

QUANTIFICAÇÃO DE β -SITOSTEROL LIVRE E DE FITOESTERÓIS TOTAIS NO ÓLEO DE DIPTERYXALATAVOGEL (BARU)

Fernanda Garrote Marques*, Jerônimo Raimundo Oliveira Neto,

Luiz Carlos Cunha, Maria Teresa Freitas Bara

Universidade Federal de Goiás

*E-mail: fernandagmf11@gmail.com

Submetido em: 01/06/2015

Aceito em: 03/11/2015

Publicado em: 30/09/2015

Resumo

O baru (*Dipteryx alata* Vog. Família Fabaceae) é uma planta típica do Cerrado cujo óleo extraído das sementes é usado popularmente como antirreumático e regulador da menstruação. O interesse em avaliar fitoesteróis em óleos vegetais deve-se a sua aplicação na prevenção de dislipidemias, de doenças cardiovasculares e à sua atividade na proteção contra tumores estimulados por estrogênio. O presente trabalho teve como objetivo contribuir com o conhecimento químico da espécie, de modo particular, em relação ao conteúdo em fitoesteróis livres e totais. Foi necessário desenvolver e validar um método analítico por CG-EM para a quantificação do β -sitosterol livre no óleo de baru. A concentração dos demais fitoesteróis foi estimada utilizando suas áreas relativas no cromatograma. Para quantificar os fitoesteróis totais foi realizada uma saponificação branda do óleo, à temperatura ambiente, a fim de hidrolisar a ligação de esterificação e os fitoesteróis liberados serem então quantificados. A concentração de fitoesteróis totais foi de 1464,41 mg/kg e foram identificados campesterol, estigmasterol e β -sitosterol. A concentração de fitoesteróis livres foi de 1195,49 mg/kg. β -sitosterol foi o composto majoritário, encontrado sob ambas as formas. Os fitoesteróis identificados nas sementes de baru permitem sugerir uma correlação com a atividade biológica verificada no seu uso popular.

Palavras-chave: Cerrado, cromatografia gasosa, fitoesteróis, estudo de validação.

Quantification of Free β -Sitosterol and Totals Phytosterols in the Oil of *Dipteryx Alata Vogel* (BARU)

Abstract

The baru (*Dipteryx alata* Vog. Fabaceae family) is a typical plant from Brazilian cerrado whose oil extracted from the seeds is popularly used as antirheumatic and regulator of the menstruation cycle. The interest in evaluating phytosterols in vegetable oils is due to its application in the prevention of dyslipidemia, cardiovascular diseases and its protective activity against tumors stimulated by estrogen. This study aimed to contribute to the chemical knowledge of the species, in particular, the relation of the content of free and total phytosterols. It was necessary to develop and validate an analytical method by GC-MS to quantify free β -sitosterol in the baru oil. The concentration of other phytosterols was estimated using their relative areas in the chromatogram. To quantify the total phytosterols was performed a mild saponification of the oil, at room temperature in order to hydrolyze the binding of esterification and the released phytosterols are then quantified. The total concentration of phytosterols was 1464.41 mg/kg and it was identified campesterol, stigmasterol and β -sitosterol. The concentration of free phytosterols was 1195.49 mg/kg. β -sitosterol was the major compound, found in both forms. Phytosterols identified in baru seeds allows to suggest a correlation with the biological activity observed in its popular use.

Keywords: Cerrado, gas chromatography, phytosterols, validation studies.

Cuantificación de β -Sitosterol Libre y Fitoesteroles Totales en el Aceite de *Dipteryx alata vogel* (BARU)

Resumen

El Barú (*Dipteryx alata* Vog. Familia Fabaceae) es una planta típica del cerrado brasileño cuyo aceite extraído de las semillas de la planta, las cuales se utilizan en la población como antirreumático y regulador de la menstruación. El interés en la evaluación de los fitosteroles en los aceites vegetales es debido a sus aplicaciones en la prevención de las dislipidemias, enfermedades cardiovasculares y sus actividades protectoras contra los tumores estimulados por los estrógenos. La investigación tuvo como objetivo contribuir con el conocimiento químico de la especie, en particular, la relación del contenido de fitosteroles libres y totales. Fue necesario desarrollar y validar un método de análisis por CG-EM para la cuantificación del β -sitosterol libre en el aceite de Barú. Las concentraciones de otros fitosteroles se determinaron utilizando sus áreas relativas en el cromatograma. Para cuantificar los fitosteroles totales se realizó una reacción de saponificación del aceite a la temperatura ambiente con el fin de hidrolizar los enlaces de esterificación y lograr la liberación de los fitosteroles. La concentración de fitosteroles totales fue de 1.464,41 mg/kg y se identificaron campesterol, estigmasterol y del β -sitosterol. La concentración de fitosteroles libres fue 1.195,49 mg/kg. El β -sitosterol fue el compuesto principal, que se encuentra en ambas las formas. Los fitoesteroles identificados en semillas de Barú, permiten sugerir una correlación con la actividad biológica observada en su uso popular.

Palabras clave: Cerrado, cromatografía gaseosa, fitoesteroles, estudios de validación.

1. INTRODUÇÃO

O barú (*Dipteryx alata* Vog.) é um fruto típico do Cerrado que fornece sementes comestíveis, das quais se extrai um óleo usado popularmente como antirreumático, tônico e regulador da menstruação⁽¹⁻³⁾.

Os produtos vegetais apresentam uma alta complexidade e variabilidade química decorrente de diferentes condições de cultivo e processamento, que podem afetar sua atividade terapêutica. Para o barú foi constatada uma alta diversidade genética entre amostras do cerrado brasileiro, o que poderia influenciar em sua diversidade química^(4,5).

Para os óleos vegetais fixos, apesar dos compostos majoritários serem os ácidos graxos, a determinação dos compostos minoritários, provenientes do metabolismo secundário, como fitoesteróis, terpenos, tocoferóis, dentre outros, é essencial para avaliar a sua qualidade⁽⁶⁻⁸⁾.

Dentre os compostos secundários presentes no óleo fixo de barú (*Dipteryx alata*) destaca-se o fitoesterol β -sitosterol, encontrado em maior quantidade⁽⁹⁾. A presença de monoterpênicos, sequeiterpênicos, triterpênicos, tocoferol e de fitoesteróis foi relatada⁽¹⁰⁾. Há um interesse em avaliar fitoesteróis em óleos vegetais devido a sua aplicação em prevenção de dislipidemias e doenças cardiovasculares (pela diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo) e proteção contra tumores estimulados por estrogênio^(8,11,12). Nesse contexto, alguns óleos vegetais são usados como alimentos funcionais⁽¹³⁾.

A determinação destes compostos é geralmente feita por cromatografia em fase gasosa (CG), desde que estes sejam voláteis e estáveis na temperatura utilizada. O detector de espectrometria de massas (EM) é utilizado por permitir a obtenção da massa molecular, informações estruturais e, conseqüentemente, a identificação de moléculas^(7,13). Para a determinação de fitoesteróis totais (livres e esterificados) são necessárias várias etapas de extração, saponificação e purificação, enquanto a determinação de fitoesteróis livres pode ser feita de forma direