activity of extra-virgin olive oil: An electron paramagnetic resonance spectroscopy study. **Analytica Chimica Acta**, v. 573-574, p. 453-458, 2006.
- PERONA, J. S.; CABELLO-MORUNO, R.; RUIZ-GUTIERREZ, V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 429-445, 2006.

- PIETTA, P.-G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.
- PIRISI, F. M.; ANGIONI, A.; CABRAS, P.; GARAU, V. L.; TEULADA, M. T. S.; SANTOS, M. K.; BANDINO, G. Phenolic compounds in virgin olive oils. 1. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performance liquid chromatography under isocratic elution. **Journal of Chromatography A**, v. 768, p. 207-213, 1997.
- PIRISI, F. M.; CABRAS, P.; CAO, C. F.; MIGLIORINI, M.; MUGGELLI, M. Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Reappraisal of the Extraction, HPLC Separation, and Quantification Procedures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1191-1196, 2000.
- PRIEGO-CAPOTE, F.; RUIZ-JIMÉNEZ, J.; DE CASTRO, M. D. L. Fast separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis-diode array detection. Application to the characterization of alperujo after ultrasound-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, p. 239-246, 2004.
- RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.
- RODRÍGUEZ, G.; LAMA, A.; TRUJILLO, M.; ESPARTERO, J. L.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J. Isolation of a powerful antioxidant from *Olea europaea* fruit-mill waste: 3,4-Dihydroxyphenylglycol. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, p. 483-490, 2009.

- RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, M. L.; APETREI, C.; DE SAJA, J. A. Evaluation of the polyphenolic content of extra virgin olive oils using an array of voltammetric sensors. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 5867-5872, 2008.
- RONDA, F.; RODRÍGUEZ-NOGALES, J. M.; SANCHO, D.; OLIVETE, B.; GÓMEZ, M. Multivariate optimisation of a capillary electrophoretic method for the separation of glutenins. Application to quantitative analysis of the endosperm storage proteins in wheat. **Food Chemistry**, v. 108, p. 287-296, 2008.
- SAITTA, M.; SALVO, F.; DI BELLA, G.; DUGO, G.; LOREDANA LA TORRE, G. Minor compounds in the phenolic fraction of virgin olive oils. **Food Chemistry**, v. 112, p. 525-532, 2009.
- SAMANIEGO SÁNCHEZ, C.; TRONCOSO GONZÁLEZ, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; QUESADA GRANADOS, J. J.; LÓPEZ GARCÍA DE LA SERRANA, H.; LÓPEZ MARTÍNEZ, M. C. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. **Analytica Chimica Acta**, v. 593, p. 103-107, 2007.
- SÁNCHEZ, C. S.; GONZÁLEZ, A. M. T.; GARCÍA-PARRILLA, M. C.; GRANADOS, J. J. Q.; GARCÍA DE LA SERRANA, H. L.; MARTÍNEZ, M. C. L. Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. **Analytica Chimica Acta**, v. 593, p. 103-107, 2007.
- SAURA-CALIXTO, F.; GOÑI, I. Definition of the Mediterranean Diet Based on Bioactive Compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 145-152, 2009.

- SAVARESE, M.; DE MARCO, E.; SACCHI, R. Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 105, p. 761-770, 2007.
- SERVILI, M.; ESPOSTO, S.; FABIANI, R.; URBANI, S.; TATICCHI, A.; MARIUCCI, F.; SELVAGGINI, R.; MONTEODORO, G. F. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. **Inflammopharmacology**, v. 17, p. 76-84, 2009.
- SERVILI, M.; MONTEODORO, G. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, p. 602-613, 2002.
- SERVILI, M.; SELVAGGINI, R.; ESPOSTO, S.; TATICCHI, A.; MONTEODORO, G.; MOROZZI, G. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 113-127, 2004.
- SIMOPOULOS, A. P. The Mediterranean Diets: What Is So Special about the Diet of Greece? The Scientific Evidence. **Journal of Nutrition**, v. 131, p. 3065S-3073S, 2001.
- SONI, M. G.; BURDOCK, G. A.; CHRISTIAN, M. S.; BITLER, C. M.; CREA, R. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 903-915, 2006.

- STOBIECKI, M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoids glycosides. **Phytochemistry**, v. 54, p. 237-256, 2000.
- TORRE-CARBOT, K. D. L.; JAUREGUI, O.; GIMENO, E.; CASTELLOTE, A. I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; LÓPEZ-SABATER, M. C. Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oils by Solid-Phase Extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4331-4340, 2005.
- TURA, D.; GIGLIOTTI, C.; PEDÒ, S.; FAILLA, O.; BASSI, D.; SERRAIOCCO, A. Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea europaea* L.) and correlations with oxidative stability. **Scientia Horticulturae**, v. 112, p. 108-119, 2007.
- TURA, D.; ROBARDS, K. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 71-93, 2002.
- VEILLET, S.; TOMAO, V.; BORNARD, I.; RUIZ, K.; CHEMAT, F. Chemical changes in virgin olive oils as a function of crushing systems: Stone mill and hammer crusher. **Comptes Rendus Chimie**, v. 12, p. 895-904, 2009.
- VINHA, A. F.; FERRERES, F.; SILVA, B. M.; VALENTÃO, P.; GONÇALVES, A.; PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. B.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. **Food Chemistry**, v. 89, p. 561-568, 2005.

VISIOLI, F.; BELLOMO, G.; GALLI, C. Free Radical-Scavenging Properties of Olive Oil Polyphenols. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 247, n. 1, p. 60-64, 1998.

VISIOLI, F.; GALLI, C. Biological Properties of Olive Oil Phytochemicals. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.42, p. 209-221, 2002.

WANG, S.-P.; HUANG, K.-J. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 273-279, 2004.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, v. 109, p. 691-702, 2008.

ZULLO, B. A.; CIAFARDINI, G. The olive oil oxygen radical absorbance capacity (DPPH assay) as a quality indicator. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.110, p. 428-434, 2008.

CAPÍTULO 2

COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS DE AZEITES DE OLIVA EXTRAVIRGEM COMERCIALIZADOS NO BRASIL

Cristiano Augusto Ballus,¹ Adriana Dillenburg Meinhart,¹ Stanislau Bogusz
Junior,¹ Roy Edward Bruns,² e Helena Teixeira Godoy¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de
Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121,
13083-862, Campinas, SP, Brasil

² Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
CP 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brasil

RESUMO

Nos últimos anos, o interesse em relação ao consumo do azeite de oliva aumentou significativamente, em função da divulgação dos benefícios à saúde provenientes da sua ingestão. Por ser um produto de alto valor agregado, é um dos alvos preferidos para adulterações, principalmente através de misturas com outros óleos vegetais de valor inferior. Este trabalho teve como objetivo utilizar a Análise de Componentes Principais (PCA) na tentativa de agrupar as diferentes marcas pelo país de origem, utilizando-se do perfil de ácidos graxos. Foram adquiridas 15 marcas de azeites de oliva extravirgem, em três lotes, sendo cada lote composto por duas embalagens, em supermercados de Campinas – SP. Após a derivatização, os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados e quantificados por cromatografia em fase gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID). O método por GC-FID foi validado para os parâmetros repetibilidade e precisão intermediária. A confirmação da identidade dos compostos foi feita utilizando a espectrometria de massas (MS). O método por GC-FID apresentou boa repetibilidade e precisão intermediária, com CVs menores que 5%. Foram detectados os ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico, α -linolênico, araquídico e gadoleico. Nenhuma das amostras mostrou adulteração passível de ser detectada pela composição em ácidos graxos. A PCA permitiu apenas a separação de uma amostra proveniente da Argentina de todas as outras, porém, forneceu resultados de grande valia acerca de determinadas correlações entre grupos de ácidos graxos.

Palavras-chave: azeite de oliva; ácidos graxos; GC-FID; GC/MS; PCA; adulteração

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 30 anos o interesse no uso culinário do azeite de oliva vem aumentando, principalmente pelas virtudes da dieta mediterrânea e seus efeitos benéficos à saúde, provenientes em grande parte do consumo de azeite de oliva (SERVILI & MONTEDORO, 2002).

O mercado de azeite de oliva no Brasil apresenta vendas de aproximadamente 32.000 toneladas, colocando-o entre os 10 países de maior consumo mundial (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES, IMPORTADORES E COMERCIANTES DE AZEITE DE OLIVA, 2010).

A principal característica do azeite de oliva é a abundância de ácido oleico (18:1, n-9), que varia entre 55 e 83% do total de ácidos graxos (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b; SERVILI et al., 2009). A elevada proporção de ácido oleico ajuda a diminuir os níveis de colesterol LDL (*“low-density lipoprotein”*) e aumentar os níveis de colesterol HDL (*“high-density lipoprotein”*) no sangue (COVAS, 2007; CONDE, DELROT & GERÓS, 2008; CICERALE et al., 2009).

A adulteração do azeite de oliva com vários óleos vegetais é um problema comum, afetando a qualidade e o valor comercial do produto. Esta prática é um abuso e causa uma grande perda do valor econômico do produto. Os principais critérios de pureza para azeites de oliva baseiam-se principalmente no teor de ácidos graxos livres, na extinção específica, na composição em ácidos graxos e na composição de esteróis (DOURTOGLOU et al., 2003).

A composição em ácidos graxos pode ser útil, quando usada em conjunto com outros parâmetros, para determinar possíveis adulterações do

azeite de oliva. A legislação brasileira (BRASIL, 2005) determina que os limites fixados pelo Codex Alimentarius (CODEX STAN 33, 2009) devem ser empregados na avaliação da composição em ácidos graxos dos azeites de oliva extravirgem comercializados no país, a serem determinados por cromatografia em fase gasosa. Segundo Aued-Pimentel et al. (2002), em monitoramento de rotina observou-se que, das amostras analisadas, todas aquelas envasadas no país de origem eram puras, enquanto 42% das envasadas no Brasil estavam adulteradas.

A análise de ácidos graxos é considerada rotina em muitos laboratórios de química de alimentos e controle de qualidade. Após a extração com solventes orgânicos, a composição em ácidos graxos é determinada realizando-se a derivatização da amostra, produzindo ésteres metílicos de ácidos graxos. Os ésteres são separados por cromatografia em fase gasosa, geralmente utilizando-se detecção por ionização em chama (THOMPSON, 1996; TORRES, TRUGO & TRUGO, 2002; THURNHOFER & VETTER, 2006; VENKATACHALAM & SATHE, 2006; VISENTAINER & FRANCO, 2006; FARKAS et al., 2008).

Os instrumentos analíticos modernos permitem a obtenção de grandes quantidades de informação para um grande número de amostras, que podem ser analisadas em curto período de tempo. Com isso, matrizes de dados multivariados tornam-se disponíveis e requerem o uso de procedimentos estatísticos e matemáticos para extrair o máximo de informações úteis a partir destes dados. A análise de componentes principais (PCA) é uma das principais técnicas utilizadas para a análise exploratória de dados, a qual permite

visualizar a existência de determinados perfis nos dados analisados (BERRUETA, ALONSO-SALCES & HÉBERGER, 2007).

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a composição em ácidos graxos de amostras de azeite de oliva extravirgem comercializadas no país, de forma a verificar se este parâmetro detecta algum tipo de adulteração, bem como aplicar a análise de componentes principais na tentativa de agrupar as amostras conforme o país de onde foram importadas, através da composição em ácidos graxos das mesmas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Foram utilizados hidróxido de sódio p.a. (Nuclear, Brasil), metanol p.a. (Synth, Brasil), solução de trifluoreto de boro (BF_3) a 20% em metanol (Merck, Brasil), cloreto de sódio p.a. (Ecibra, Brasil), hexano grau HPLC (J. T. Baker, EUA) e padrões de ésteres metílicos do C_4 ao C_{24} (FAME Mix, Supelco, EUA).

2.2. Amostras

As amostras de azeite de oliva extravirgem foram adquiridas em supermercados da cidade de Campinas – SP, perfazendo 15 marcas diferentes, cada uma em três lotes, totalizando 45 amostras. Cada lote foi formado por duas embalagens. Na **Tabela 2.1** estão reunidas as informações relevantes que constavam dos rótulos das amostras.

Tabela 2.1. Informações do rótulo das amostras de azeite de oliva extravirgem.

Marca	Acidez Declarada	País de Origem	Local de Envase
1	Máx. 0,8%	Grécia	Grécia
2	Máx. 0,75%	Espanha	Espanha
3	Máx. 0,8%	Portugal	Portugal
4	Máx. 0,5%	Espanha	Espanha
5	Máx. 0,5%	Portugal	Portugal
6	Máx. 0,7%	Portugal	Portugal
7	Máx. 0,7%	Portugal	Portugal
8	Máx. 0,5%	Espanha	Espanha
9	Máx. 0,8%	Grécia	Grécia
10	Máx. 0,5%	Portugal	Portugal
11	Máx. 0,5%	Espanha	Espanha
12	Máx. 0,7%	Itália	Itália
13	Máx. 0,5%	Portugal	Portugal
14	Máx. 0,8%	Argentina	Argentina
15	Máx. 0,5%	Espanha	Espanha

2.3. Preparo dos ésteres metílicos

Aproximadamente 100 mg de cada azeite de oliva extravirgem foram pesados em tubos de ensaio, com posterior adição de 4 mL de solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ em metanol. Os tubos foram aquecidos em banho-maria a 100°C por aproximadamente 8 min, até a obtenção de uma solução transparente. Nesta etapa ocorreu a hidrólise dos triacilgliceróis, produzindo os ácidos graxos livres. Após o resfriamento, foram adicionados 3 mL de solução de BF₃ 12% em metanol, e os tubos novamente aquecidos em banho-maria a 100°C, durante 3 min. Nesta etapa produziu-se a metilação dos ácidos graxos

livres, catalisada pelo BF_3 , resultando na formação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAMES). Após o resfriamento, foram adicionados 4 mL de solução saturada de NaCl, com posterior agitação. Em seguida, foram adicionados 4 mL de hexano, com posterior agitação vigorosa. Feito isso, os tubos foram deixados em repouso para separação das fases, sendo que 1 μL da fase orgânica superior de cada replicata foi injetado no cromatógrafo à gás. Cada amostra foi esterificada em triplicata. Este procedimento foi adaptado do trabalho de Joseph & Ackman (1992). Deve-se ter em mente que o reagente BF_3 em metanol é extremamente tóxico, portanto, seu manuseio deve ser feito utilizando-se todos os procedimentos de segurança. Em um trabalho de comparação entre oito métodos de esterificação para produção de FAMES, o método que emprega BF_3 mostrou ser bastante eficiente (MILINSK et al., 2008). A repetibilidade do procedimento de preparo dos FAMES foi avaliada por meio da realização de 10 derivatizações da mesma amostra, calculando-se o coeficiente de variação (CV) para cada um dos ésteres analisados.

2.4. Condições cromatográficas GC-FID

Para separação e quantificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, foi utilizado um cromatógrafo à gás VARIAN 3300 com detector por ionização em chama (GC-FID). Empregou-se coluna Carbowax (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm espessura do filme, J & W Scientific). Os parâmetros ajustados foram: temperatura do injetor (230°C); temperatura do detector (250°C); injeção no modo *split* (1:100); vazão do gás de arraste H_2 (1,6 mL min^{-1}); vazão dos gases do detector $\text{H}_2/\text{N}_2/\text{Ar}$ Sintético (30/30/300 mL min^{-1}); programa de temperatura (140°C por 20 min, passando para 220°C a 2,5°C por min, temperatura final

mantida por 10 min). A identificação dos picos foi feita por comparação dos tempos de retenção dos padrões, obtidos nas mesmas condições, e os tempos de retenção dos picos observados para as amostras. A quantificação foi realizada por normalização de área, ou seja, área do pico de um determinado ácido graxo em relação à área total (somatório da área de todos os picos de ácidos graxos). As condições cromatográficas foram adaptadas de Visentainer et al. (2003). O método foi validado para os parâmetros repetibilidade ($n = 5$) e precisão intermediária ($n = 3$), injetando-se a mistura de padrões de ésteres metílicos (INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004).

2.5. Confirmação da identidade dos ésteres metílicos por GC/MS

Para confirmar a identidade dos ésteres metílicos encontrados nas amostras, procedeu-se à identificação positiva por meio da injeção dos padrões e de uma amostra no cromatógrafo à gás acoplado ao espectrômetro de massas (GC/MS), nas mesmas condições cromatográficas do GC-FID, incluindo a mesma fase estacionária. Apenas uma amostra foi injetada porque todas as amostras apresentaram os mesmos picos, ou seja, o mesmo perfil, quando analisadas no GC-FID. O equipamento utilizado foi um GC/MS QP5000 (Shimadzu), com fonte de ionização por elétrons (EI) e analisador do tipo quadrupolo. A coluna empregada foi uma DB-Wax (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,50 μm de espessura do filme) e os parâmetros instrumentais foram os seguintes: temperatura do injetor: 230°C; injeção no modo *split* (1:50); gás de arraste: He (1,6 mL min^{-1} , vazão constante – rampa de pressão); programa de temperatura: 140°C por 20 min, passando para 220°C a 2,5°C/min, mantendo a temperatura final por 10 min. A temperatura da interface foi 240°C e o

analisador foi operado em modo varredura (35 a 350 m/z). A identidade dos compostos foi determinada por meio da comparação dos espectros de massas dos ésteres metílicos provenientes da amostra com aqueles fornecidos pela biblioteca do National Institute of Standards and Technology (NIST) 98, considerando similaridades acima de 85%, e com o espectro de massas dos padrões.

2.6. Análise Estatística

As médias obtidas para cada lote de uma mesma marca foram comparadas através da Análise de Variância (ANOVA) e do Teste de Tukey, ao nível de 95% de confiança, assim como as médias totais de cada marca (média dos três lotes) foram comparadas entre si da mesma maneira. Os dados também foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA), na tentativa de verificar se existe a possibilidade de separar as marcas pelo país de origem, por meio da composição em ácidos graxos. Todas as análises estatísticas foram realizadas com a ajuda do *software* Statistica 7,0 (Statsoft, USA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Validação do processo de preparação dos ésteres metílicos

Com o intuito de verificar se o método de preparo dos ésteres metílicos estava produzindo resultados com boa repetibilidade, a mesma amostra foi submetida ao procedimento por 10 vezes. Os coeficientes de variação (CVs) para a área normalizada dos ésteres metílicos encontrados na amostra

resultaram em 3,56% para o ácido palmítico (16:0); 3,14% para o ácido esteárico (18:0); 4,03% para o ácido oleico (18:1, n-9); 4,03% para o ácido linoleico (18:2, n-6); 3,51% para o ácido α -linolênico (18:3, n-3); 3,51% para o ácido araquídico (20:0); e 7,94% para o ácido gadoleico (20:1, n-9). A variação observada para quase todos os ésteres foi menor que 5% e permite dizer que o método de derivatização possui boa repetibilidade. A variação para o ácido gadoleico ficou acima de 5%, mas este é o ácido graxo encontrado em menor quantidade, e compostos presentes em baixas concentrações apresentam maior variação.

3.2. Identificação e quantificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos por GC-FID

Foram identificados e quantificados sete ésteres metílicos de ácidos graxos presentes nas amostras de azeite de oliva extravirgem. A coluna empregada não permitiu a identificação dos isômeros *trans* dos ácidos graxos. A **Tabela 2.2** apresenta os resultados obtidos para as 45 amostras analisadas. A **Figura 2.1** ilustra um perfil cromatográfico referente à separação dos ésteres metílicos por GC-FID.

Tabela 2.2. Teor de ácidos graxos em amostras de azeite de oliva extravirgem.

Marcas	Lotes	Teor de Ácidos Graxos (% Área Relativa)						
		16:0	18:0	18:1, n-9	18:2, n-6	18:3, n-3	20:0	20:1, n-9
1	101	8,82 ± 0,303 ^b	2,27 ± 0,056 ^a	70,65 ± 1,355 ^b	6,51 ± 0,147 ^a	0,51 ± 0,005 ^a	0,32 ± 0,012 ^a	0,22 ± 0,008 ^a
	102	9,42 ± 0,150 ^a	2,38 ± 0,076 ^a	74,10 ± 0,967 ^a	6,62 ± 0,039 ^a	0,54 ± 0,012 ^a	0,35 ± 0,003 ^a	0,24 ± 0,004 ^a
	103	9,32 ± 0,185 ^{a,b}	2,46 ± 0,121 ^a	76,73 ± 0,918 ^a	5,58 ± 0,046 ^b	0,51 ± 0,021 ^a	0,36 ± 0,027 ^a	0,23 ± 0,030 ^a
2	201	7,61 ± 0,167 ^b	2,39 ± 0,118 ^b	68,43 ± 0,873 ^b	5,66 ± 0,069 ^a	0,47 ± 0,021 ^b	0,30 ± 0,017 ^a	0,22 ± 0,011 ^a
	202	9,24 ± 0,147 ^a	2,55 ± 0,057 ^{a,b}	75,92 ± 0,952 ^a	4,91 ± 0,064 ^c	0,51 ± 0,016 ^{a,b}	0,32 ± 0,004 ^a	0,22 ± 0,007 ^a
	203	9,35 ± 0,074 ^a	2,75 ± 0,181 ^a	76,59 ± 1,829 ^a	5,31 ± 0,117 ^b	0,53 ± 0,007 ^a	0,33 ± 0,020 ^a	0,20 ± 0,011 ^a
3	301	10,61 ± 0,065 ^b	1,83 ± 0,036 ^c	66,32 ± 1,141 ^b	6,74 ± 0,114 ^c	0,50 ± 0,003 ^b	0,27 ± 0,008 ^b	0,19 ± 0,013 ^b
	302	8,17 ± 0,054 ^c	2,59 ± 0,030 ^a	74,24 ± 0,183 ^a	9,25 ± 0,039 ^a	0,49 ± 0,011 ^b	0,32 ± 0,001 ^a	0,25 ± 0,004 ^a
	303	11,32 ± 0,133 ^a	2,08 ± 0,089 ^b	73,30 ± 1,288 ^a	7,56 ± 0,035 ^b	0,54 ± 0,008 ^a	0,31 ± 0,010 ^a	0,23 ± 0,010 ^a
4	401	9,22 ± 0,097 ^b	2,27 ± 0,027 ^a	73,42 ± 2,212 ^a	5,76 ± 0,079 ^b	0,52 ± 0,010 ^a	0,32 ± 0,018 ^a	0,22 ± 0,013 ^a
	402	10,99 ± 0,428 ^a	2,01 ± 0,005 ^b	71,01 ± 1,797 ^a	7,87 ± 0,180 ^a	0,54 ± 0,009 ^a	0,32 ± 0,007 ^a	0,23 ± 0,009 ^a
	403	10,83 ± 0,152 ^a	2,03 ± 0,059 ^b	71,45 ± 1,118 ^a	7,68 ± 0,038 ^a	0,54 ± 0,014 ^a	0,32 ± 0,011 ^a	0,23 ± 0,011 ^a
5	501	6,73 ± 0,231 ^c	2,72 ± 0,045 ^a	73,81 ± 0,081 ^{a,b}	8,78 ± 0,070 ^a	0,54 ± 0,012 ^a	0,31 ± 0,012 ^{a,b}	0,24 ± 0,029 ^a
	502	7,47 ± 0,131 ^b	2,54 ± 0,059 ^b	75,64 ± 1,150 ^a	7,24 ± 0,077 ^b	0,49 ± 0,004 ^b	0,32 ± 0,006 ^a	0,25 ± 0,007 ^a
	503	10,43 ± 0,146 ^a	1,97 ± 0,046 ^c	71,99 ± 0,744 ^b	6,58 ± 0,079 ^c	0,50 ± 0,006 ^b	0,29 ± 0,007 ^b	0,24 ± 0,009 ^a
6	601	9,62 ± 0,157 ^a	2,55 ± 0,050 ^a	75,32 ± 1,006 ^a	6,79 ± 0,064 ^{a,b}	0,53 ± 0,002 ^b	0,32 ± 0,007 ^a	0,19 ± 0,013 ^a
	602	8,66 ± 0,088 ^b	2,64 ± 0,112 ^a	75,85 ± 0,510 ^a	6,92 ± 0,046 ^a	0,54 ± 0,010 ^a	0,34 ± 0,011 ^a	0,24 ± 0,007 ^a
	603	8,53 ± 0,127 ^b	2,50 ± 0,077 ^a	74,32 ± 0,142 ^a	6,77 ± 0,041 ^b	0,52 ± 0,006 ^b	0,32 ± 0,019 ^a	0,22 ± 0,030 ^a
7	701	8,60 ± 0,118 ^b	2,88 ± 0,061 ^a	77,81 ± 0,536 ^a	4,84 ± 0,018 ^a	0,45 ± 0,006 ^a	0,31 ± 0,008 ^a	0,19 ± 0,007 ^a
	702	8,98 ± 0,155 ^a	2,85 ± 0,044 ^a	78,29 ± 0,392 ^a	4,09 ± 0,026 ^b	0,44 ± 0,016 ^{a,b}	0,30 ± 0,014 ^{a,b}	0,20 ± 0,008 ^a
	703	9,11 ± 0,048 ^a	2,60 ± 0,122 ^b	77,87 ± 0,212 ^a	4,05 ± 0,024 ^b	0,42 ± 0,004 ^b	0,28 ± 0,003 ^b	0,18 ± 0,007 ^b
8	801	11,73 ± 0,402 ^a	1,69 ± 0,071 ^b	64,29 ± 1,036 ^b	9,77 ± 0,154 ^a	0,59 ± 0,016 ^a	0,29 ± 0,009 ^b	0,22 ± 0,009 ^{a,b}
	802	12,05 ± 0,282 ^a	1,59 ± 0,049 ^b	65,75 ± 0,542 ^b	8,95 ± 0,102 ^b	0,55 ± 0,009 ^b	0,29 ± 0,008 ^{a,b}	0,23 ± 0,002 ^a
	803	11,80 ± 0,137 ^a	2,10 ± 0,056 ^a	70,34 ± 0,513 ^a	8,39 ± 0,043 ^c	0,55 ± 0,012 ^b	0,32 ± 0,013 ^a	0,21 ± 0,005 ^b

* Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Médias seguidas pela mesma letra na coluna, para os lotes de uma mesma marca, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (95%).

Tabela 2.2 (continuação).

Marcas	Lotes	Teor de Ácidos Graxos (% Área Relativa)						
		16:0	18:0	18:1, n-9	18:2, n-6	18:3, n-3	20:0	20:1, n-9
9	901	8,82 ± 0,266 ^a	2,31 ± 0,035 ^a	72,96 ± 0,483 ^b	6,59 ± 0,086 ^a	0,51 ± 0,002 ^a	0,34 ± 0,012 ^a	0,22 ± 0,020 ^a
	902	8,63 ± 0,159 ^a	2,15 ± 0,066 ^b	71,90 ± 1,182 ^b	6,74 ± 0,091 ^a	0,50 ± 0,009 ^a	0,34 ± 0,014 ^a	0,24 ± 0,012 ^a
	903	8,95 ± 0,244 ^a	2,32 ± 0,068 ^a	76,45 ± 0,213 ^a	5,59 ± 0,043 ^b	0,50 ± 0,008 ^a	0,36 ± 0,024 ^a	0,24 ± 0,018 ^a
10	1001	8,58 ± 0,168 ^b	2,25 ± 0,043 ^{a,b}	70,09 ± 1,623 ^b	5,60 ± 0,098 ^a	0,52 ± 0,008 ^a	0,32 ± 0,011 ^a	0,23 ± 0,001 ^a
	1002	8,22 ± 0,064 ^b	2,15 ± 0,165 ^b	70,63 ± 1,430 ^b	4,37 ± 0,093 ^c	0,48 ± 0,004 ^b	0,28 ± 0,002 ^b	0,19 ± 0,006 ^b
	1003	9,02 ± 0,231 ^a	2,45 ± 0,033 ^a	78,98 ± 0,327 ^a	4,96 ± 0,020 ^b	0,53 ± 0,004 ^a	0,32 ± 0,005 ^a	0,22 ± 0,007 ^a
11	1101	8,54 ± 0,142 ^a	2,91 ± 0,090 ^{a,b}	73,89 ± 1,626 ^b	5,19 ± 0,077 ^a	0,47 ± 0,004 ^a	0,31 ± 0,015 ^a	0,20 ± 0,015 ^a
	1102	8,74 ± 0,066 ^a	2,97 ± 0,053 ^a	77,45 ± 0,232 ^a	4,86 ± 0,007 ^b	0,45 ± 0,012 ^a	0,32 ± 0,012 ^a	0,20 ± 0,009 ^a
	1103	8,99 ± 0,551 ^a	2,78 ± 0,030 ^b	74,05 ± 1,481 ^b	4,62 ± 0,095 ^c	0,46 ± 0,019 ^a	0,30 ± 0,009 ^a	0,18 ± 0,011 ^a
12	1201	9,07 ± 0,214 ^b	2,34 ± 0,025 ^a	70,60 ± 0,152 ^b	6,11 ± 0,028 ^b	0,48 ± 0,005 ^a	0,29 ± 0,002 ^b	0,20 ± 0,005 ^a
	1202	10,17 ± 0,322 ^a	2,15 ± 0,071 ^b	74,22 ± 0,638 ^a	7,46 ± 0,063 ^a	0,48 ± 0,008 ^a	0,32 ± 0,007 ^a	0,20 ± 0,012 ^a
	1203	10,32 ± 0,218 ^a	2,15 ± 0,068 ^b	75,38 ± 1,228 ^a	7,58 ± 0,127 ^a	0,49 ± 0,015 ^a	0,32 ± 0,019 ^{a,b}	0,20 ± 0,013 ^a
13	1301	8,61 ± 0,028 ^b	2,78 ± 0,088 ^a	76,10 ± 0,517 ^a	5,63 ± 0,002 ^b	0,52 ± 0,011 ^b	0,33 ± 0,010 ^a	0,22 ± 0,006 ^a
	1302	9,17 ± 0,064 ^a	2,52 ± 0,030 ^b	77,84 ± 0,344 ^a	6,06 ± 0,024 ^a	0,55 ± 0,008 ^a	0,32 ± 0,006 ^a	0,23 ± 0,006 ^a
	1303	8,74 ± 0,085 ^b	2,55 ± 0,074 ^b	77,29 ± 1,076 ^a	4,82 ± 0,075 ^c	0,48 ± 0,013 ^c	0,31 ± 0,019 ^a	0,20 ± 0,005 ^b
14	1401	13,86 ± 0,369 ^b	1,29 ± 0,071 ^b	53,70 ± 0,534 ^b	12,75 ± 0,185 ^b	0,61 ± 0,004 ^b	0,27 ± 0,008 ^b	0,20 ± 0,009 ^b
	1402	14,25 ± 0,184 ^b	1,50 ± 0,088 ^a	61,70 ± 0,240 ^a	13,08 ± 0,030 ^b	0,62 ± 0,017 ^{a,b}	0,31 ± 0,018 ^a	0,25 ± 0,020 ^a
	1403	15,35 ± 0,278 ^a	1,49 ± 0,030 ^a	60,53 ± 0,794 ^a	13,70 ± 0,158 ^a	0,65 ± 0,004 ^a	0,29 ± 0,008 ^{a,b}	0,21 ± 0,004 ^b
15	1501	9,06 ± 0,136 ^a	2,29 ± 0,080 ^b	75,72 ± 0,634 ^b	5,38 ± 0,015 ^c	0,43 ± 0,013 ^b	0,30 ± 0,009 ^a	0,21 ± 0,034 ^a
	1502	8,22 ± 0,212 ^b	2,73 ± 0,125 ^a	77,42 ± 0,443 ^a	5,90 ± 0,046 ^b	0,46 ± 0,006 ^a	0,31 ± 0,011 ^a	0,21 ± 0,011 ^a
	1503	8,29 ± 0,053 ^b	2,82 ± 0,029 ^a	78,31 ± 0,617 ^a	6,29 ± 0,065 ^a	0,47 ± 0,008 ^a	0,31 ± 0,011 ^a	0,20 ± 0,017 ^a

* Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 3). Médias seguidas pela mesma letra na coluna, para os lotes de uma mesma marca, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (95%).

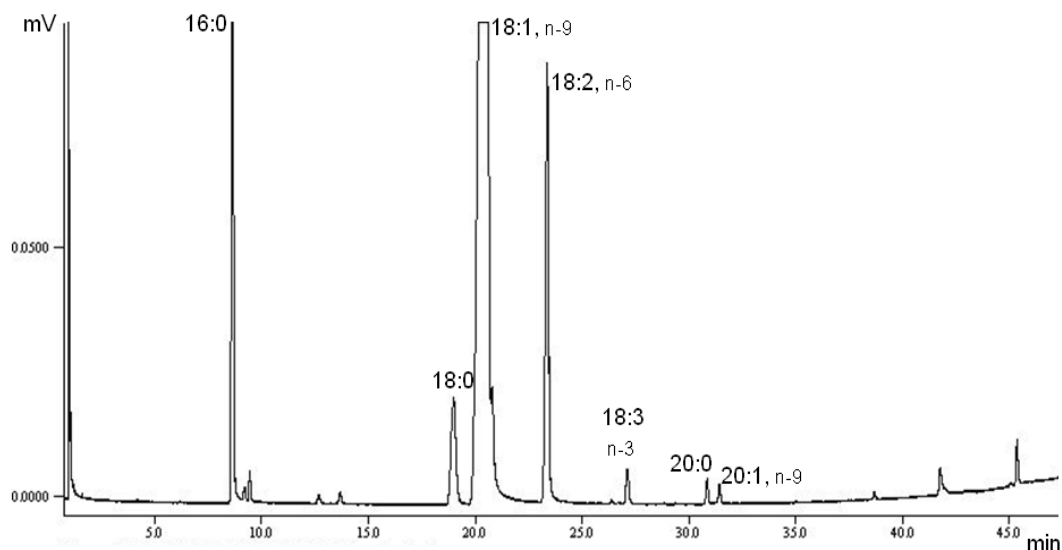


Figura 2.1. Perfil cromatográfico obtido para a análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos por GC-FID. As condições cromatográficas encontram-se descritas no item 2.4 da seção Material e Métodos. Identificação dos picos: 16:0 - éster metílico do ácido palmítico; 18:0 - éster metílico do ácido esteárico; 18:1 (n-9) - éster metílico do ácido oleico; 18:2 (n-6) - éster metílico do ácido linoleico; 18:3 (n-3) - éster metílico do ácido α -linolênico; 20:0 - éster metílico do ácido araquídico; 20:1 (n-9) - éster metílico do ácido gadoleico.

O método foi validado para os parâmetros repetibilidade e precisão intermediária, utilizando-se padrões. Os CVs para as áreas normalizadas obtidos na repetibilidade variaram entre 0,92 e 2,75% para o ácido palmítico; entre 2,31 e 4,20% para o ácido esteárico; entre 2,52 e 4,54% para o ácido oleico; entre 1,82 e 3,99% para o ácido linoleico; entre 1,89 e 3,37% para o ácido α -linolênico; entre 3,52 e 6,16% para o ácido araquídico; e entre 3,73 e 7,80% para o ácido gadoleico. Todos ficaram abaixo de 5%, com exceção do ácido araquídico e do ácido gadoleico. Já a precisão intermediária demonstrou resultados excelentes, com CVs de 1,29% para o ácido palmítico; 0,53% para o ácido esteárico; 0,79% para o ácido oleico; 0,81% para o ácido linoleico; 0,72% para o ácido α -linolênico; 1,58% para o ácido araquídico; e 1,83% para o ácido gadoleico. Com isto, pode-se observar que o método de separação empregado

na análise dos ácidos graxos possui boa precisão, tanto para injeções feitas no mesmo dia quanto para injeções em dias diferentes.

A legislação brasileira atual (BRASIL, 2005) determina que a composição em ácidos graxos do azeite de oliva deve corresponder aos limites fixados pelo Codex Alimentarius (CODEX STAN 33, 2009). Desse modo, todas as amostras analisadas estavam de acordo com as especificações do Codex Alimentarius, com exceção das amostras 501 (6,73% de ácido palmítico, sendo que o limite inferior é 7,5%), 502 (7,47% de ácido palmítico, sendo que o limite inferior é 7,5%) e 1401 (53,70% de ácido oleico, quando o limite inferior é de 55%). Como os valores obtidos não estão muito longe dos limites, a única maneira de ter certeza se eles estão de acordo ou não, levando-se em conta o erro experimental, é calculando o intervalo de confiança para as médias, a 95% de confiança. Assim, a média do ácido palmítico para a amostra 501 pode ser qualquer valor entre 6,16 e 7,30%, ou seja, realmente encontra-se abaixo do limite mínimo, bem como a média do ácido palmítico para a amostra 502 que pode ser qualquer valor entre 7,14 e 7,80. A média do ácido oleico para a amostra 1401 pode ser qualquer valor entre 52,37 e 55,03, não sendo possível afirmar que esta se encontra abaixo do limite inferior. Apesar de a amostra 501 apresentar menos ácido palmítico do que o estabelecido pela legislação, não se pode dizer que ela está com certeza adulterada, para isso, seriam necessárias outras análises. Além disso, o limite de confiança a 95% permite que em 5% das vezes o valor real esteja fora do limite calculado, podendo, assim, entrar na faixa estabelecida pela legislação. O Codex Alimentarius ainda não estipulou limites para o ácido α -linolênico, portanto, a comparação foi feita levando-se em conta o limite estabelecido pela legislação brasileira anterior

(BRASIL, 1999), mesmo esta tendo sido revogada, apenas para efeito de estudo. Neste caso, todas as amostras enquadraram-se no limite lá determinado (< 0,9% de ácido α -linolênico).

Na **Tabela 2.2** pode-se observar também que, entre os lotes de cada marca, existem diferenças significativas para alguns ácidos graxos. Isto demonstra que é difícil produzir lotes homogêneos para produtos de origem vegetal, pois são inúmeros os fatores que alteram a composição química das azeitonas e, conseqüentemente, do azeite produzido a partir delas. É por este motivo, também, que as faixas encontradas na legislação são relativamente amplas, pois a variação natural é bastante grande.

Para poder efetuar a comparação entre as diferentes marcas, optou-se por calcular a média dos valores dos três lotes de cada marca, resultando em apenas um valor para cada uma delas. Só então é que as marcas foram comparadas entre si através da ANOVA e do Teste de Tukey, ao nível de 95% de confiança. A **Tabela 2.3** mostra os resultados obtidos. Existe diferença significativa entre as diferentes marcas, para a grande maioria dos ácidos graxos analisados. Este fato era esperado, pois como existem diferenças entre os lotes de uma mesma marca, é evidente que as marcas irão se diferenciar, mesmo porque elas são provenientes de vários países, com diferentes climas, composição do solo, exposição à luz do sol e técnicas de cultivo.

Tabela 2.3. Teor médio de ácidos graxos para as diferentes marcas de azeite de oliva extravirgem.

Marcas	Teor de Ácidos Graxos (% Área Relativa)						
	16:0	18:0	18:1, n-9	18:2, n-6	18:3, n-3	20:0	20:1, n-9
1	9,19 ± 0,340 ^{c,d,e,f}	2,37 ± 0,115 ^{c,d,e}	73,83 ± 2,807 ^{a,b,c}	6,24 ± 0,500 ^{d,e,f}	0,52 ± 0,018 ^c	0,34 ± 0,023 ^{ab}	0,23 ± 0,018 ^{a,b,c}
2	8,73 ± 0,849 ^{e,f}	2,57 ± 0,192 ^{b,c,d}	73,65 ± 4,078 ^{b,c}	5,30 ± 0,334 ^{f,g,h}	0,50 ± 0,028 ^{c,d}	0,32 ± 0,019 ^{b,c,d,e}	0,21 ± 0,012 ^{a,b,c,d,e}
3	10,03 ± 1,434 ^{c,d}	2,17 ± 0,337 ^e	71,29 ± 3,847 ^c	7,85 ± 1,111 ^c	0,51 ± 0,027 ^{c,d}	0,30 ± 0,025 ^{c,d,e}	0,23 ± 0,028 ^{a,b,c}
4	10,35 ± 0,876 ^c	2,10 ± 0,129 ^{e,f}	71,96 ± 1,893 ^c	7,11 ± 1,015 ^{c,d}	0,53 ± 0,015 ^{b,c}	0,32 ± 0,011 ^{b,c,d,e}	0,23 ± 0,011 ^{a,b,c}
5	8,21 ± 1,701 ^f	2,41 ± 0,343 ^{c,d,e}	73,81 ± 1,723 ^{a,b,c}	7,53 ± 0,978 ^c	0,51 ± 0,023 ^{c,d}	0,31 ± 0,013 ^{c,d,e}	0,24 ± 0,016 ^a
6	8,94 ± 0,529 ^{d,e,f}	2,57 ± 0,096 ^{b,c,d}	75,16 ± 0,880 ^{a,b,c}	6,83 ± 0,080 ^{c,d,e}	0,53 ± 0,013 ^{b,c}	0,33 ± 0,016 ^{a,b,c}	0,22 ± 0,025 ^{a,b,c,d}
7	8,90 ± 0,248 ^{d,e,f}	2,78 ± 0,151 ^{ab}	77,99 ± 0,415 ^a	4,33 ± 0,386 ^h	0,44 ± 0,016 ^f	0,30 ± 0,015 ^{d,e}	0,19 ± 0,012 ^e
8	11,86 ± 0,295 ^b	1,79 ± 0,242 ^f	66,79 ± 2,807 ^d	9,04 ± 0,607 ^b	0,56 ± 0,022 ^b	0,30 ± 0,016 ^{c,d,e}	0,22 ± 0,012 ^{a,b,c,d}
9	8,80 ± 0,241 ^{e,f}	2,26 ± 0,096 ^{d,e}	73,77 ± 2,159 ^{a,b,c}	6,31 ± 0,545 ^{d,e,f}	0,51 ± 0,009 ^{c,d}	0,35 ± 0,019 ^a	0,24 ± 0,018 ^{ab}
10	8,61 ± 0,378 ^f	2,28 ± 0,157 ^{d,e}	73,23 ± 4,451 ^{b,c}	4,98 ± 0,535 ^{g,h}	0,51 ± 0,023 ^{c,d}	0,31 ± 0,021 ^{c,d,e}	0,21 ± 0,018 ^{b,c,d,e}
11	8,76 ± 0,347 ^{e,f}	2,89 ± 0,099 ^a	75,13 ± 2,062 ^{a,b,c}	4,89 ± 0,253 ^{g,h}	0,46 ± 0,014 ^{e,f}	0,31 ± 0,014 ^{c,d,e}	0,19 ± 0,013 ^{d,e}
12	9,85 ± 0,631 ^{c,d,e}	2,21 ± 0,109 ^e	73,40 ± 2,268 ^{b,c}	7,05 ± 0,714 ^{c,d}	0,48 ± 0,012 ^{d,e}	0,31 ± 0,018 ^{c,d,e}	0,20 ± 0,01 ^{c,d,e}
13	8,84 ± 0,261 ^{d,e,f}	2,62 ± 0,137 ^{a,b,c}	77,07 ± 0,991 ^{ab}	5,50 ± 0,545 ^{f,g}	0,51 ± 0,033 ^{c,d}	0,32 ± 0,014 ^{a,b,c,d}	0,22 ± 0,011 ^{a,b,c,d}
14	14,48 ± 0,714 ^a	1,43 ± 0,120 ^g	58,65 ± 3,774 ^e	13,17 ± 0,434 ^a	0,63 ± 0,019 ^a	0,29 ± 0,021 ^e	0,22 ± 0,026 ^{a,b,c}
15	8,52 ± 0,427 ^f	2,62 ± 0,258 ^{a,b,c}	77,15 ± 1,241 ^{ab}	5,86 ± 0,398 ^{e,f,g}	0,46 ± 0,019 ^{e,f}	0,31 ± 0,011 ^{c,d,e}	0,21 ± 0,021 ^{c,d,e}

* Valores expressos como média ± desvio padrão (n = 9). Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (95%).

3.3. Confirmação dos ésteres metílicos da amostra por GC/MS

Os ésteres metílicos de uma das amostras analisadas por GC-FID foram injetados no GC/MS para confirmação da identidade dos mesmos. Os espectros foram comparados com a biblioteca NIST 98 e com o espectro de massas do padrão correspondente. Considerando-se similaridades acima de 85%, todos os sete ésteres metílicos foram identificados positivamente, confirmando a identificação para a análise por GC-FID, feita apenas por comparação com o tempo de retenção dos padrões. Alguns outros picos não foram positivamente identificados como sendo de ésteres metílicos de ácidos graxos, em virtude da baixa similaridade dos espectros de massas. Também foram detectados picos, com tempo de retenção acima de 35 min, cujos espectros de massas correspondiam à moléculas com átomos de flúor (F) na estrutura, possivelmente artefatos produzidos durante a derivatização. Como todas as amostras apresentaram o mesmo perfil, as demais não foram injetadas no GC/MS. A **Figura 2.2** exibe o perfil cromatográfico obtido através do GC/MS para os ésteres metílicos de ácidos graxos de uma das amostras de azeite de oliva extravirgem. Os tempos de retenção diferiram daqueles do GC-FID porque a espessura do filme da fase estacionária da coluna usada no GC/MS era maior, o que reteve os compostos por mais tempo.

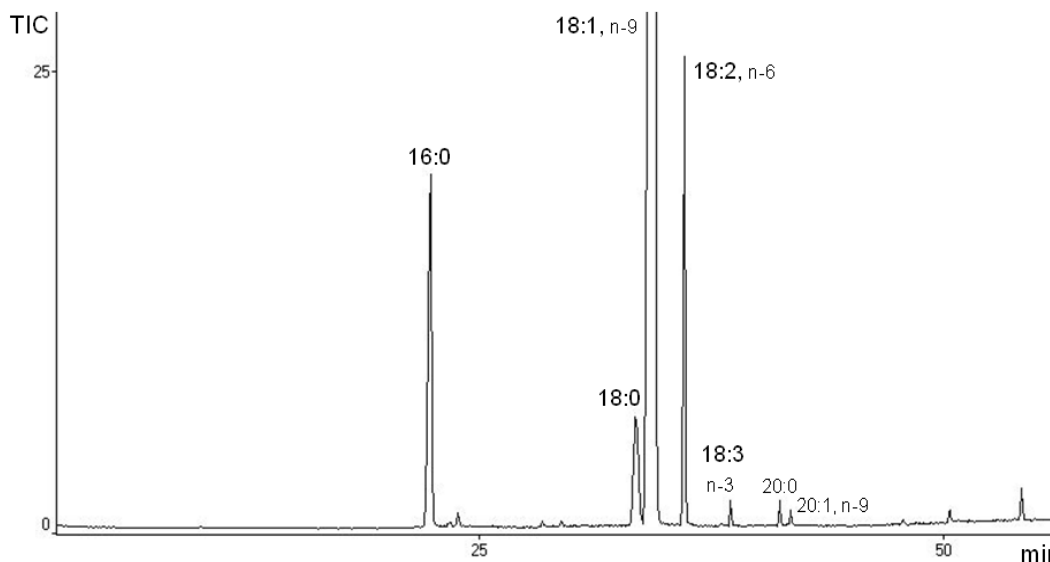


Figura 2.2. Perfil cromatográfico obtido para a análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos por GC/MS. As condições cromatográficas encontram-se descritas no item 2.5 da seção Material e Métodos. Identificação dos picos: 16:0 - éster metílico do ácido palmítico; 18:0 - éster metílico do ácido esteárico; 18:1 (n-9) - éster metílico do ácido oleico; 18:2 (n-6) - éster metílico do ácido linoleico; 18:3 (n-3) - éster metílico do ácido α -linolênico; 20:0 - éster metílico do ácido araquídico; 20:1 (n-9) - éster metílico do ácido gadoleico.

3.4. Análise de Componentes Principais (PCA)

O objetivo da análise de componentes principais é descrever um grande número de variáveis em termos de um número menor de fatores, os componentes principais e, no processo, obter uma melhor compreensão do relacionamento destas variáveis. O cálculo dos componentes principais é feito através da combinação linear das variáveis em estudo. Os melhores resultados são obtidos quando as variáveis originais são altamente correlacionadas, positivamente ou negativamente. Reduzir o número de variáveis para representá-las em gráficos bidimensionais é de grande valia para a análise dos dados, porém, a desvantagem é que alguma diferença-chave entre os objetos pode ser perdida na redução. Para reduzir este problema, pode-se gerar diversos gráficos bidimensionais relacionando os diferentes componentes

principais (BERRUETA, ALONSO-SALCES & HÉBERGER, 2007; MANLY, 2008).

A **Figura 2.3** mostra o gráfico dos pesos (“*loading graph*”) para os dois primeiros componentes principais, os quais representam 83,98% da variância, o que indica que as variáveis originais são altamente correlacionadas. Os FAMES 18:0 e 18:1 (n-9), no lado direito do gráfico, estão bem próximos, o que revela uma alta correlação positiva entre eles. Estes dois compostos, por sua vez, possuem forte correlação negativa com os FAMES 16:0, 18:2 (n-6) e 18:3 (n-3), que estão do lado esquerdo do gráfico. Os FAMES 20:0 e 20:1 (n-9), no topo do gráfico, possuem correlação negativa com o 16:0, que está na parte inferior do gráfico.

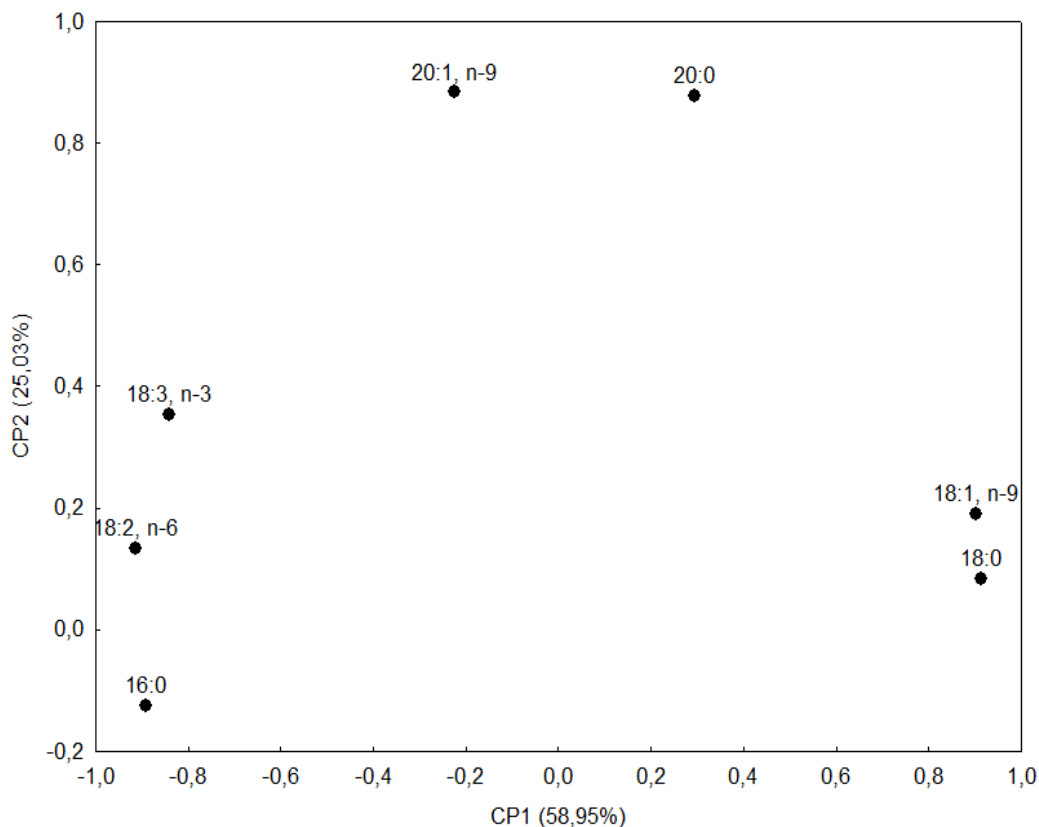


Figura 2.3. Gráfico dos pesos (“*loading graph*”) mostrando o primeiro e o segundo componentes principais para os valores das respostas.

A **Figura 2.4** apresenta o gráfico dos escores (“*score graph*”) para os dois primeiros componentes principais. Não foi possível agrupar todas as amostras conforme o país de origem, exceto pelas amostras da Argentina (14), que foram eficientemente separadas das demais pelo primeiro componente principal e agrupadas no lado esquerdo do gráfico. Uma amostra da Espanha (8) também foi separada, apesar de um lote estar mais afastado dos demais. Deve-se notar que existe um comportamento muito interessante proporcionando essa separação. As amostras da Argentina (14) possuem o teor mais baixo de 18:0 e 18:1 (n-9) e o teor mais alto de 16:0, 18:2 (n-6) e 18:3 (n-3), o que corresponde ao observado no gráfico dos pesos, onde estes dois grupos de respostas demonstraram possuir forte correlação negativa. Seguindo para a direita no gráfico dos escores, o teor de 18:0 e 18:1 (n-9) aumenta, enquanto que o teor de 16:0, 18:2 (n-6) e 18:3 (n-3) diminui. Foi possível verificar que os lotes de algumas amostras se agruparam eficientemente com o primeiro componente principal, enquanto para outras houve bastante dispersão entre os lotes. O segundo componente principal não foi muito eficiente para o agrupamento, mostrando apenas que dois lotes de duas amostras da Grécia (1 e 9) dispuseram-se bem no topo do gráfico de escores por apresentarem teor um pouco mais alto de 20:0 e 20:1 (n-9) correlacionado a um teor menor de 16:0.

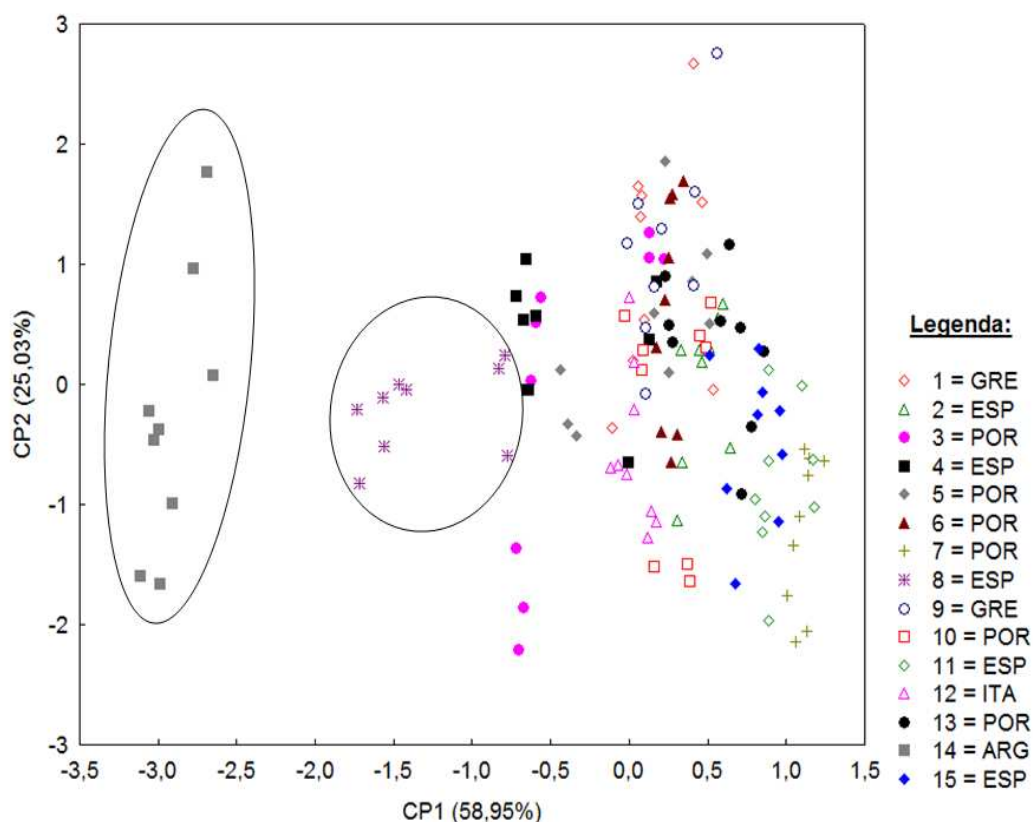


Figura 2.4. Gráfico dos escores ("score graph") mostrando o primeiro e o segundo componentes principais para os valores das respostas. Siglas dos países de origem: GRE = Grécia; ESP = Espanha; POR = Portugal; ITA = Itália; ARG = Argentina.

4. CONCLUSÃO

A técnica GC-FID foi eficientemente aplicada na determinação da composição em ácidos graxos das amostras de azeite de oliva extravirgem. Os resultados da validação demonstraram boa repetibilidade e precisão intermediária, o que proporcionou maior confiabilidade aos resultados. O emprego do GC/MS para confirmar a identidade dos ésteres metílicos das amostras garantiu uma identificação positiva e mais acurada dos compostos analisados.

Com base no teor de ácidos graxos, nenhuma das amostras apresentou indícios de adulteração. A única exceção foi um valor estatisticamente inferior

ao limite mínimo para o ácido palmítico em um dos lotes da amostra nº 5. Apesar disso, não há como afirmar que o mesmo encontrava-se adulterado, pois seriam necessárias outras análises confirmatórias, não realizadas neste trabalho.

A Análise de Componentes Principais permitiu utilizar a composição em ácidos graxos para separar as amostras provenientes da Argentina das amostras dos demais países, bem como agrupar os diferentes lotes de algumas marcas. Além disso, esta análise estatística forneceu conclusões valiosas sobre as correlações existentes entre alguns grupos de ácidos graxos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PRODUTORES, IMPORTADORES E

COMERCIANTES DE AZEITE DE OLIVA. Disponível em:
<<http://oliva.org.br/index.asp>>. Acesso em: 03 de janeiro de 2010.

AUED-PIMENTEL, S.; TAKEMOTO, E.; MINAZZI-RODRIGUES, R. S.;
BADOLATO, E. S. G. Azeite de oliva: incidência de adulterações entre os
anos de 1993 a 2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 61, p. 69-75,
2002.

BERRUETA, L. A.; ALONSO-SALCES, R. M.; HÉBERGER, K. Supervised
pattern recognition in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v.
1158, p. 196-214, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde, RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005.

**Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme
vegetal.** Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde, RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999.

Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1999.

CICERALE, S.; CONLAN, X. A.; SINCLAIR, A. J.; KEAST, R. S. J. Chemistry and Health of Olive Oil Phenolics. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 218-236, 2009.

CODEX STAN 33. **Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils.** Codex Alimentarius Commission, FAO/WHO. Revision 2 (2003). Amendment in 2009.

CONDE, C.; DELROT, S.; GERÓS, H. Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1545-1562, 2008.

COVAS, M. Olive oil and the cardiovascular system. **Pharmacological Research**, v. 55, p. 175-186, 2007.

DOURTOGLOU, V. G.; DOURTOGLOU, T.; ANTONOPOULOS, A.; STEFANOPOULOS, E.; LALAS, S.; POULOS, C. Detection of Olive Oil Adulteration Using Principal Component Analysis Applied on Total and Regio FA Content. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, p. 203-208, 2003.

FARKAS, O.; ZENKEVICH, I. G.; STOUT, F.; KALIVAS, J. H.; HÉBERGER, K. Prediction of retention indices for identification of fatty acid methyl esters. **Journal of Chromatography A**, v. 1198-1199, p. 188-195, 2008.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos.** DOQ-CGCRE-008, Rio de Janeiro: INMETRO, 2003.

- JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary Column Gas Chromatographic Method for Analysis of Encapsulated Fish Oils and Fish Oil Ethyl Esters: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**, v. 75, n. 3, p. 488-506, 1992.
- MANLY, B. J. F. **Métodos Estatísticos Multivariados – Uma Introdução**. 3. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.
- MILINSK, M. C.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V.; OLIVEIRA, C. C.; SOUZA, N. E. Comparative Analysis of Eight Esterification Methods in the Quantitative Determination of Vegetable Oil Fatty Acid Methyl Esters (FAME). **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 1475-1483, 2008.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- SERVILI, M.; MONTEDORO, G. Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, p. 602-613, 2002.
- THOMPSON, R. H. Simplifying Fatty Acid Analyses in Multicomponent Foods with a Standard Set of Isothermal GLC Conditions Coupled with ECL Determinations. **Journal of Chromatographic Science**, v.34, p. 495-504, 1996.
- THURNHOFER, S.; VETTER, W. Application of Ethyl Esters and d_3 -Methyl Esters as Internal Standards for the Gas Chromatographic Quantification of Transesterified Fatty Acid Methyl Esters in Food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3209-3214, 2006.

TORRES, A. G.; TRUGO, N. M.; TRUGO, L. C. Mathematical Method for the Prediction of Retention Times of Fatty Acid Methyl Esters in Temperature-Programmed Capillary Gas Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4156-4163, 2002.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Chemical Composition of Selected Edible Nut Seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4705-4714, 2006.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B. **Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação**. São Paulo: Varela, 2006.

VISENTAINER, J. V.; GOMES, S. T. M.; HAYASHI, C.; SANTOS-JÚNIOR, O. O.; SILVA, A. B. M.; JUSTI, K. C.; SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M. Efeito do tempo de fornecimento de ração suplementada com óleo de linhaça sobre a composição físico-química e de ácidos graxos em cabeças de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 478-484, 2003.

CAPÍTULO 3

**OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO DE 13 COMPOSTOS FENÓLICOS
PRESENTES EM AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM POR ELETROFORESE
CAPILAR**

Cristiano Augusto Ballus,¹ Adriana Dillenburg Meinhart,¹ Roy Edward Bruns,² e
Helena Teixeira Godoy¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de
Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121,
13083-862, Campinas, SP, Brasil

² Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
CP 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brasil

RESUMO

O azeite de oliva extravirgem é obtido das azeitonas somente por meios mecânicos, o que permite a retenção de diversos compostos minoritários, entre eles os compostos fenólicos. Estes possuem elevada atividade antioxidante e contribuem para os benefícios à saúde proporcionados pelo consumo do azeite de oliva. O objetivo deste trabalho foi otimizar a separação de 13 compostos fenólicos presentes em azeite de oliva extravirgem utilizando a técnica de eletroforese capilar (CE), empregando técnicas estatísticas multivariadas na busca pela melhor resolução. O conjunto de compostos fenólicos foi formado por tirosol, hidroxitirosol, oleuropeína glicosídeo, ácido ferrúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido cafeico, luteolina, apigenina, ácido vanílico e ácido 3,4-dihidroxibenzoico. Foi conduzido um planejamento composto central com as variáveis concentração de tetraborato de sódio (TBS), pH e voltagem. Em seguida, foram empregados três critérios elementares para verificar a qualidade da separação: resolução (R_S), retenção relativa (R_R) e fator de retenção (k). Nenhum dos critérios permitiu a obtenção de modelos sem falta de ajuste, o que impediu o uso destes para prever uma possível condição ótima. Assim, observando-se os resultados empíricos obtidos no planejamento, a condição que proporcionou a separação dos compostos fenólicos em 28 min foi 35 mmol L⁻¹ de TBS em pH 9,1, voltagem de 30 kV, capilar de 50 µm d. i. x 72 cm comprimento efetivo com bulbo estendido, 25° C, injeção de 50 mbar por 5 s e detecção a 210 nm.

Palavras-chave: azeite de oliva; compostos fenólicos; eletroforese capilar; planejamento composto central; otimização; separação

1. INTRODUÇÃO

O azeite de oliva virgem é obtido do fruto das oliveiras (*Olea europaea* L.) somente por meios mecânicos, sem nenhum outro tratamento além de lavagem, filtração, decantação ou centrifugação, o que contribui para a retenção dos compostos minoritários originalmente presentes no fruto da oliveira (CARRASCO-PANCORBO et al., 2004).

Os triacilgliceróis respondem por 98% da composição química do azeite de oliva, sendo sua principal característica a abundância de ácido oleico (18:1, n-9), que varia entre 55 e 83% do total de ácidos graxos (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b; SERVILI et al., 2009). Os demais 2% são formados por mais de 230 compostos químicos, como álcoois triterpênicos e alifáticos, esteróis, hidrocarbonetos, compostos voláteis e compostos fenólicos (CARRASCO-PANCORBO et al., 2005b).

Compostos fenólicos são metabólitos secundários das plantas, com uma grande diversidade estrutural e uma ampla distribuição filogenética (VINHA et al., 2005; BOUDET, 2007). Eles contribuem significativamente para a estabilidade oxidativa do óleo e são os principais responsáveis pelo sabor amargo, adstringência e pungência do azeite de oliva (RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, APETREI & DE SAJA, 2008; INAREJOS-GARCIA et al., 2009).

Os compostos fenólicos já identificados e quantificados em azeite de oliva pertencem às classes de fenil-etil-álcoois (como hidroxitirosol e tirosol), ácidos fenólicos (como o ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, etc.), lignanas [(+)-pinoresinol e (+)-1-acetoxipinoresinol], secoiridóides (vários derivados agliconas da oleuropeína e ligstrosídeo) e flavonóides (luteolina e apigenina) (CARRASCO-PANCORBO et al., 2006a).

Nos últimos anos, a eletroforese capilar (CE) mostrou-se uma técnica atrativa, permitindo a combinação de tempos de análise curtos e alta eficiência de separação para a análise dos componentes dos alimentos, particularmente para os compostos fenólicos de azeite de oliva extravirgem (GÓMEZ-CARAVACA et al., 2005). A maioria dos métodos emprega metodologias de eletroforese capilar de zona (CZE), utilizando tampão borato em pH alcalino (MORIN, VILLARD & DREUX, 1993a; MORIN, VILLARD & DREUX, 1993b; MAMAN et al., 1996; JÁC, POLÁSEK & POSPÍSILOVÁ, 2006). A separação por CZE é baseada na migração diferencial de compostos ionizados, causada pelas diferenças na sua relação m/z (massa/carga), em um líquido condutor acondicionado em um capilar, sob a influência de um campo elétrico produzido por alta voltagem (JÁC, POLÁSEK & POSPÍSILOVÁ, 2006). Inúmeros estudos utilizaram CE para avaliar a composição de compostos fenólicos em azeite de oliva virgem (BENDINI et al., 2003; BONOLI et al., 2003; BONOLI et al., 2004; CARRASCO-PANCORBO et al., 2004; PRIEGO-CAPOTE, RUIZ-JIMÉNEZ & DE CASTRO, 2004; WANG & HUANG, 2004; GÓMEZ-CARAVACA et al., 2005; CARRASCO-PANCORBO et al., 2006a; CARRASCO-PANCORBO et al., 2006b; CARRASCO-PANCORBO et al., 2009).

O desenvolvimento de um método de separação por eletroforese capilar é um procedimento em que muitas variáveis podem afetar a seletividade da separação, principalmente as características do tampão de corrida, a voltagem e a temperatura do capilar. Para resolver estes problemas, empregam-se metodologias multivariadas. Esta abordagem possui vantagens em termos da redução no número de experimentos, possibilidades aperfeiçoadas de interpretação estatística e redução do tempo total necessário para a análise

dos dados. Este tipo de metodologia foi aplicado com sucesso para melhorar os resultados analíticos em eletroforese capilar (RONDA et al., 2008; MEINHART et al., 2010).

Apesar da grande quantidade de trabalhos utilizando CE, nenhum deles empregou técnicas estatísticas multivariadas para otimizar a separação dos compostos, bem como não há métodos que tenham separado simultaneamente o conjunto de fenólicos formado por tirosol, hidroxitirosol, oleuropeína glicosídeo, ácido ferrúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido cafeico, luteolina, apigenina, ácido vanílico e ácido 3,4-dihidroxibenzoico. O objetivo deste trabalho foi otimizar a separação destes 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem, empregando técnicas estatísticas multivariadas, de forma a obter-se uma separação eficiente com o menor tempo de corrida.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Os padrões de tirosol, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido cinâmico, ácido vanílico, ácido ferrúlico, luteolina e apigenina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). O padrão de hidroxitirosol foi adquirido da Cayman Chemical (EUA) e o padrão de oleuropeína glicosídeo foi adquirido da Extrasynthese (França). Também foram utilizados metanol p.a. (Synth, Brasil), metanol grau HPLC (J. T. Baker, EUA), tetraborato de sódio (TBS) (Sigma-Aldrich, EUA), hidróxido de sódio p.a. (Nuclear, Brasil), ácido clorídrico p.a. (Synth, Brasil). A

água foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). As soluções foram filtradas em filtros Millipore com 0,45 μm (Millipore, EUA) e sonicadas durante 5 min antes da injeção.

As soluções estoque dos padrões foram preparadas em metanol grau HPLC, filtradas em membrana de 0,45 μm e armazenadas a -18°C e protegidas da luz. Uma solução trabalho foi preparada em metanol:água (60:40), com 32,1 mg L^{-1} de todos os compostos, exceto para o ácido cafeico, ácido gálico e ácido 3,4-dihidroxibenzoico, cujas concentrações resultaram em 52,3 mg L^{-1} , e da luteolina, cuja concentração foi de 64,2 mg L^{-1} . Esta mistura dos 13 compostos foi utilizada em todos os experimentos de otimização.

2.2. Equipamento

O equipamento utilizado foi um sistema de eletroforese capilar Agilent G1600AX (Agilent Technologies, Germany), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), injetor automático e sistema de controle de temperatura ajustado em 25°C . Utilizou-se um capilar de sílica fundida com 50 μm de diâmetro por 72 cm de comprimento efetivo, com bulbo estendido (Agilent Technologies, Germany). A detecção foi realizada a 210 nm. A análise e o tratamento dos dados foram realizados no *software HP ChemStation*.

Os capilares novos foram ativados e condicionados por lavagem com pressão de 1 bar, usando uma solução aquosa de NaOH 1 mol L^{-1} durante 30 min, seguido de 10 min de água. No início de cada dia de trabalho, o capilar foi condicionado durante 5 min com NaOH 1 mol L^{-1} , seguido de 5 min com água purificada em sistema Milli-Q e 10 min de eletrólito. No final do dia foi

realizada uma limpeza do capilar com lavagem por 5 min com NaOH 1 mol L⁻¹ e 5 min de água Milli-Q. O capilar foi armazenado em água durante a noite.

2.3. Planejamento dos experimentos e tratamento dos dados

Para descobrir uma condição ótima de separação para os 13 compostos fenólicos estudados, inicialmente foi utilizado um planejamento composto central, com pontos centrais e axiais (BOX, HUNTER & HUNTER, 2005; BRUNS, SCARMINIO & BARROS NETO, 2006).

As variáveis escolhidas foram a concentração do eletrólito tetraborato de sódio (TBS), o pH e a voltagem (V), pois estes parâmetros interferem significativamente na separação por eletroforese capilar. Os níveis de cada variável foram definidos com base nos diversos estudos empregando TBS como eletrólito, disponíveis na literatura (BENDINI et al., 2003; BONOLI et al., 2003; BONOLI et al., 2004; CARRASCO-PANCORBO et al., 2004; PRIEGO-CAPOTE, RUIZ-JIMÉNEZ & DE CASTRO, 2004; WANG & HUANG, 2004; GÓMEZ-CARAVACA et al., 2005; CARRASCO-PANCORBO et al., 2006a; CARRASCO-PANCORBO et al., 2006b; CARRASCO-PANCORBO et al., 2009).

Para o TBS, os níveis foram de 18 (-1,68) a 52 (+1,68) mmol L⁻¹; o pH foi avaliado entre 8,6 e 9,6; e a voltagem entre 22 e 30 kV. Todas as condições do planejamento composto central foram injetadas com 50 mbar por 5 s, temperatura de 25°C e detecção a 210 nm. O ponto central foi analisado em quadruplicata, totalizando 18 experimentos. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória. Antes de cada condição do planejamento foi feito um condicionamento de 5 min de NaOH 1 mol L⁻¹, 5 min de água e 10 min

do eletrólito da condição em questão, a fim de estabilizar o capilar. Cada condição foi injetada em duplicata, sendo que entre as corridas da mesma condição o capilar foi condicionado por 2 min com o eletrólito. Apenas a segunda injeção foi considerada, pois existe a possibilidade de a primeira corrida após um longo condicionamento ser afetada pelo mesmo, o que iria conduzir a resultados não confiáveis.

Como resposta, três critérios elementares das técnicas de separação foram avaliados, para verificar quais produziam modelos sem falta de ajuste e permitissem avaliar a qualidade da separação em cada condição. Baseando-se no estudo de Breitzkreitz, Jardim & Bruns (2009), foram testadas as respostas resolução (R_S), retenção relativa (R_R) e fator de retenção (k). Estas respostas foram calculadas para cada composto, no caso do fator de retenção (total de 13 respostas), ou para pares de compostos que coeluíram em pelo menos uma das condições testadas, no caso da R_S e da R_R (foram obtidas 8 respostas para R_S e 7 respostas para R_R). Os modelos foram validados através da Análise de Variância (ANOVA, 95% de confiança). O tratamento dos dados foi feito através do software Design Expert 6.0.10 (Minneapolis, EUA). A **Tabela 3.1** exibe a matriz do planejamento composto central.

Tabela 3.1. Matriz do planejamento composto central utilizando TBS.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	1	2	3	TBS (mmol L ⁻¹)	pH	Voltagem (kV)
1	-1	-1	-1	25	8,8	24
2	1	-1	-1	45	8,8	24
3	-1	1	-1	25	9,4	24
4	1	1	-1	45	9,4	24
5	-1	-1	1	25	8,8	28
6	1	-1	1	45	8,8	28
7	-1	1	1	25	9,4	28
8	1	1	1	45	9,4	28
9	-1,68	0	0	18	9,1	26
10	1,68	0	0	52	9,1	26
11	0	-1,68	0	35	8,6	26
12	0	1,68	0	35	9,6	26
13	0	0	-1,68	35	9,1	22
14	0	0	1,68	35	9,1	30
15	0	0	0	35	9,1	26
16	0	0	0	35	9,1	26
17	0	0	0	35	9,1	26
18	0	0	0	35	9,1	26

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Seleção da resposta para o planejamento composto central

Existem dois tipos de critérios que podem ser utilizados como respostas do planejamento para descrever a qualidade da separação: critérios elementares, como resolução (R_S) e retenção relativa (R_R), os quais descrevem a separação de pares de compostos; e funções objetivas, as quais são combinações de critérios elementares feitas por meio de diferentes operações matemáticas, como soma, logaritmo ou produto. Embora as funções objetivas sejam combinações de critérios elementares, elas podem não refletir a qualidade total do processo de separação, e a escolha dos pesos dos diferentes fatores é arbitrária e depende completamente do pesquisador. Além disso, em geral

produz modelos com significativa falta de ajuste (BREITKREITZ, 2007; BREITKREITZ, JARDIM & BRUNS, 2009).

Assim, optou-se por trabalhar diretamente com os critérios elementares, sendo que a R_S foi a primeira resposta a ser avaliada, já que se trata de um dos parâmetros que melhor permite estimar a qualidade de separação entre pares de compostos. Em seguida, foram avaliados a retenção relativa (R_R) e o fator de retenção (k).

3.1.1. Validação dos modelos construídos com a resposta Resolução (R_S)

Foram calculadas as resoluções entre todos os pares de compostos que coeluíram em qualquer uma das condições experimentais avaliadas. Com isso, foram obtidas oito respostas no total: solvente/tirosol (SOLV/TIR); ácido cinâmico/ácido ferrúlico (CIN/FER); apigenina/luteolina (APIG/LUTEOL); luteolina/ácido *p*-hidroxibenzoico (LUTEOL/P-HIDROXI); ácido ferrúlico/apigenina (FER/APIG); ácido *p*-cumárico/apigenina (P-CUM/APIG); ácido *p*-cumárico/luteolina (P-CUM/LUTEOL); e ácido ferrúlico/luteolina (FER/LUTEOL). A **Tabela 3.2** sumariza todos os resultados.

Tabela 3.2. Valores de resolução (R_s) calculados para os pares de compostos que coeluíram nas condições do planejamento.

Ensaio	Resolução (R_s)							
	SOLV/TIR	CIN/FER	APIG/LUTEOL	LUTEOL/P-HIDRO	FER/APIG	P-CUM/APIG	P-CUM/LUTEOL	FER/LUTEOL
1	4,22	4,73	16,94	2,62	12,99	0,00	16,94	29,16
2	4,20	6,39	17,46	10,18	15,61	2,22	14,07	30,16
3	6,88	34,44	0,83	28,53	7,60	10,05	8,18	4,72
4	9,64	37,39	3,63	43,59	5,75	16,29	18,91	1,84
5	3,60	5,20	16,90	2,88	12,68	0,00	16,90	29,70
6	4,16	7,43	17,53	11,03	15,68	2,04	15,30	31,25
7	6,99	39,25	2,15	33,29	5,89	11,65	12,15	2,94
8	9,65	40,55	3,04	44,45	7,67	14,32	15,71	3,87
9	4,68	14,30	9,66	7,03	10,78	0,00	9,66	22,64
10	8,52	26,60	5,50	29,86	13,61	6,90	1,19	18,74
11	3,53	3,80	19,59	0,00	12,14	2,36	17,64	27,66
12	9,89	38,34	6,60	59,55	0,00	17,92	29,79	6,60
13	4,41	17,25	7,63	17,99	11,77	3,33	4,61	17,97
14	4,32	20,90	8,29	19,68	14,69	3,23	5,10	20,56
15	4,10	21,18	6,86	19,32	12,37	3,76	3,43	18,08
16	4,41	20,78	7,58	20,04	13,81	3,65	4,15	19,57
17	4,39	21,43	7,51	19,50	14,16	3,70	3,97	19,72
18	3,96	20,93	7,72	19,82	13,75	3,61	4,19	20,01

Pares de picos: SOLV/TIR = solvente/tirosol; CIN/FER = ácido cinâmico/ácido ferrúlico; APIG/LUTEOL = apigenina/luteolina; LUTEOL/P-HIDROXI = luteolina/ácido *p*-hidroxibenzoico; FER/APIG = ácido ferrúlico/apigenina; P-CUM/APIG = ácido *p*-cumárico/apigenina; P-CUM/LUTEOL = ácido *p*-cumárico/luteolina; FER/LUTEOL = ácido ferrúlico/luteolina.

A resolução entre os pares foi calculada através da equação: $R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$, onde t = tempo de migração e w = largura da base do pico.

Foram construídos modelos lineares e quadráticos para cada uma das oito respostas, e cada um deles foi validado através da Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 95% de confiança. A **Tabela 3.3** mostra os resultados da ANOVA para os modelos empregando R_s .

Tabela 3.3. Resumo da ANOVA considerando a significância estatística da regressão e a falta de ajuste dos modelos quadráticos empregando-se a resolução como resposta.

Par de compostos	Regressão		Falta de Ajuste	
	MQ_R/MQ_r	$F_{9,8,95\%}$	MQ_{faj}/MQ_{ep}	$F_{5,3,95\%}$
SOLV/TIR	78,73		3,54	
CIN/FER	16,38		353,17	
APIG/LUTEOL	8,89		73,72	
LUTEOL/P-HIDROXI	130,72		56,39	
FER/APIG	43,41	3,39	1,32	9,01
P-CUM/APIG	34,33		691,44	
P-CUM/LUTEOL	4,60		256,23	
FER/LUTEOL	6,96		51,53	

MQ_R = Média Quadrática devida à regressão; MQ_r = Média Quadrática devida ao resíduo; MQ_{faj} = Média Quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} = Média Quadrática devida ao erro puro.
Pares de picos: SOLV/TIR = solvente/tirosol; CIN/FER = ácido cinâmico/ácido ferrúlico; APIG/LUTEOL = apigenina/luteolina; LUTEOL/P-HIDROXI = luteolina/ácido *p*-hidroxibenzoico; FER/APIG = ácido ferrúlico/apigenina; P-CUM/APIG = ácido *p*-cumárico/apigenina; P-CUM/LUTEOL = ácido *p*-cumárico/luteolina; FER/LUTEOL = ácido ferrúlico/luteolina.

Com base na **Tabela 3.3**, pode-se verificar que praticamente todos os modelos apresentaram uma significativa falta de ajuste, pois MQ_{faj}/MQ_{ep} resultou maior do que o F crítico (9,01), com exceção dos pares SOLV/TIR (3,54) e FER/APIG (1,32). Sendo assim, estes modelos não podem ser

utilizados para a realização de previsões, inviabilizando o uso da R_S como resposta para o planejamento, mesmo que todos os modelos tenham apresentado regressão significativa (valor de MQ_R/MQ_r foi maior que o valor do F crítico = 3,39). A incapacidade de os modelos se adequarem às respostas do tipo R_S pode estar relacionada com o fato de que em diversos momentos ocorreu alteração na ordem de migração dos compostos. Em trabalho de Breitzkreitz, Jardim & Bruns (2009), os autores verificaram este mesmo problema quando ocorria alteração na ordem de eluição dos compostos de interesse.

3.1.2. Validação dos modelos construídos com a resposta Retenção Relativa (R_R)

Em vista da ineficácia da resposta resolução, outro critério elementar, a retenção relativa (R_R), foi empregado para a construção dos modelos. A retenção relativa é calculada pela divisão do fator de retenção, k , do composto mais retido pelo k do composto menos retido. O k , por sua vez, é calculado diminuindo-se o tempo de migração de um composto neutro [tempo morto, neste caso, o tempo de migração do solvente, que é igual ao do fluxo eletrosmótico (FEO)] do tempo de migração do composto, e dividindo-se esse resultado pelo tempo de migração do composto neutro. Assim, não há mais a resposta SOLV/TIR, já que o fator de retenção para o solvente é zero, e qualquer número dividido por zero resulta em infinito. Neste caso, restaram sete respostas. A terminologia empregada para os critérios elementares se baseia na teoria da cromatografia, porém, como o trabalho foi desenvolvido utilizando a técnica de eletroforese capilar, o melhor seria chamar o valor k de

fator de migração, ao invés de retenção, pois na eletroforese capilar de zona temos que os compostos são separados pela migração diferencial dos mesmos. Não há fase estacionária, e assim, não faz sentido falar em retenção. Portanto, a partir deste momento, os termos serão adaptados para corresponderem melhor aos mecanismos da eletroforese capilar de zona. A **Tabela 3.4** reúne os resultados para R_R .

Tabela 3.4. Valores de retenção relativa (R_R) calculados para os pares de compostos que coeluíram nas condições do planejamento.

Ensaio	Retenção Relativa (R_R)						
	CIN/FER	APIG/LUTEOL	LUTEOL/P-HIDRO	FER/APIG	P-CUM/APIG	P-CUM/LUTEOL	FER/LUTEOL
1	1,05	1,20	1,03	1,14	1,00	1,20	1,37
2	1,07	1,20	1,14	1,16	1,02	1,17	1,39
3	1,41	1,01	1,40	1,06	1,09	1,10	1,05
4	1,53	1,04	1,73	1,06	1,16	1,21	1,02
5	1,06	1,20	1,03	1,14	1,00	1,20	1,37
6	1,08	1,19	1,14	1,17	1,02	1,17	1,39
7	1,44	1,02	1,44	1,05	1,10	1,12	1,03
8	1,49	1,03	1,65	1,07	1,14	1,17	1,04
9	1,15	1,12	1,08	1,12	1,00	1,12	1,26
10	1,29	1,06	1,42	1,14	1,07	1,01	1,20
11	1,04	1,32	1,00	1,14	1,03	1,29	1,50
12	1,69	1,09	2,01	1,00	1,24	1,35	1,09
13	1,21	1,08	1,23	1,13	1,03	1,05	1,22
14	1,21	1,08	1,22	1,13	1,03	1,05	1,22
15	1,23	1,07	1,25	1,12	1,04	1,03	1,20
16	1,22	1,08	1,24	1,13	1,03	1,04	1,21
17	1,23	1,07	1,25	1,13	1,03	1,04	1,21
18	1,22	1,08	1,24	1,13	1,03	1,04	1,22

Pares de picos: CIN/FER = ácido cinâmico/ácido ferrúlico; APIG/LUTEOL = apigenina/luteolina; LUTEOL/P-HIDROXI = luteolina/ácido *p*-hidroxibenzoico; FER/APIG = ácido ferrúlico/apigenina; P-CUM/APIG = ácido *p*-cumárico/apigenina; P-CUM/LUTEOL = ácido *p*-cumárico/luteolina; FER/LUTEOL = ácido ferrúlico/luteolina.

A retenção relativa entre os pares foi calculada através da equação: $R_R = \frac{k_2}{k_1}$, onde k é o fator de "migração".

De posse dos valores de R_R , os modelos lineares e quadráticos foram calculados e submetidos à validação através de ANOVA, cujos resultados estão expressos na **Tabela 3.5**.

Tabela 3.5. Resumo da ANOVA considerando a significância estatística da regressão e a falta de ajuste dos modelos quadráticos empregando-se a retenção relativa como resposta.

Par de compostos	Regressão		Falta de Ajuste	
	MQ_R/MQ_r	$F_{9,8,95\%}$	MQ_{faj}/MQ_{ep}	$F_{5,3,95\%}$
CIN/FER	262,92		20,99	
APIG/LUTEOL	26,19		139,76	
LUTEOL/P-HIDROXI	59,68		2478,98	
FER/APIG	132,99	3,39	4,58	9,01
P-CUM/APIG	187,33		46,42	
P-CUM/LUTEOL	10,35		222,80	
FER/LUTEOL	18,43		97,95	

MQ_R = Média Quadrática devida à regressão; MQ_r = Média Quadrática devida ao resíduo; MQ_{faj} = Média Quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} = Média Quadrática devida ao erro puro.
 Pares de picos: SOLV/TIR = solvente/tirosol; CIN/FER = ácido cinâmico/ácido ferrúlico; APIG/LUTEOL = apigenina/luteolina; LUTEOL/P-HIDROXI = luteolina/ácido *p*-hidroxibenzoico; FER/APIG = ácido ferrúlico/apigenina; P-CUM/APIG = ácido *p*-cumárico/apigenina; P-CUM/LUTEOL = ácido *p*-cumárico/luteolina; FER/LUTEOL = ácido ferrúlico/luteolina.

Novamente, os modelos apresentaram significativa falta de ajuste, exceto o modelo para a resposta FER/APIG, apesar de as regressões serem significativas. O comportamento foi semelhante ao que ocorreu quando a R_S foi utilizada. Da mesma maneira, não seria possível fazer previsões com a quase totalidade dos modelos apresentando elevada falta de ajuste, assim, o critério R_R também foi insatisfatório como resposta para o planejamento. Desta vez, a

explicação para a falta de ajuste não pode ser a inversão na ordem de migração dos compostos, visto que a retenção relativa foi utilizada com sucesso para estes casos no trabalho de Breitz, Jardim & Bruns (2009).

3.1.3. Validação dos modelos construídos com a resposta fator de “migração” (k)

Considerando-se a ineficácia dos dois critérios elementares utilizados até agora em gerar modelos ajustados, a alternativa restante foi empregar o fator de “migração” na construção dos modelos a serem validados. Neste caso, o número total de respostas passou a ser treze, já que o valor de k é calculado para cada pico individualmente. As novas respostas foram denominadas de TIR (tirosol); OLE (oleuropeína glicosídeo); HIDROXITIR (hidroxitirosol); CIN (ácido cinâmico); FER (ácido ferrúlico); APIG (apigenina); P-CUM (ácido *p*-cumárico); VAN (ácido vanílico); LUTEOL (luteolina); P-HIDROXI (ácido *p*-hidroxibenzoico); CAF (ácido cafeico); GAL (ácido gálico); e 3,4-DIHIIDRO (ácido 3,4-dihidroxibenzoico). A **Tabela 3.6** resume os fatores de “migração” calculados para os 13 compostos fenólicos.

Tabela 3.6. Valores de fator de “migração” (k) calculados para os 13 compostos fenólicos nas condições do planejamento.

Ensaio	Fator de "migração" (k)												
	TIR	OLE	HIDROXITIR	CIN	FER	APIG	P-CUM	VAN	LUTEOL	P-HIDROXI	CAF	GAL	3,4-DIHIDRO
1	0,04	0,30	0,60	0,87	0,91	1,04	1,04	1,10	1,25	1,29	1,94	2,17	2,50
2	0,05	0,38	0,82	1,28	1,37	1,59	1,62	1,73	1,90	2,17	3,61	4,12	5,43
3	0,09	0,33	0,63	0,90	1,27	1,35	1,47	1,57	1,34	1,87	2,03	2,30	2,61
4	0,10	0,42	0,83	1,28	1,96	2,08	2,41	2,62	2,00	3,46	3,68	4,38	5,62
5	0,04	0,30	0,60	0,87	0,92	1,04	1,04	1,10	1,25	1,29	1,95	2,18	2,51
6	0,05	0,38	0,81	1,27	1,37	1,59	1,62	1,72	1,89	2,15	3,56	4,06	5,33
7	0,09	0,33	0,63	0,90	1,30	1,36	1,50	1,60	1,34	1,92	2,02	2,30	2,60
8	0,11	0,42	0,83	1,28	1,91	2,05	2,33	2,51	1,99	3,27	3,58	4,21	5,34
9	0,05	0,28	0,54	0,76	0,87	0,97	0,97	1,03	1,09	1,18	1,57	1,74	1,94
10	0,07	0,42	0,86	1,36	1,75	1,99	2,12	2,29	2,10	2,97	4,07	4,75	6,43
11	0,04	0,33	0,71	1,07	1,02	1,16	1,19	1,26	1,54	1,54	2,73	3,09	3,85
12	0,13	0,40	0,77	1,16	1,95	1,95	2,42	2,60	1,79	3,60	3,02	3,42	4,29
13	0,06	0,34	0,69	1,02	1,24	1,40	1,44	1,54	1,51	1,86	2,47	2,80	3,33
14	0,06	0,35	0,70	1,02	1,24	1,40	1,44	1,53	1,51	1,85	2,45	2,76	3,28
15	0,06	0,35	0,69	1,02	1,26	1,41	1,46	1,56	1,51	1,89	2,47	2,79	3,31
16	0,06	0,35	0,71	1,05	1,29	1,45	1,50	1,60	1,56	1,94	2,58	2,92	3,50
17	0,06	0,35	0,71	1,06	1,29	1,46	1,51	1,61	1,57	1,95	2,59	2,93	3,51
18	0,06	0,35	0,71	1,06	1,29	1,46	1,51	1,61	1,57	1,95	2,59	2,94	3,52

Respostas: TIR = tirosol; OLE = oleuropeína glicosídeo; HIDROXITIR = hidroxitirosol; CIN = ácido cinâmico; FER = ácido ferrúlico; API = apigenina; P-CUM = ácido *p*-cumárico; VAN = ácido vanílico; LUTEOL = luteolina; P-HIDROXI = ácido *p*-hidroxibenzoico; CAF = ácido cafeico; GAL = ácido gálico; 3,4-DIHIDRO = ácido 3,4-dihidroxibenzoico.

O fator de “migração” foi calculado através da equação: $k = \frac{t_{com} - t_{sol}}{t_{sol}}$, onde t_{com} = tempo de migração de composto e t_{sol} = tempo de migração do solvente.

Após o cálculo dos valores de k , novamente procedeu-se à construção e validação dos modelos matemáticos, cujos resultados da ANOVA estão reunidos na **Tabela 3.7**.

Tabela 3.7. Resumo da ANOVA considerando a significância estatística da regressão e a falta de ajuste dos modelos quadráticos empregando-se o fator de “migração” como resposta.

Compostos	Regressão		Falta de Ajuste	
	MQ_R/MQ_r	$F_{9,8,95\%}$	MQ_{faj}/MQ_{ep}	$F_{5,3,95\%}$
TIR	215,2		1,88	
OLE	243,00		4,80	
HIDROXITIR	149,30		1,60	
CIN	130,99		1,87	
FER	180,13		6,68	
APIG	175,68		3,52	
P-CUM	141,30	3,39	9,06	9,01
VAN	148,97		9,70	
LUTEOL	128,88		2,19	
P-HIDROXI	75,27		20,09	
CAF	149,50		2,24	
GAL	145,28		2,68	
3,4-DIHIDRO	188,04		2,24	

MQ_R = Média Quadrática devida à regressão; MQ_r = Média Quadrática devida ao resíduo; MQ_{faj} = Média Quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} = Média Quadrática devida ao erro puro. Respostas: TIR = tirosol; OLE = oleuropeína glicosídeo; HIDROXITIR = hidroxitirosol; CIN = ácido cinâmico; FER = ácido ferrúlico; API = apigenina; P-CUM = ácido *p*-cumárico; VAN = ácido vanílico; LUTEOL = luteolina; P-HIDROXI = ácido *p*-hidroxibenzoico; CAF = ácido cafeico; GAL = ácido gálico; 3,4-DIHIDRO = ácido 3,4-dihidroxibenzoico.

Todos os modelos apresentaram regressão altamente significativa e apenas três modelos apresentaram uma pequena falta de ajuste (P-CUM, VAN e P-HIDROXI), enquanto que ao usar as outras respostas, a falta de ajuste, em geral, foi bem mais pronunciada.

Para poder encontrar a condição ótima que separasse todos os 13 compostos, seria necessário aplicar a técnica de Derringer e Suich, estipulando um valor de desejabilidade para cada resposta e, posteriormente, combinando-as em uma desejabilidade global, determinar a melhor condição de separação para todos os compostos (BREITKREITZ, JARDIM & BRUNS, 2009). Porém, a utilização da ferramenta de Derringer e Suich pode ser prejudicada por modelos que possuam falta de ajuste.

Com base nisso, optou-se por não empregar os modelos na busca da melhor condição de separação, e sim, avaliar os resultados empíricos obtidos nos 18 experimentos e determinar qual das combinações de variáveis proporcionou a separação de todos os compostos.

3.2. Condição ótima de separação

Dentre os 18 experimentos efetuados para o planejamento composto central, duas condições possibilitaram a separação dos 13 compostos fenólicos. Uma das condições foi o ponto central e suas replicatas (ensaios 15 a 18) e a outra foi um ponto axial (ensaio 14). O ponto central teve como níveis das variáveis: TBS 35 mmol L⁻¹, pH 9,1 e voltagem de 26 kV. O ponto axial (ensaio 14), possuiu os mesmos valores de TBS e pH, porém a voltagem foi de 30 kV. Nos dois casos, o perfil de separação foi o mesmo, porém a corrida com voltagem de 30 kV foi menor.

Assim, considerando-se apenas os 18 experimentos, não há dúvidas de que a condição ótima para a separação dos 13 compostos fenólicos, tanto em resolução quanto em tempo de corrida, foi obtida com TBS 35 mmol L⁻¹, pH 9,1 e V 30 kV. A **Figura 3.1** mostra o eletroferograma obtido nesta condição.

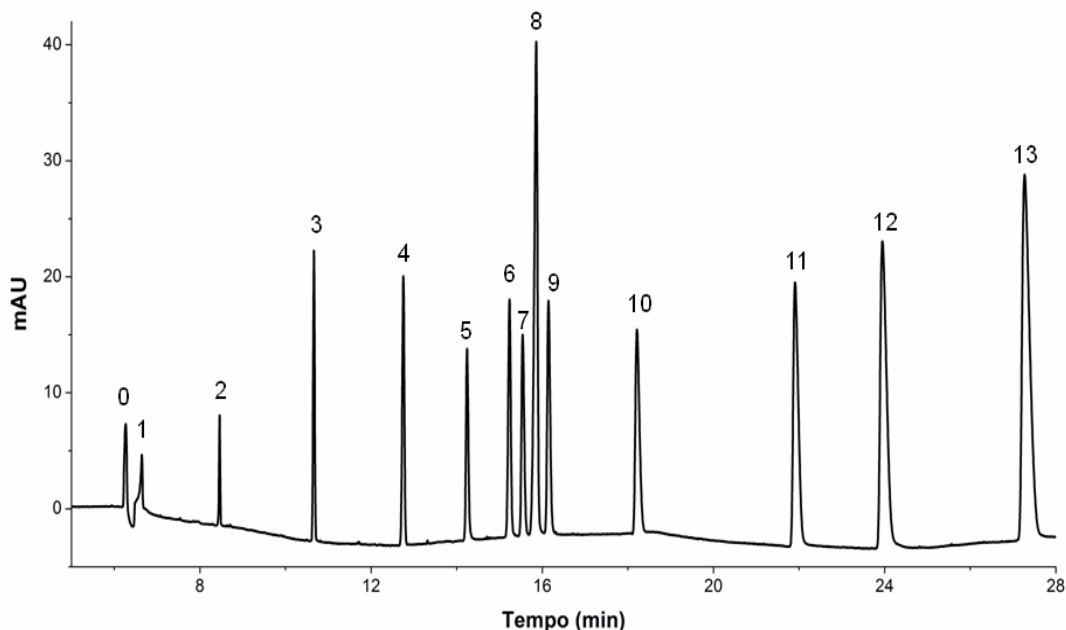


Figura 3.1. Separação de 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem por eletroforese capilar de zona. Capilar de 50 μm d. i. x 72 cm comprimento efetivo com bulbo estendido, eletrólito tetraborato de sódio 35 mmol L⁻¹, pH 9,1, 30 kV, 25°C, injeção de 50 mbar por 5 s e detecção em 210 nm. Identificação dos picos: 0) Solvente; 1) Tiroso; 2) Oleuropeína Glicosídeo; 3) Hidroxitiroso; 4) Ácido Cinâmico; 5) Ácido Ferrúlico; 6) Apigenina; 7) Ácido *p*-cumárico; 8) Luteolina; 9) Ácido Vanílico; 10) Ácido *p*-hidroxibenzoico; 11) Ácido Cafeico; 12) Ácido Gálico; 13) Ácido 3,4-dihidroxibenzoico.

De posse da concentração ótima de separação, foi construída uma curva de mobilidade para os 13 compostos fenólicos entre o pH 8,2 e 10,0, utilizando-se como eletrólito TBS 35 mmol L⁻¹, voltagem de 30 kV, injeção de 50 mbar por 5 s, temperatura de 25°C e detecção em 210 nm. Através desta curva, foi possível avaliar o comportamento da mobilidade efetiva de cada composto em diferentes pHs. A **Figura 3.2** mostra a curva obtida para os 13 compostos fenólicos.

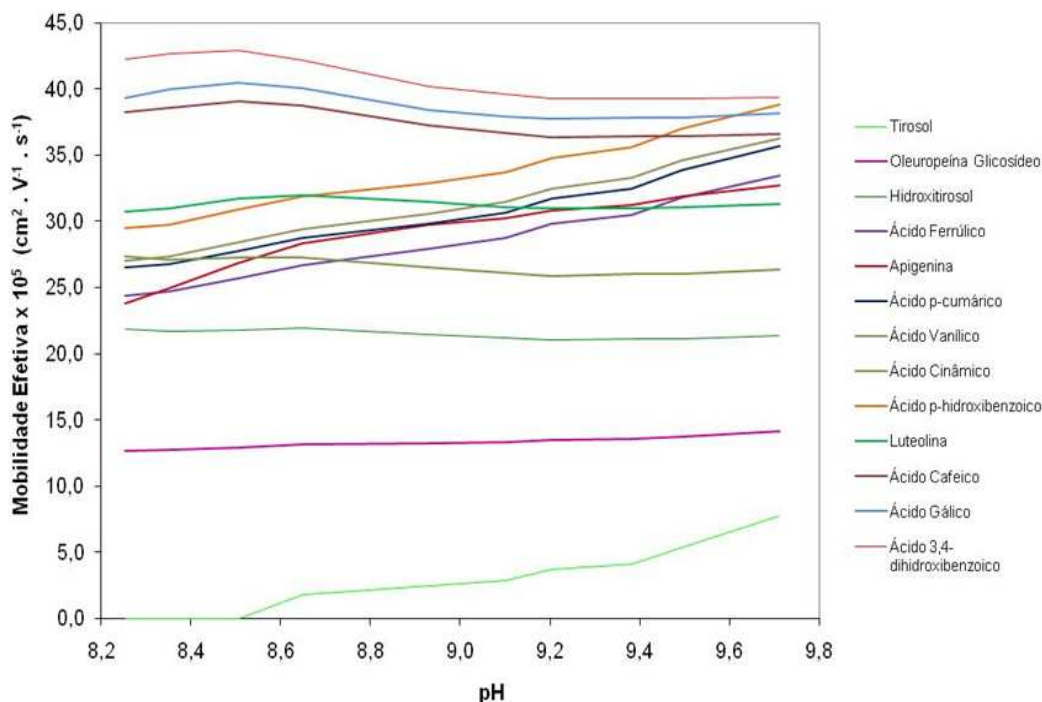


Figura 3.2. Curva de mobilidade efetiva para os 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem. Eletrólito: TBS 35 mmol L⁻¹.

É possível observar na **Figura 3.2** que, até o pH 8,6, o composto tiroso estava coeludindo com o pico do solvente [mobilidade igual à do fluxo eletrosmótico (FEO), onde saem todos os compostos neutros], ou seja, o tiroso não sofre ionização em pHs abaixo de 8,6. O pH 9,1 foi o ponto onde ocorreu separação de todos os compostos neste eletrólito (nenhuma das linhas se sobrepõe), corroborando o resultado obtido pelo planejamento composto central. Acima de pH 9,7 o sistema se mostrou muito instável, com intensa oscilação da linha de base, o que impediu a utilização do ponto com pH 10,0 na construção da curva. Deve-se notar que os compostos que exibiram comportamento mais drástico em relação à mudança de pH foram ácido ferrúlico, apigenina, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, ácido cinâmico, ácido *p*-hidroxibenzoico e luteolina, fato que pode ser correlacionado com as

recorrentes coeluições entre estes compostos em diversos experimentos do planejamento.

4. CONCLUSÃO

Com o intuito de otimizar a separação de 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem, foi conduzido um planejamento composto central, pois o emprego de técnicas multivariadas pode ser muito eficaz para resolver problemas deste tipo, com economia de tempo e de experimentos. Para tanto, foi necessário encontrar uma resposta adequada, capaz de representar a qualidade de separação dos picos de interesse. Assim, foram avaliados três critérios elementares das técnicas de separação: resolução (R_S), retenção relativa (R_R) e fator de retenção (ou fator de “migração”, k), porém, os três critérios proporcionaram modelos com falta de ajuste.

Apesar disso, dentre os experimentos conduzidos para o planejamento composto central, foi possível encontrar duas condições empíricas com a separação de todos os compostos, sendo que uma das combinações permitiu a separação em menor tempo, fato que a torna mais atraente para o analista. A condição ótima de separação, considerando-se os dados empíricos, utilizou 35 mmol L⁻¹ de eletrólito tetraborato de sódio em pH 9,1 e voltagem de 30 kV, resultando na separação dos 13 compostos fenólicos em 28 min.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENDINI, A.; BONOLI, M.; CERRETANI, L.; BIGUZZI, B.; LERCKER, G.;
GALLINA-TOSCHI, T. Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols

- from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 425-433, 2003.
- BONOLI, M.; BENDINI, A.; CERRETANI, L.; LERCKER, G.; GALLINA-TOSCHI, T. Qualitative and Semiquantitative Analysis of Phenolic Compounds in Extra Virgin Olive Oils as a Function of the Ripening Degree of Olive Fruits by Different Analytical Techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7026-7032, 2004.
- BONOLI, M.; MONTANUCCI, M.; GALLINA-TOSCHI, T.; LERCKER, G. Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1011, p. 163-172, 2003.
- BOUDET, A.-M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2722-2735, 2007.
- BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters**. 2. ed. New York: Wiley, 2005.
- BREITKREITZ, M. C. **Otimização Simultânea de Variáveis de Processo e Mistura em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Campinas: UNICAMP, 2007. Dissertação (Mestrado em Química Analítica), Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BRUNS, R. E. Combined column-mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1439-1449, 2009.

- BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; BARROS NETO, B. **Statistical design – Chemometrics**. Amsterdam: Elsevier, 2006.
- CARRASCO-PANCORBO, A.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; GALLINA-TOSCHI, T.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Analytical determination of polyphenols in olive oils. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 837-858, 2005b.
- CARRASCO-PANCORBO, A.; CRUCES-BLANCO, C.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Sensitive Determination of Phenolic Acids in Extra-Virgin Olive Oil by Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 22, p. 6687-6693, 2004.
- CARRASCO-PANCORBO, A.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolic acids, and flavonoids in extra-virgin olive oil. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 2221-2233, 2006a.
- CARRASCO-PANCORBO, A.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Rapid Quantification of the Phenolic Fraction of Spanish Virgin Olive Oils by Capillary Electrophoresis with UV Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 7984-7991, 2006b.
- CARRASCO-PANCORBO, A.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; SEGURA-CARRETERO, A.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Use of capillary electrophoresis with UV detection to compare the phenolic profiles of extra-virgin olive oils belonging to Spanish

- and Italian PDOs and their relation to sensorial properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 2144-2155, 2009.
- GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; CARRASCO-PANCORBO, A.; CAÑABATE-DÍAZ, B.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Electrophoretic identification and quantitation of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil. **Electrophoresis**, v. 26, p. 3538-3551, 2005.
- INAREJOS-GARCIA, A. M.; ANDROULAKI, A.; SALVADOR, M. D.; FREGAPANE, G.; TSIMIDOU, M. Z. Discussion on the objective evaluation of virgin olive oil bitterness. **Food Research International**, v. 42, p. 279-284, 2009.
- JÁC, P.; POLÁSEK, M.; POSPÍSILOVÁ, M. Recent trends in the determination of polyphenols by electromigration methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 40, p. 805-814, 2006.
- MAMAN, O.; MARSEILLE, F.; GUILLET, B.; DISNAR, J.-R.; MORIN, P. Separation of phenolic aldehydes, ketones and acids from lignin degradation by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 755, n. 1, p. 89-97, 1996.
- MEINHART, A. D.; BIZZOTTO, C. S.; BALLUS, C. A.; PRADO, M. A.; BRUNS, R. E.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H. T. Optimisation of a CE method for caffeine analysis in decaffeinated coffee. **Food Chemistry**, v. 120, p. 1155-1161, 2010.
- MORIN, P.; VILLARD, F.; DREUX, M. Borate complexation of flavonoid-O-glycosides in capillary electrophoresis. I. Separation of flavonoid-7-O-

- glycosides differing in their flavonoid aglycone. **Journal of Chromatography A**, v. 628, n. 1, p. 153-160, 1993a.
- MORIN, P.; VILLARD, F.; DREUX, M. Borate complexation of flavonoid-O-glycosides in capillary electrophoresis. II. Separation of flavonoid-3-O-glycosides differing in their sugar moiety. **Journal of Chromatography A**, v. 628, n. 1, p. 161-169, 1993b.
- PRIEGO-CAPOTE, F.; RUIZ-JIMÉNEZ, J.; DE CASTRO, M. D. L. Fast separation and determination of phenolic compounds by capillary electrophoresis-diode array detection. Application to the characterization of alperujo after ultrasound-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, p. 239-246, 2004.
- RODRÍGUEZ-MÉNDEZ, M. L.; APETREI, C.; DE SAJA, J. A. Evaluation of the polyphenolic content of extra virgin olive oils using an array of voltammetric sensors. **Electrochimica Acta**, v. 53, p. 5867-5872, 2008.
- RONDA, F.; RODRÍGUEZ-NOGALES, J. M.; SANCHO, D.; OLIVETE, B.; GÓMEZ, M. Multivariate optimisation of a capillary electrophoretic method for the separation of glutenins. Application to quantitative analysis of the endosperm storage proteins in wheat. **Food Chemistry**, v. 108, p. 287-296, 2008.
- SERVILI, M.; ESPOSTO, S.; FABIANI, R.; URBANI, S.; TATICCHI, A.; MARIUCCI, F.; SELVAGGINI, R.; MONTEDORO, G. F. Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. **Inflammopharmacology**, v. 17, p. 76-84, 2009.

- VINHA, A. F.; FERRERES, F.; SILVA, B. M.; VALENTÃO, P.; GONÇALVES, A.; PEREIRA, J. A.; OLIVEIRA, M. B.; SEABRA, R. M.; ANDRADE, P. B. Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. **Food Chemistry**, v. 89, p. 561-568, 2005.
- WANG, S.-P.; HUANG, K.-J. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 273-279, 2004.

CAPÍTULO 4

USO DA ESTATÍSTICA MULTIVARIADA NO DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE 13 COMPOSTOS FENÓLICOS EM AZEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEM POR ELETROFORESE CAPILAR

Cristiano Augusto Ballus,¹ Adriana Dillenburg Meinhart,¹ Roy Edward Bruns,² e
Helena Teixeira Godoy¹

¹ Departamento de Ciência de Alimentos, Faculdade de Engenharia de
Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), CP 6121,
13083-862, Campinas, SP, Brasil

² Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),
CP 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brasil

RESUMO

A dieta mediterrânea inclui consumo elevado de azeite de oliva que possui grandes quantidades de compostos fenólicos. A caracterização destes compostos no azeite ainda não está completa, devido à diversidade de estruturas e à complexidade da matriz. O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar um método para separação e quantificação simultânea de 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem: tirosol, hidroxitirosol, oleuropeína glicosídeo, ácido ferrúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cinâmico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido gálico, ácido cafeico, luteolina, apigenina, ácido vanílico e ácido 3,4-dihidroxibenzoico. Técnicas estatísticas multivariadas como o planejamento composto central e o método de otimização simultânea de Derringer e Suich foram utilizadas para a otimização da separação. Também foram avaliadas técnicas de pré-concentração *on-line* para aumentar a sensibilidade do método. Os procedimentos multivariados foram eficientes na determinação da condição ótima de separação, usando como resposta a resolução entre pares de compostos e o tempo de corrida. O uso da pré-concentração *on-line* permitiu reduzir em 7,5 vezes o consumo de amostra e de solventes orgânicos como hexano e metanol. O método utiliza capilar de 50 μm d. i. x 60 cm comprimento efetivo com bulbo estendido, eletrólito ácido bórico 50 mmol L^{-1} , pH 10,2, 25°C, injeção de 50 mbar por 25 s com aplicação de voltagem inversa (-30 kV por 5 s) antes da voltagem de corrida (+30 kV), detecção em 210 nm e tempo de corrida de 12 min.

Palavras-chave: azeite de oliva; compostos fenólicos; eletroforese capilar; *stacking*; otimização multivariada; Derringer e Suich

1. INTRODUÇÃO

A oliveira (*Olea europaea* L.) teve sua origem há cerca de 5.000 anos atrás na região que hoje corresponde à antiga Pérsia e Mesopotâmia. Posteriormente, a oliveira se espalhou para os territórios que hoje correspondem à Síria e à Palestina. A produção mundial de azeite de oliva está concentrada nos países do Mediterrâneo, que produzem 98% de todo o azeite de oliva comercializado no mundo (HARWOOD & APARICIO, 2000).

A dieta mediterrânea inclui o consumo elevado de azeite de oliva, o qual contém grandes quantidades de compostos fenólicos que possuem elevada ação antioxidante através do seqüestro de radicais livres (PERONA, CABELLO-MORUNO & RUIZ-GUTIERREZ, 2006; SÁNCHEZ et al., 2007; LEE et al., 2008). Os compostos fenólicos do azeite de oliva também atuam como agentes anti-inflamatórios, antivirais e anticarcinogênicos (SAVARESE, DE MARCO & SACCHI, 2007). O azeite de oliva virgem apresenta uma notável resistência à oxidação, a qual tem sido relacionada à sua composição em ácidos graxos e aos elevados níveis de antioxidantes naturais, tais como os compostos fenólicos (PAPADIMITRIOU et al., 2006).

Os compostos fenólicos já identificados e quantificados em azeite de oliva pertencem às classes de fenil-etil-álcoois (como hidroxitirosol e tirosol), ácidos fenólicos (como o ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, etc.), lignanas [(+)-pinoresinol e (+)-1-acetoxipinoresinol], secoiridóides (vários derivados agliconas da oleuropeína e ligstrosídeo) e flavonóides (luteolina e apigenina) (CARRASCO-PANCORBO et al., 2006a).

No que se refere ao processo de extração dos compostos fenólicos do azeite de oliva virgem para análise, duas principais técnicas foram reportadas

na literatura: extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE) (TURA & ROBARDS, 2002). Em um estudo comparativo das duas técnicas de extração, Bendini et al. (2003) demonstraram que a LLE proporcionou os melhores resultados de recuperação para uma mistura de 15 padrões de compostos fenólicos, adicionados à óleo de amendoim refinado. Para amostras de azeite de oliva virgem, tanto LLE quanto SPE mostraram elevadas recuperações das principais classes de compostos, com desempenho equivalente. Porém, em termos de custo, a LLE é mais acessível. Experimentos conduzidos por Hrncirik & Fritsche (2004) revelaram que o emprego de SPE produziu resultados ambíguos, o que não ocorreu com a LLE.

A eletroforese capilar (CE) pode representar um bom compromisso entre tempo de análise e caracterização satisfatória para os compostos fenólicos do azeite de oliva. A velocidade, resolução e simplicidade da CE, combinadas aos baixos custos de operação e menor geração de resíduos, tornam a técnica uma opção atrativa para o desenvolvimento de métodos aperfeiçoados de análise de alimentos (LIMA, DUARTE & ESTEVES, 2007). A desvantagem da CE, sua menor sensibilidade, está relacionada com o pequeno caminho óptico definido pelo diâmetro do capilar (entre 50 e 75 μm) e ao pequeno volume de amostra injetado. Porém, diversas técnicas de pré-concentração *on-line*, coletivamente denominadas de *stacking* (empacotamento), foram desenvolvidas e estão sendo cada vez mais empregadas nos últimos anos, de forma a superar esta limitação sem perda na eficiência de separação (MALÁ et al., 2009; MORAES et al., 2009).

Quando o trabalho envolve muitos fatores, é comum a obtenção de muitas respostas, e é bastante improvável que a região ótima para todas elas

seja a mesma. Assim, é necessário o emprego de ferramentas estatísticas que consigam lidar com um grande número de respostas, de maneira a fornecer uma resposta global adequada aos objetivos do pesquisador. Neste sentido, pode-se trabalhar com a metodologia de otimização simultânea proposta por Derringer e Suich, como no trabalho de Breitreitz, Jardim & Bruns (2009).

O objetivo deste trabalho foi otimizar e validar um método para separação e quantificação simultânea de 13 compostos fenólicos presentes em azeite de oliva extravirgem, utilizando eletroforese capilar com detector de arranjo de diodos (CE-DAD). A condição ótima de separação foi definida a partir do emprego de técnicas estatísticas multivariadas, como o planejamento composto central e o método de otimização simultânea de Derringer e Suich. As técnicas de pré-concentração *on-line* também foram utilizadas com o intuito de aumentar a sensibilidade e diminuir o consumo de solventes para o preparo de amostras.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Reagentes

Foram utilizados os solventes hexano p.a. (Synth, Brasil), metanol p.a. (Synth, Brasil), metanol grau HPLC (J. T. Baker, EUA), bem como os reagentes ácido bórico (Ecibra, Brasil) e hidróxido de sódio p.a. (Nuclear, Brasil). A água foi purificada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). Os padrões de tirosol, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido cafeico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido cinâmico, ácido vanílico, ácido ferrúlico, luteolina e apigenina foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). O padrão de hidroxitirosol

foi adquirido da Cayman Chemical (EUA) e o padrão de oleuropeína glicosídeo foi adquirido da Extrasynthese (França). As soluções foram filtradas em filtros Millipore com 0,45 μm (Millipore, EUA) e colocadas em ultrassom durante 5 min antes da injeção.

As soluções estoque dos padrões foram preparadas em metanol grau HPLC, filtradas em membrana de 0,45 μm e armazenadas a -18°C e protegidas da luz. Para os experimentos de otimização, foi preparada uma solução trabalho em metanol:água (30:70), contendo 6,7 mg L^{-1} de cada um dos compostos com exceção do ácido cafeico, ácido gálico e ácido 3,4-dihidroxibenzoico, cujas concentrações resultaram em 10,4 mg L^{-1} cada; da luteolina, cuja concentração foi de 13,3 mg L^{-1} ; e do tirosol, com concentração de 28,3 mg L^{-1} .

2.2. Equipamento

O equipamento utilizado foi um sistema de eletroforese capilar Agilent G1600AX (Agilent Technologies, Germany), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD), injetor automático e sistema de controle de temperatura ajustado em 25°C . Utilizou-se um capilar de sílica fundida com 50 μm de diâmetro por 60 cm de comprimento efetivo, com bulbo estendido (Agilent Technologies, Germany). A detecção foi realizada a 210 nm. A análise e o tratamento dos dados foram realizados no *software HP ChemStation*.

Os capilares novos foram ativados e condicionados por lavagem com pressão de 1 bar, usando uma solução de NaOH 1 mol L^{-1} durante 30 min, seguido de 10 min de água. No início de cada dia de trabalho, o capilar foi condicionado durante 5 min com NaOH 1 mol L^{-1} , seguido de 5 min com água

e 10 min de eletrólito. No final do dia foi realizada uma limpeza do capilar com lavagem por 5 min com NaOH 1 mol L⁻¹ e 5 min de água. O capilar foi armazenado em água durante a noite.

2.3. Planejamento dos experimentos e tratamento dos dados

O método desenvolvido por Ballus et al. (2010a) utilizando tetraborato de sódio (TBS) apresentou uma desvantagem, que foi observada apenas quando se procedeu à etapa de validação: o eletrólito precisava ser trocado a cada três corridas, pois o pico da luteolina se deslocava progressivamente, coelindo com o pico do ácido vanílico. Além disso, na primeira corrida não ocorria separação completa entre os picos do ácido *p*-cumárico e da luteolina, ou seja, seriam necessárias três corridas para aproveitarem-se duas, o que é contraproducente. Na literatura, onde praticamente só se utiliza tetraborato de sódio para a separação de compostos fenólicos do azeite de oliva extravirgem, o eletrólito precisava ser trocado a cada duas corridas, quando a luteolina estava presente. Embora não houvesse justificativa para isso, o mais provável é que tenha sido pelo deslocamento progressivo da luteolina.

Com base nestes inconvenientes, optou-se por recomeçar o processo de otimização, porém, utilizando o eletrólito ácido bórico em substituição ao TBS. No trabalho de Ballus et al. (2010b), o ácido bórico foi utilizado para a separação de 16 compostos fenólicos presentes em diferentes alimentos e bebidas, sendo trocado apenas após 15 corridas. O método utilizava 175 mmol L⁻¹ de ácido bórico, em pH 9,0.

Aplicando-se o método do ácido bórico para os 13 compostos fenólicos presentes em azeite de oliva, apenas 2 compostos coeluíram. Antes da

otimização empregando planejamento composto central, foi feito um pequeno estudo univariado para determinar a região experimental da variável ácido bórico a ser estudada. O teste consistiu em variar a concentração de ácido bórico entre 50 e 250 mmol L⁻¹. Como o efeito do ácido bórico não foi muito significativo em relação à separação, optou-se por empregar menores concentrações do eletrólito, pois a corrida é mais curta, a simetria dos picos é melhor e o ruído é menor. Em todos estes testes, utilizou-se injeção de 50 mbar por 5 s, temperatura de 25°C e voltagem de 30 kV.

O planejamento composto central foi construído de forma a avaliar os efeitos das variáveis concentração de ácido bórico (BOR), pH e voltagem (V). Os níveis empregados foram: BOR entre 33,2 (-1,68) e 66,8 (+1,68) mmol L⁻¹; pH entre 9,86 e 10,54; e V entre 23,6 e 30,3 kV (arredondadas para 24 e 30, respectivamente). Todas as condições do planejamento composto central foram injetadas com 50 mbar por 5 s, temperatura de 25°C e detecção em 210 nm. O ponto central foi analisado em triplicata, totalizando 17 experimentos. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória. Antes de cada condição do planejamento foi feito um condicionamento de 5 min de NaOH 1 mol L⁻¹, 5 min de água e 10 min do eletrólito da condição em questão, a fim de estabilizar o capilar. Cada condição foi injetada em duplicata, sendo que entre as corridas da mesma condição o capilar foi condicionado por 2 min com o eletrólito.

Para a escolha da resposta, iniciou-se com a avaliação do critério elementar resolução (R_S). Como esta resposta gerou modelos adequados, os demais critérios não foram testados, visto que a resolução permite avaliar adequadamente a qualidade da separação em cada condição. A resolução foi

calculada para pares de compostos que coeluíram em pelo menos uma das condições testadas, resultando em cinco respostas. O tempo de corrida foi incluído como uma sexta resposta. Os modelos foram validados através da Análise de Variância (ANOVA), a 95% de confiança. Em seguida, para determinar a condição ótima que separasse todos os 13 compostos, foi utilizada a técnica de Derringer e Suich, estipulando um valor de desejabilidade para cada resposta e, posteriormente, combinando-as em uma desejabilidade global (BREITKREITZ, JARDIM & BRUNS, 2009). O tratamento dos dados foi feito através do software Design Expert 6.0.10 (Minneapolis, EUA). A **Tabela 4.1** exibe a matriz do planejamento composto central.

Tabela 4.1. Matriz do planejamento composto central utilizando BOR.

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	1	2	3	BOR (mmol L ⁻¹)	pH	Voltagem (kV)
1	-1	-1	-1	40	10,0	25
2	1	-1	-1	60	10,0	25
3	-1	1	-1	40	10,4	25
4	1	1	-1	60	10,4	25
5	-1	-1	1	40	10,0	29
6	1	-1	1	60	10,0	29
7	-1	1	1	40	10,4	29
8	1	1	1	60	10,4	29
9	-1,68	0	0	33,2	10,2	27
10	1,68	0	0	66,8	10,2	27
11	0	-1,68	0	50	9,86	27
12	0	1,68	0	50	10,54	27
13	0	0	-1,68	50	10,2	24
14	0	0	1,68	50	10,2	30
15	0	0	0	50	10,2	27
16	0	0	0	50	10,2	27
17	0	0	0	50	10,2	27

2.4. Pré-concentração *on-line* (*stacking*)

Os compostos fenólicos estão presentes em pequenas quantidades no azeite de oliva extravirgem, e assim, após a extração empregando soluções de metanol:água, os extratos precisam ser concentrados antes de serem analisados. Dessa forma, os métodos de extração líquido-líquido empregam grandes quantidades de amostra e, conseqüentemente, grandes quantidades de metanol, o que é inadequado do ponto de vista ambiental.

Assim, com a intenção de reduzir o consumo de solvente do método de extração, foi avaliado o emprego das técnicas de pré-concentração *on-line* (“*stacking*”), as quais promovem um aumento da detectabilidade com base no aumento do volume de injeção e na manipulação da velocidade eletroforética dos analitos, sem alteração na instrumentação (MORAES et al., 2009).

Após a determinação da condição ótima de separação, foram estudados o *stacking* mediado por força iônica, o *stacking* em injeção de grande volume e a aplicação de voltagem inversa. Para o aumento da injeção, foi mantida a mesma pressão de 50 mbar, com variação dos tempos de injeção (10, 15 e 25 s), sendo que o método original empregava 5 s de injeção. A aplicação de voltagem inversa (-30 kV) foi necessária nas injeções de 15 e 25 s, sendo avaliados tempos entre 3 e 6 s de aplicação. Estes testes foram realizados com a utilização da mistura de padrões dos 13 compostos fenólicos.

O eletrólito foi trocado após 3 corridas, pois se observou que o pico do ácido 3,4-dihidroxibenzoico começava a coeluir com o pico do ácido gálico, mas ao trocar o eletrólito o sistema voltava ao normal. Isto indica que o eletrólito sofreu alterações produzidas pela aplicação das altas voltagens, tornando-se cada vez menos capaz de manter a separação. Foi construída

uma curva de mobilidade entre pH 8,9 e 10,5, e observou-se que a faixa de pH para separação é muito estreita (0,1 unidades, visto que em pH 10,1 e 10,3 não ocorre a separação). Desta forma, qualquer pequena alteração já é suficiente para inviabilizar o uso contínuo do eletrólito. O consumo de eletrólito foi de 1 mL a cada três corridas.

Para poder avaliar o efeito da pré-concentração em amostras, foram preparados extratos metanólicos de azeite de oliva extravirgem, empregando extração líquido-líquido (PIRISI et al., 2000; BONOLI et al., 2003). Foram pesados 2,0 g do azeite em tubos de centrifuga, onde foram adicionados 1,0 mL de hexano e 2,0 mL de metanol:água (60:40, v/v). A mistura foi agitada por 2 min e em seguida centrifugada a 5000 RPM por 5 min. A fase polar (metanol:água) foi separada e a extração repetida duas vezes. Os extratos foram combinados e evaporados até *secura* sob pressão reduzida e baixa temperatura (< 38°C) em evaporador rotatório. Em seguida, as amostras foram dissolvidas em 1,0 mL de metanol:água (30:70, v/v) e filtradas em membranas de 0,45 µm antes da injeção no eletroforese capilar. Este procedimento foi realizado também com 15 g de amostra, com o aumento proporcional dos solventes, para comparar com o extrato obtido a partir de 2 g e, assim, avaliar se havia a possibilidade de trabalhar com pequenas quantidades de amostra. Os testes de *stacking* foram efetuados com ambos os extratos. O condicionamento entre corridas, que consistia em 2 min de eletrólito e estava funcionando bem para os padrões, não foi eficiente para as amostras. Assim, foram testados alguns condicionamentos, baseando-se no condicionamento utilizado no trabalho de Ballus et al. (2010b), onde esta mesma situação foi observada.

2.5. Validação do método por eletroforese capilar

O método foi validado de acordo com a United States Pharmacopeia (2008) e exigências da legislação brasileira (INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004). A repetibilidade do método foi avaliada injetando-se uma solução contendo os padrões dos 13 compostos fenólicos. Esse procedimento foi realizado por 10 vezes consecutivas em um mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada repetindo-se esse procedimento durante três dias. A linearidade do sistema foi verificada de forma individual para cada um dos compostos, sendo a curva de calibração construída com 7 pontos. Os limites de detecção e quantificação foram estimados como sendo 3 e 10 vezes a razão sinal/ruído, respectivamente.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Variação da concentração de ácido bórico

Através da variação da concentração de ácido bórico, foi possível observar que o aumento da mesma não foi suficiente para promover a separação de todos os compostos, como pode ser observado na **Figura 4.1**. Além disso, a elevação da concentração de BOR promoveu um aumento do tempo de corrida, resultando em alargamento de banda e perda na simetria dos picos. Alargamento de banda e perda de simetria não favorecem a separação e tempos de corrida longos também são indesejáveis. Portanto, resolveu-se estudar a região de baixas concentrações de BOR, já que com 50 mmol L⁻¹ a corrida foi de apenas 9 min e com elevada simetria dos picos (**Figura 4.1A**).

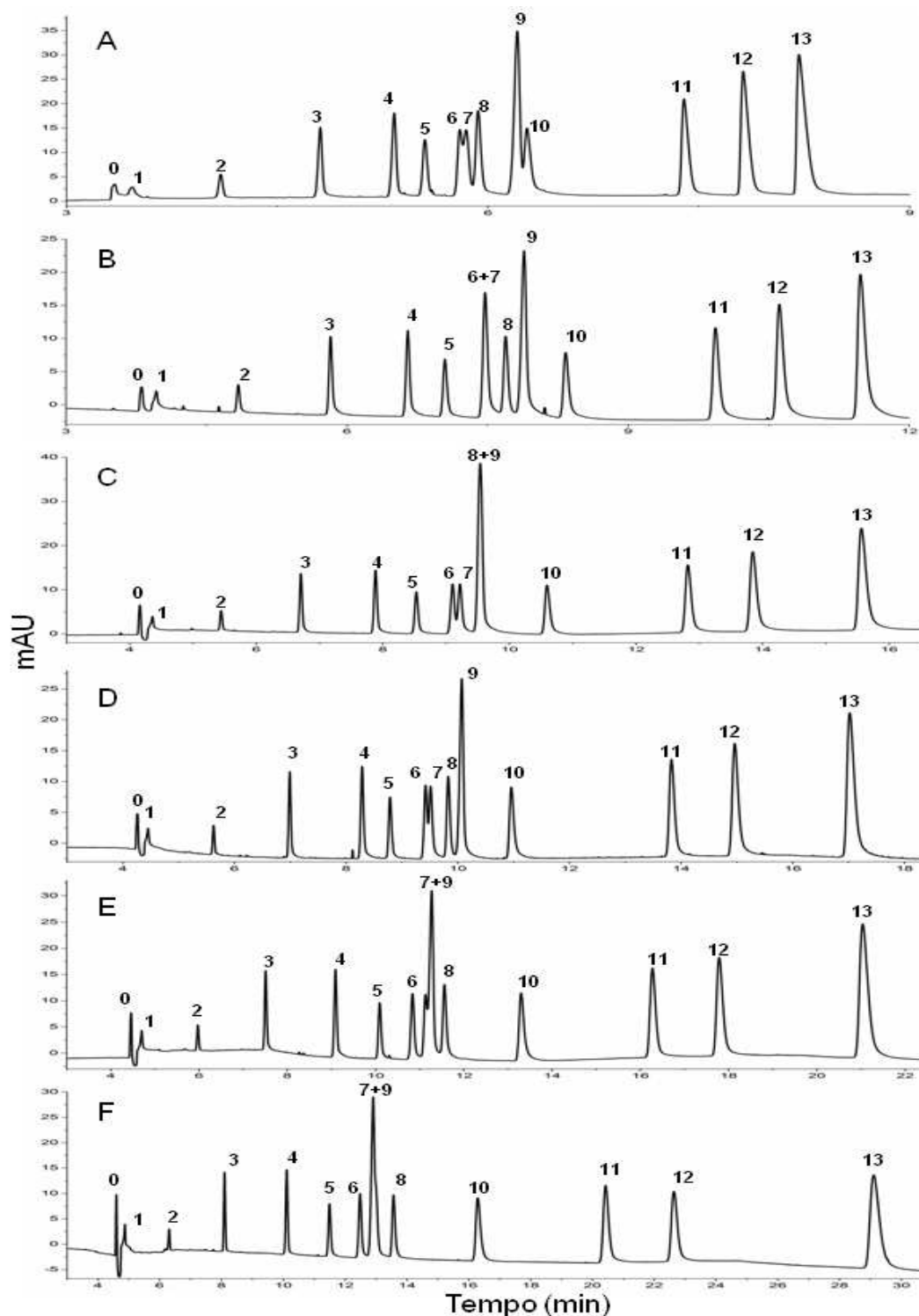


Figura 4.1. Variação da concentração de ácido bórico em pH 9,0. A) BOR 50 mmol L⁻¹; B) BOR 100 mmol L⁻¹; C) BOR 150 mmol L⁻¹; D) BOR 175 mmol L⁻¹; E) BOR 200 mmol L⁻¹; F) BOR 250 mmol L⁻¹. Identificação dos picos: 0) Solvente; 1) Tirozol; 2) Oleuropeína Glicosídeo; 3) Hidroxitirozol; 4) Ácido Cinâmico; 5) Ácido Ferrúlico; 6) Ácido *p*-cumárico; 7) Apigenina; 8) Ácido Vanílico; 9) Luteolina; 10) Ácido *p*-hidroxibenzoico; 11) Ácido Cafeico; 12) Ácido Gálico; 13) Ácido 3,4-dihidroxibenzoico.

3.2. Validação dos modelos construídos com a resposta Resolução (R_s)

Foram calculadas as resoluções entre todos os pares de compostos que coeluíram em qualquer uma das condições experimentais avaliadas. No total foram obtidas cinco respostas: oleuropeína glicosídeo/tirosol (OLE/TIR); ácido vanílico/ácido 3,4-dihidroxibenzoico (VAN/3,4-DIHIDRO); ácido gálico/ácido *p*-hidroxibenzoico (GAL/P-HIDROXI); ácido cafeico/ácido *p*-cumárico (CAF/P-CUM); ácido 3,4-dihidroxibenzoico/ácido gálico (3,4-DIHIDRO/GAL). O tempo de corrida (TCOR) também foi incluído como resposta, pois a intenção foi minimizá-lo. A **Tabela 4.2** sumariza os resultados para as seis respostas.

Tabela 4.2. Valores das respostas nas condições do planejamento composto central.

Ensaio	Resolução (R_S)					TCOR (min)
	OLE/TIR	VAN/3,4-DIHIIDRO	GAL/P-HIDROXI	CAF/P-CUM	3,4-DIHIIDRO/GAL	
1	0,00	6,61	6,70	4,40	0,00	14
2	1,58	6,60	10,83	7,09	0,00	19
3	11,19	1,29	1,17	6,80	10,25	16
4	7,95	0,80	6,96	11,34	10,74	22
5	2,13	6,77	6,72	4,25	0,00	12
6	1,60	6,74	10,90	7,18	0,00	16
7	8,00	1,59	2,04	6,97	9,35	13
8	11,55	1,11	4,27	9,37	12,11	19
9	2,22	4,18	5,87	6,33	3,49	13
10	3,98	2,92	12,68	12,21	5,40	21
11	6,95	9,76	7,29	2,03	2,02	14
12	13,30	1,00	0,83	7,62	16,32	18
13	2,09	3,77	9,16	9,09	3,97	18
14	2,65	3,61	9,16	9,14	4,62	14
15	2,06	4,06	9,23	8,93	3,73	16
16	2,99	3,07	9,02	9,67	5,21	16
17	1,84	3,78	9,29	9,62	4,41	16

Respostas: OLE/TIR = oleuropeína glicosídeo/tirosol; VAN/3,4-DIHIIDROXI = ácido vanílico/ácido 3,4-dihidroxibenzoico; GAL/P-HIDROXI = ácido gálico/ácido *p*-hidroxibenzoico; CAF/P-CUM = ácido cafeico/ácido *p*-cumárico; 3,4-DIHIIDROXI/GAL = ácido 3,4-dihidroxibenzoico/ácido gálico; TCOR = tempo de corrida.

A resolução entre os pares foi calculada através da equação: $R_S = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$, onde *t* = tempo de migração e *w* = largura da base do pico.

Foram construídos modelos lineares e quadráticos para cada uma das seis respostas, e cada modelo foi validado através da Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 95% de confiança. A **Tabela 4.3** mostra os resultados da ANOVA para os modelos empregando R_S e TCOR e a **Tabela 4.4** exhibe os coeficientes significativos utilizados em cada modelo.

Tabela 4.3. Resumo da ANOVA considerando a significância estatística da regressão e a falta de ajuste dos modelos quadráticos empregando-se resolução e tempo de corrida como respostas.

Respostas	Regressão		Falta de Ajuste	
	MQ_R/MQ_r	$F_{9,7,95\%}$	MQ_{faj}/MQ_{ep}	$F_{5,2,95\%}$
OLE/TIR	32,31		5,63	
VAN/3,4-DIHIDRO	69,29		0,49	
GAL/P-HIDROXI	18,03	3,68	80,02	19,30
CAF/P-CUM	15,22		9,43	
3,4-DIHIDRO/GAL	163,35		0,32	
TCOR	223,57		*	

MQ_R = Média Quadrática devida à regressão; MQ_r = Média Quadrática devida ao resíduo; MQ_{faj} = Média Quadrática devida à falta de ajuste; MQ_{ep} = Média Quadrática devida ao erro puro.

* Não foi possível calcular a falta de ajuste para o modelo do TCOR, pois os três valores obtidos no ponto central foram idênticos, não sendo possível medir o erro.

Respostas: OLE/TIR = oleuropeína glicosídeo/tirosol; VAN/3,4-DIHIDROXI = ácido vanílico/ácido 3,4-dihidroxibenzoico; GAL/P-HIDROXI = ácido gálico/ácido *p*-hidroxibenzoico; CAF/P-CUM = ácido cafeico/ácido *p*-cumárico; 3,4-DIHIDROXI/GAL = ácido 3,4-dihidroxibenzoico/ácido gálico; TCOR = tempo de corrida.

Tabela 4.4. Coeficientes significativos para os modelos construídos empregando-se a resolução entre pares de compostos e o tempo de corrida como respostas.

Coeficiente	OLE/TIR	VAN/3,4-DIHIDRO	GAL/P-HIDROXI	CAF/P-CUM	3,4-DIHIDRO/GAL	TCOR
A (BOR)	-	-	2,03	1,64	0,47	2,52
B (pH)	5,72	-2,68	-2,31	2,04	5,37	1,15
C (V)	-	-	-	-	-	-1,30
A ²	-	-	-	-	-	0,36
B ²	-	0,55	-2,08	-2,28	0,95	-
C ²	-	-	-	-	-	-
AB	-	-	-	-	-	0,37
AC	1,11	-	-	-	-	-
BC	-	-	-	-	-	-

Respostas: OLE/TIR = oleuropeína glicosídeo/tirosol; VAN/3,4-DIHIDROXI = ácido vanílico/ácido 3,4-dihidroxibenzoico; GAL/P-HIDROXI = ácido gálico/ácido *p*-hidroxibenzoico; CAF/P-CUM = ácido cafeico/ácido *p*-cumárico; 3,4-DIHIDROXI/GAL = ácido 3,4-dihidroxibenzoico/ácido gálico; TCOR = tempo de corrida.

Ao observar-se a **Tabela 4.3**, é possível verificar que o modelo para a resposta GAL/P-HIDROXI apresentou falta de ajuste ao nível de 95%, bem como que todos os modelos apresentaram regressão bastante significativa. Os gráficos de diagnóstico do modelo para a resposta GAL/P-HIDROXI indicaram que os resíduos seguiam uma distribuição normal, sem indícios de heteroscedasticidade. Além disso, a MQ_{ep} (média quadrática devida ao erro puro) resultou bem inferior para esta resposta, quando comparada com as demais. Com isso, o valor do quociente MQ_{faj}/MQ_{ep} pode ter resultado artificialmente maior, sendo possível dizer que a falta de ajuste tenha ocorrido devido ao valor subestimado da MQ_{ep} . Os gráficos de valores preditos vs valores observados (**Figura 4.2**) mostram uma boa correlação entre ambos os valores, para todos os modelos construídos. Assim, o modelo para a resposta

GAL/P-HIDROXI também foi utilizado para prever a condição ótima através do método de Derringer e Suich.

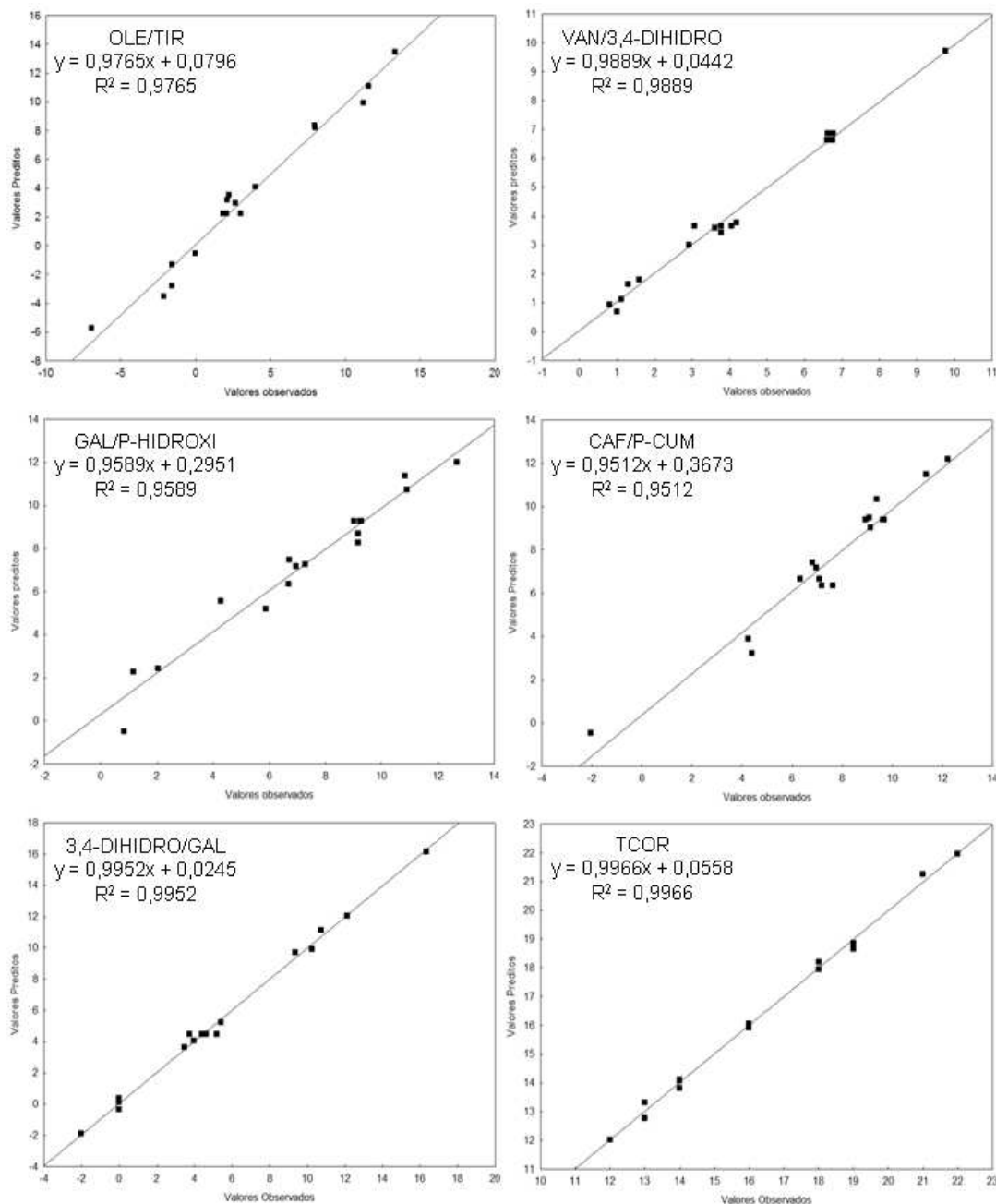


Figura 4.2. Gráficos de valores preditos vs valores observados para a resolução entre pares de compostos e para o tempo de corrida.

Ao utilizar a ferramenta de Derringer e Suich, o objetivo foi maximizar a resolução entre os pares de compostos e minimizar o tempo de corrida. Assim, foram construídas funções de desejabilidade lineares unilaterais para maximização e minimização. Para maximização as equações foram:

$$d_i = 0 \quad \text{se } R_{Si} < R_{Si}^{\min} \quad (1)$$

$$d_i = \left(\frac{R_{Si} - R_{Si}^{\min}}{R_{S\text{ alvo}} - R_{Si}^{\min}} \right) \quad \text{se } R_{Si}^{\min} \leq R_{Si} \leq R_{S\text{ alvo}} \quad (2)$$

$$d_i = 1 \quad \text{se } R_{Si} > R_{S\text{ alvo}} \quad (3)$$

Para minimização, as equações resultaram em:

$$d_i = 1 \quad \text{se } t_i < t_{\text{alvo}} \quad (4)$$

$$d_i = \left(\frac{t_i - t_i^{\max}}{t_{\text{alvo}} - t_i^{\max}} \right) \quad \text{se } t_i^{\max} \leq t_i \leq t_{\text{alvo}} \quad (5)$$

$$d_i = 0 \quad \text{se } t_i > t_i^{\max} \quad (6)$$

onde d_i corresponde à desejabilidade (ente 0 e 1), R_{Si} e t_i são os valores preditos pelo modelo, $R_{S\text{ alvo}}$ e t_{alvo} são os valores alvo das respostas,

R_{Si}^{min} é o valor mínimo da resposta e t_i^{max} corresponde ao valor máximo da resposta.

Para maximização da resposta resolução, o valor de $R_{Si}^{min} = 3$ foi escolhido para todos os pares de compostos a partir da verificação de que o valor mínimo de resolução para uma separação adequada dos mesmos era igual a três. O valor de $R_{S\ alvo}$ foi considerado individualmente para cada resposta como sendo igual ao valor de resolução mais alto obtido experimentalmente para aquele par de compostos. Assim, o algoritmo deveria usar os modelos para maximizar o valor de resolução para os cinco pares de compostos, sendo inaceitáveis valores abaixo de 3 (resolução mínima para haver separação) e acima do valor máximo obtido experimentalmente (pois neste caso estaria fora da região experimental). Para a resposta tempo de corrida, foram determinados os valores $t_{alvo} = 12$ min e $t_i^{max} = 15$ min, pois os menores tempos obtidos encontraram-se nesta faixa. O algoritmo deveria procurar por condições que maximizariam as resoluções, porém com o menor tempo de corrida.

O algoritmo encontrou seis condições que satisfaziam os critérios estabelecidos, mas todas elas eram variações muito pequenas de um dos pontos axiais do planejamento composto central (ensaio 14). Estas pequenas variações podem ser atribuídas ao erro que existe em cada um dos modelos. A desejabilidade global de todas elas foi muito baixa (0,198), o que pode ser explicado pelo emprego de critérios bastante restritivos. Sendo assim, a condição ótima de separação que permitiu a máxima resolução para os cinco pares de compostos dentro do menor tempo de corrida foi um dos próprios

ensaios do planejamento, com níveis de 50 mmol L^{-1} de BOR, pH 10,2 voltagem de 30 kV e 14 min de corrida. A **Figura 4.3** ilustra uma das condições obtidas pelo método de Derringer e Suich, com os valores teóricos calculados através dos modelos matemáticos. Estes valores podem ser comparados aos obtidos experimentalmente para o ensaio 14 (**Tabela 4.2**), verificando-se que são bastante próximos, com exceção para o valor da resposta GAL/P-HIDROXI, porém deve-se lembrar que este modelo apresentou falta de ajuste. A **Figura 4.4** mostra o eletroferograma da condição ótima de separação.

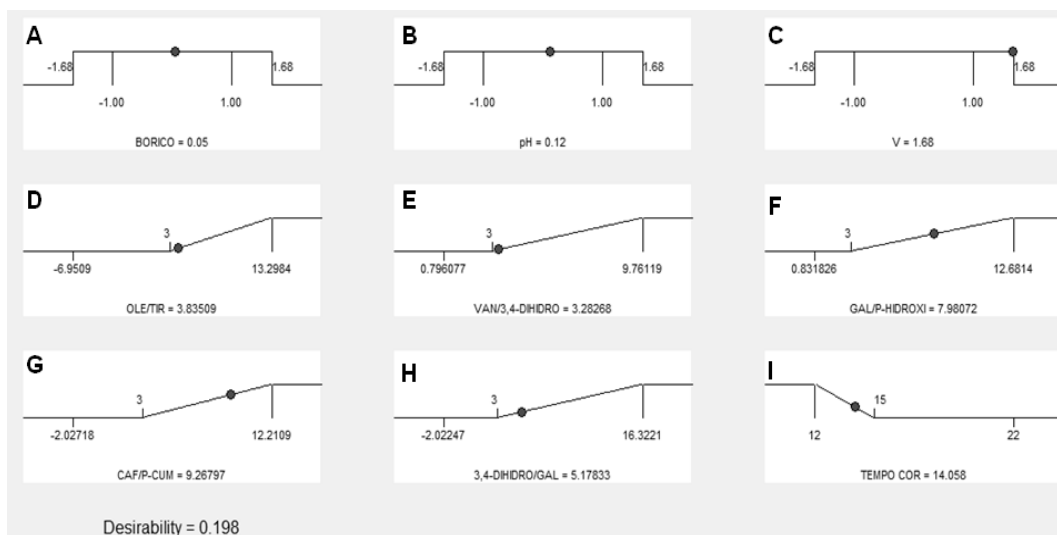


Figura 4.3. Condições experimentais (A-C) que fornecem valores das respostas próximos aos alvos estipulados nas funções de desejabilidade individuais e gráficos das funções de desejabilidade individuais (D-I) com os valores preditos pelos modelos para cada resposta.

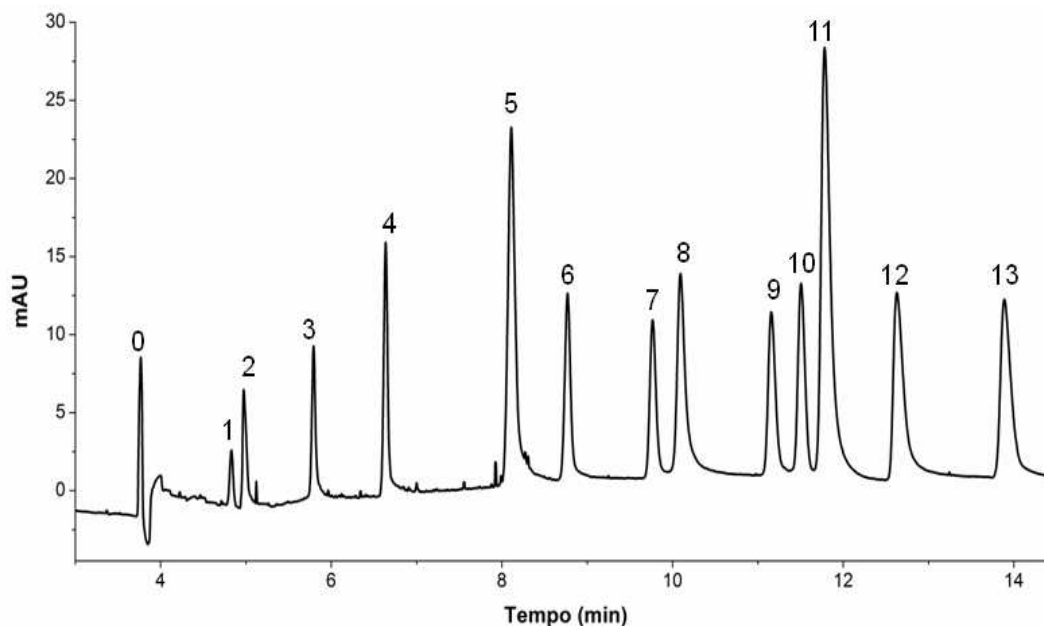


Figura 4.4. Condição ótima de separação para 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem por eletroforese capilar de zona. Capilar de 50 μm d. i. x 60 cm comprimento efetivo com bulbo estendido, eletrólito ácido bórico 50 mmol L^{-1} , pH 10,2, 30 kV, 25°C, injeção de 50 mbar por 5 s e detecção em 210 nm. Identificação dos picos: 0) Solvente; 1) Oleuropeína Glicosídeo; 2) Tiroso; 3) Hidroxitiroso; 4) Ácido Cinâmico; 5) Luteolina; 6) Apigenina; 7) Ácido Ferrúlico; 8) Ácido Cafeico; 9) Ácido *p*-cumárico; 10) Ácido Vanílico; 11) Ácido 3,4-dihidroxibenzoico; 12) Ácido Gálico; 13) Ácido *p*-hidroxibenzoico.

Após a determinação da condição ótima, foi construída uma curva de mobilidade utilizando o ácido bórico 50 mmol L^{-1} , variando o pH entre 8,9 e 10,5. Através desta curva, foi possível determinar o comportamento da mobilidade efetiva de cada composto em diferentes pHs nesta concentração de eletrólito. A **Figura 4.5** mostra a curva obtida para os 13 compostos fenólicos em BOR 50 mmol L^{-1} .

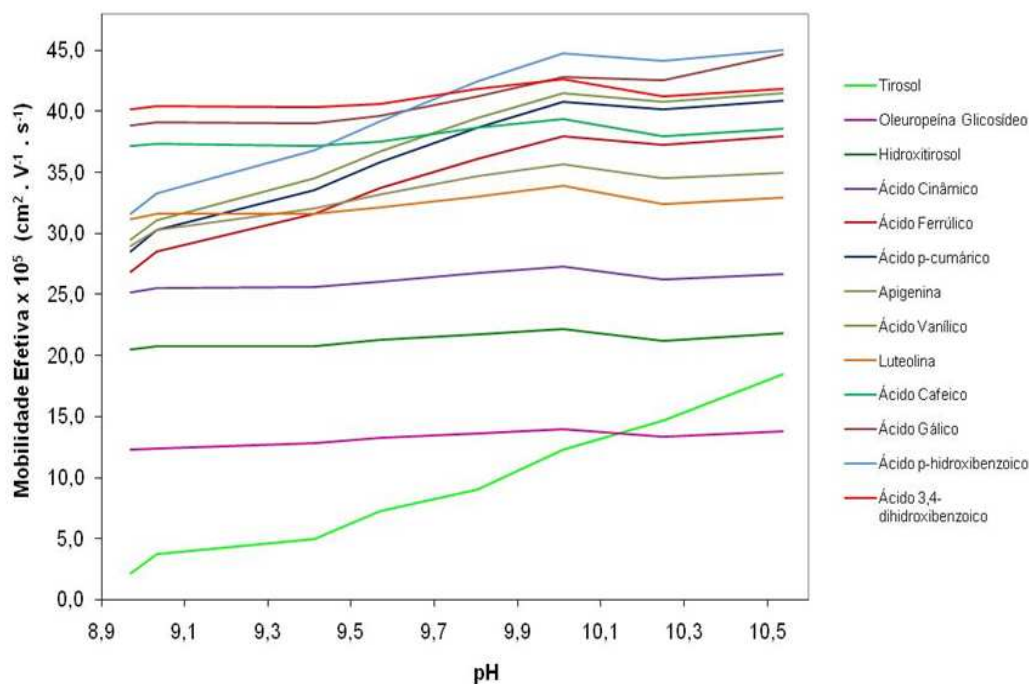


Figura 4.5. Curva de mobilidade efetiva para os 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem. Eletrólito BOR 50 mmol L⁻¹.

A separação dos 13 compostos ocorreu em pH 10,2, assim como observado no planejamento composto central. Os compostos que exibiram comportamento mais drástico em relação à mudança de pH foram o tirosol, ácido ferrúlico, apigenina, ácido *p*-cumárico, ácido vanílico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico e luteolina, o que explica as coeluições entre eles em diferentes condições do planejamento. O aumento do pH foi constantemente deslocando o tirosol no eletroferograma, até ele coeluir com a oleuropeína glicosídeo em pH 10,1, e depois separar novamente em pH 10,2, posicionando-se depois da oleuropeína. Com isso, o pH mostra ter um papel muito importante na separação dos compostos neste sistema de eletroforese capilar de zona.

3.3. Emprego da pré-concentração on-line (*stacking*)

Entre os tipos de *stacking* avaliados, o *stacking* mediado por força iônica ocorre pelo simples fato de os padrões e amostras estarem solubilizados em um solvente com menor condutividade elétrica que a do eletrólito de corrida. Quando a tensão é aplicada, esta região de baixa condutividade experimenta um campo elétrico maior que a região do eletrólito de corrida. Os íons presentes na amostra movem-se mais rapidamente na região de baixa condutividade e, quando alcançam a interface entre a banda da amostra e a banda do eletrólito, são desacelerados, causando uma contração na banda da amostra (MALÁ et al., 2009; MORAES et al., 2009).

O outro tipo de *stacking* testado baseia-se no aumento do volume de injeção, pois assim, a quantidade de amostra que entra no capilar torna-se muito maior, e com isso, aumenta-se a quantidade dos compostos de interesse. Uma grande quantidade de amostra em solvente com baixa condutividade também facilita o *stacking* mediado por força iônica. Porém, quando o capilar é preenchido excessivamente com amostra, a quantidade de eletrólito que resta no capilar é tão baixa que o campo elétrico do eletrólito é praticamente zero. Assim, quando os compostos atingem a banda do eletrólito, a velocidade é reduzida a quase zero, e eles acabam arrastados pelo fluxo eletrosmótico, não havendo separação. Para evitar isso, injeta-se uma grande quantidade de amostra e, em seguida, aplica-se uma voltagem de polaridade inversa durante algum tempo, pois com isso o eletrólito entra no capilar pelo lado da detecção e compacta a banda da amostra no lado da injeção. Quando a voltagem de corrida é aplicada, os compostos podem ser separados normalmente (MALÁ et al., 2009; MORAES et al., 2009).

As condições de *stacking* mais promissoras em padrões foram a injeção de 10 s sem aplicação de voltagem inversa, e 25 s com aplicação de -30 kV durante 5 s, sendo que esta última proporcionou um aumento de 6 vezes na área dos picos (comparando com a mesma concentração injetada durante 5 s) e aumento de 4 vezes na altura dos mesmos, melhorando significativamente a detectabilidade. Estas condições foram aplicadas nos extratos obtidos a partir de 2 e 15 g de azeite de oliva extravirgem, juntamente com injeções no método original, com injeção de 5 s. Quando o extrato obtido de 2 g foi injetado por 25 s com aplicação da voltagem inversa, foi possível obter uma detectabilidade maior do que injetando-se o extrato obtido a partir de 15 g durante 5 s. Assim, foi possível utilizar 7,5 vezes menos amostra, hexano e metanol, com o simples fato de aumentar o volume de injeção e aplicar voltagem inversa durante algum tempo, que são parâmetros facilmente ajustados através do *software* do equipamento. A **Figura 4.6** ilustra a comparação entre os dois extratos. Além disso, com o emprego da pré-concentração *on-line*, houve redução no tempo de corrida, que passou a ser de 12 min.

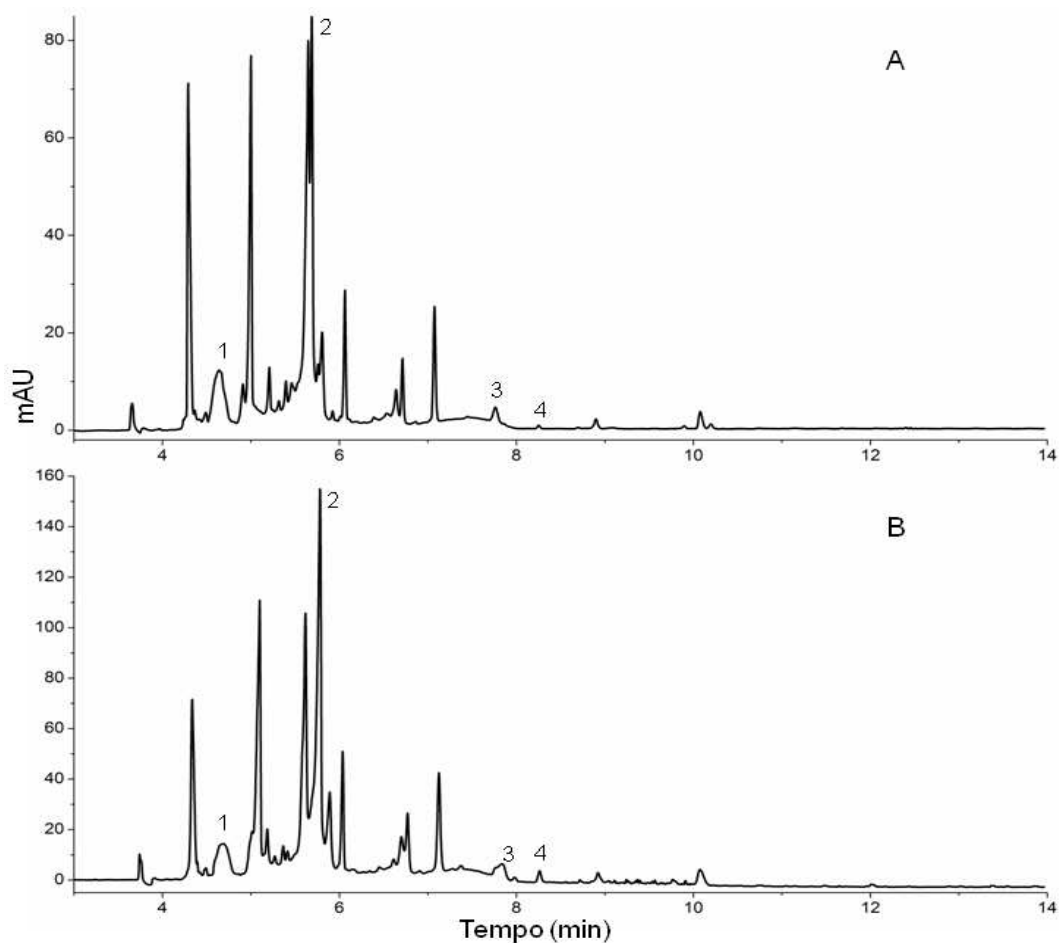


Figura 4.6. A) Extrato metanólico de compostos fenólicos obtido a partir de 15 g de azeite de oliva extravirgem, injetado com 50 mbar por 5 s. B) Extrato metanólico de compostos fenólicos obtido a partir de 2 g do mesmo azeite de oliva, injetado com 50 mbar por 25 s, e com posterior aplicação de voltagem inversa (-30 kV por 5 s). Identificação dos picos: 1) Tiroso; 2) Hidroxitiroso; 3) Luteolina; 4) Apigenina.

3.4. Validação do método

Todos os testes empregando apenas padrões possuíam condicionamento entre corridas de 2 min de eletrólito. Porém, quando foram feitos os testes de *stacking* com aumento de injeção, este condicionamento não foi suficiente para estabilizar as corridas. Assim, foram testadas diversas formas de condicionamento, utilizando NaOH 1 mol L⁻¹, água e eletrólito. As corridas ficaram estáveis quando utilizou-se um condicionamento de 1 min de NaOH 1 mol L⁻¹ + 1 min de espera + 1 min de água + 1 min de eletrólito + 1

min de espera + 1 min de eletrólito, totalizando 6 min de condicionamento entre corridas, não sendo mais necessário utilizar o condicionamento do início do dia. Este condicionamento foi uma pequena adaptação daquele utilizado no trabalho de Ballus et al. (2010b). O método foi validado após a definição deste condicionamento e das condições de *stacking*, resultando nos dados exibidos na **Tabela 4.5**. Os valores para repetibilidade e precisão intermediária que constam na tabela são para variações na área. Os coeficientes de variação (CVs) para os tempos de migração de todos os compostos ficaram abaixo de 1,19% para repetibilidade (no dia) e abaixo de 1,43% para precisão intermediária (entre dias). O método está de acordo com as exigências de validação (INMETRO, 2003; RIBANI et al., 2004; UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2008). A **Figura 4.7** mostra um eletroferograma dos 13 padrões nas condições finais do método, após todo o processo de pré-concentração e validação.

Tabela 4.5. Figuras de mérito para a validação do método de separação de 13 compostos fenólicos em azeite de oliva.

Compostos	Linearidade (mg L ⁻¹)	R ²	Repetibilidade (n = 10) *	Precisão Intermediária (n = 3) *	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Oleuropeína	1,0 - 15,0	0,9972	4,51	5,65	0,15	0,49
Tirosol	1,0 - 15,0	0,9954	4,86	2,20	0,22	0,74
Hidroxitirosol	1,0 - 15,0	0,9909	5,41	6,96	0,09	0,29
Ácido Cinâmico	1,0 - 15,0	0,9993	2,22	3,05	0,07	0,24
Luteolina	3,0 - 15,0	0,9967	2,58	3,77	0,85	2,84
Apigenina	2,0 - 15,0	0,9943	2,80	3,81	0,59	1,98
Ácido Ferrúlico	1,0 - 15,0	0,9987	2,77	3,03	0,10	0,33
Ácido Cafeico	1,0 - 15,0	0,9976	2,95	3,74	0,08	0,25
Ácido <i>p</i> -cumárico	1,0 - 15,0	0,9987	2,66	2,98	0,05	0,18
Ácido Vanílico	1,0 - 15,0	0,9989	2,78	3,34	0,08	0,25
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	1,0 - 15,0	0,9970	2,98	3,45	0,04	0,13
Ácido Gálico	1,0 - 15,0	0,9943	6,96	3,62	0,13	0,43
Ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	1,0 - 15,0	0,9985	2,88	3,12	0,08	0,25

* Os parâmetros repetibilidade e precisão intermediária foram avaliados através do cálculo do coeficiente de variação, CV (%). LOD = Limite de Detecção; LOQ = Limite de Quantificação.

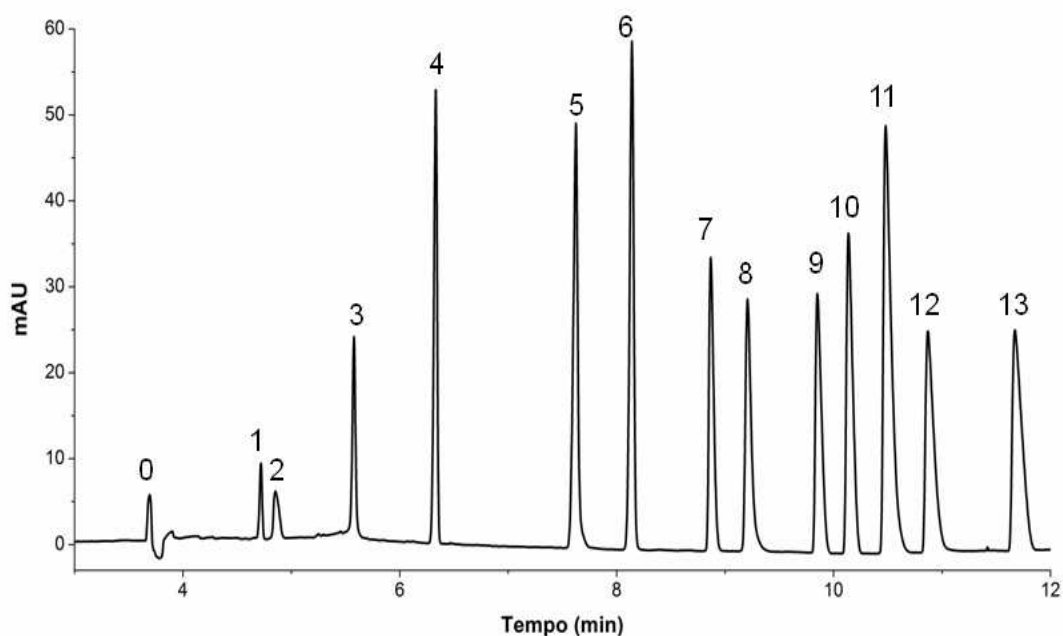


Figura 4.7. Eletroferograma com a separação dos 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem por eletroforese capilar. Mistura de padrões contendo $12,9 \text{ mg L}^{-1}$ de cada composto. Capilar de $50 \mu\text{m}$ d. i. x 60 cm comprimento efetivo com bulbo estendido, eletrólito ácido bórico 50 mmol L^{-1} , pH 10,2, 30 kV, 25°C , injeção de 50 mbar por 25 s com aplicação de voltagem inversa (-30 kV por 5 s) e detecção em 210 nm. Identificação dos picos: 0) Solvente; 1) Oleuropeína Glicosídeo; 2) Tirosol; 3) Hidroxitirosol; 4) Ácido Cinâmico; 5) Luteolina; 6) Apigenina; 7) Ácido Ferrúlico; 8) Ácido Cafeico; 9) Ácido *p*-cumárico; 10) Ácido Vanílico; 11) Ácido 3,4-dihidroxibenzoico; 12) Ácido Gálico; 13) Ácido *p*-hidroxibenzoico.

4. CONCLUSÃO

Através do emprego de técnicas estatísticas multivariadas, como o planejamento composto central e o método de Derringer e Suich, foi possível otimizar a separação de 13 compostos fenólicos encontrados em azeite de oliva extravirgem por eletroforese capilar, obtendo-se a máxima resolução entre os picos com o menor tempo de corrida.

O emprego das técnicas de pré-concentração *on-line* (*stacking*) proporcionou um aumento de 5 vezes na área e 4 vezes na altura dos picos. Além disso, possibilitou uma redução de 7,5 vezes no consumo de amostra e de solventes orgânicos como metanol e hexano, diminuindo a geração de resíduos e o impacto ambiental sem afetar a qualidade analítica.

As condições finais do método consistem na utilização de capilar de 50 µm d. i. x 60 cm comprimento efetivo com bulbo estendido, eletrólito ácido bórico 50 mmol L⁻¹, pH 10,2, 25°C, injeção de 50 mbar por 25 s com aplicação de voltagem inversa (-30 kV por 5 s) antes da aplicação da voltagem de corrida (+30 kV) e detecção em 210 nm. A separação dos 13 compostos ocorreu em 12 min. Com o estudo de validação, o método mostrou-se apto a ser aplicado para a quantificação destes compostos fenólicos em amostras de azeite de oliva extravirgem.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; BRUNS, R. E.; GODOY, H. T. Otimização da separação de 13 compostos fenólicos presentes em azeite de oliva extravirgem por eletroforese capilar. **Capítulo 2 – Dissertação de Mestrado**, 2010a.
- BALLUS, C. A.; MEINHART, A. D.; OLIVEIRA, R. G.; FACCO, E. M. P.; PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Method optimisation for 16 phenolic compounds separation in foods and drinks by capillary electrophoresis. **Trabalho em fase de publicação**, 2010b.
- BENDINI, A.; BONOLI, M.; CERRETANI, L.; BIGUZZI, B.; LERCKER, G.; GALLINA-TOSCHI, T. Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 425-433, 2003.
- BONOLI, M.; MONTANUCCI, M.; GALLINA-TOSCHI, T.; LERCKER, G. Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic

- compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1011, p. 163-172, 2003.
- BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BRUNS, R. E. Combined column-mobile phase mixture statistical design optimization of high-performance liquid chromatographic analysis of multicomponent systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1439-1449, 2009.
- CARRASCO-PANCORBO, A.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolic acids, and flavonoids in extra-virgin olive oil. **Journal of Separation Science**, v. 29, p. 2221-2233, 2006a.
- HARWOOD, J.; APARICIO, R. **Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties**. Maryland: Aspen Publishers, Inc., 2000.
- HRNCIRIK, K.; FRITSCHÉ, S. Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 106, n. 8, p. 540-549, 2004.
- INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos**. DOQ-CGCRE-008, Rio de Janeiro: INMETRO, 2003.
- LEE, O.-H.; LEE, B.-Y.; KIM, Y.-C.; SHETTY, K.; KIM, Y.-C. Radical Scavenging-Linked Antioxidant Activity of Ethanolic Extracts of Diverse Types of Extra Virgin Olive Oils. **Journal of Food Science**, v. 73, p. C519-C525, 2008.

- LIMA, D. L. D.; DUARTE, A. C.; ESTEVES, V. I. Optimization of phenolic compounds analysis by capillary electrophoresis. **Talanta**, v. 72, p. 1404-1409, 2007.
- MALÁ, Z.; SLAMPOVÁ, A.; GEBAUER, P.; BOCEK, P. Contemporary sample stacking in CE. **Electrophoresis**, v. 30, p. 215-229, 2009.
- MORAES, M. L. L.; MORAES, S. L.; PEREIRA, E. A.; TAVARES, M. F. M. Estratégias de pré-concentração em eletroforese capilar (CE). Parte 1. Manipulação da velocidade eletroforética do analito. **Química Nova**, v. 32, p. 1041-1046, 2009.
- PAPADIMITRIOU, V.; SOTIROUDIS, T. G.; XENAKIS, A.; SOFIKITI, N.; STAVYIANNOUNDAKI, V.; CHANIOTAKIS, N. A. Oxidative stability and radical scavenging activity of extra-virgin olive oil: An electron paramagnetic resonance spectroscopy study. **Analytica Chimica Acta**, v. 573-574, p. 453-458, 2006.
- PERONA, J. S.; CABELLO-MORUNO, R.; RUIZ-GUTIERREZ, V. The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 17, p. 429-445, 2006.
- PIRISI, F. M.; CABRAS, P.; CAO, C. F.; MIGLIORINI, M.; MUGGELLI, M. Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2. Reappraisal of the Extraction, HPLC Separation, and Quantification Procedures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1191-1196, 2000.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

SAVARESE, M.; DE MARCO, E.; SACCHI, R. Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciottana) by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 105, p. 761-770, 2007.

TURA, D.; ROBARDS, K. Sample handling strategies for the determination of biophenols in food and plants. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 71-93, 2002.

UNITED STATES PHARMACOPEIA. **The United States pharmacopeial convention 12601**. 31. ed. Rockville: United States Pharmacopeia, 2008.

CONCLUSÃO GERAL

A análise da composição em ácidos graxos de amostras de azeite de oliva extravirgem é uma ferramenta poderosa para a identificação de adulterações grosseiras das amostras, porém, para adulterações mais sutis, é necessária a aplicação desta técnica em conjunto com a análise de outros parâmetros. Os ácidos graxos foram utilizados em uma análise de componentes principais, onde se evidenciou uma elevada correlação negativa entre o teor de 18:1(n-9)-18:0 e o teor de 16:0-18:2(n-6)-18:3(n-3). Amostras que possuem teor mais elevado de um grupo apresentam teor mais baixo do outro grupo. Com isso, foi possível agrupar a amostra proveniente da Argentina separadamente daquelas dos outros países. A análise de um número maior de amostras de cada país, bem como o uso de mais respostas, como o teor de outros compostos, poderia conduzir a uma separação mais eficiente.

O eletrólito tetraborato de sódio (TBS) foi usado com sucesso para a separação de 13 compostos fenólicos por eletroforese capilar. Vários modelos foram construídos utilizando-se critérios elementares como resposta. Entretanto, a resolução, a retenção relativa e o fator de retenção acabaram por gerar modelos com falta de ajuste. Avaliando-se os resultados empíricos do planejamento composto central, foi possível determinar uma condição que promoveu a separação de todos os 13 compostos estudados: capilar de 50 μm d. i. x 72 cm comprimento efetivo com bulbo estendido, eletrólito TBS 35 mmol L^{-1} , pH 9,1, 30 kV, 25°C, injeção de 50 mbar por 5 s e detecção em 210 nm. Nestas condições, a separação ocorreu em 28 min.

Ao avaliar o emprego de ácido bórico (BOR) no sistema de eletroforese capilar, foram novamente empregadas técnicas estatísticas multivariadas.

Desta vez, a resposta resolução permitiu a obtenção de modelos sem falta de ajuste, que foram utilizados através do método de otimização simultânea de Derringer e Suich para encontrar a condição ótima de separação dos 13 compostos fenólicos neste sistema. Coincidentemente, esta condição correspondeu a um ponto axial do planejamento composto central. Após o término da otimização, o método apresentou como condições a utilização de capilar de 50 μm d. i. x 60 cm comprimento efetivo com bulbo estendido, eletrólito BOR 50 mmol L^{-1} , pH 10,2, 25°C, injeção de 50 mbar por 25 s com aplicação de voltagem inversa (-30 kV por 5 s) antes da aplicação da voltagem de corrida (+30 kV) e detecção em 210 nm. A separação dos 13 compostos ocorreu em 12 min, o que torna este sistema mais atraente do que aquele que utiliza eletrólito TBS. O método foi validado e apresentou resultados adequados para as figuras de mérito avaliadas.

A aplicação de estratégias de pré-concentração *on-line* em eletroforese capilar foi extremamente eficiente em aumentar a detectabilidade, bem como reduzir o consumo de amostra e de solventes orgânicos tóxicos. A facilidade de implementação do *stacking*, assim como suas vantagens claramente observadas neste estudo, indicam que se trata de um parâmetro que deve ser levado em conta sempre que possível no desenvolvimento de métodos por eletroforese capilar.

Os métodos estatísticos multivariados demonstraram ser uma poderosa ferramenta para promover a separação de misturas complexas, utilizando muito menos experimentos e possibilitando a capacidade, através de modelos matemáticos, de realizar predições de pontos ótimos, o que pode ser muito

importante quando os experimentos não produzem uma condição que separe todos os compostos de interesse.

O método desenvolvido e validado neste trabalho poderá ser empregado na determinação da composição de compostos fenólicos em diferentes marcas de azeite de oliva extravirgem comercializados no país, bem como colaborar para a caracterização do futuro azeite de oliva extravirgem a ser produzido em solo brasileiro.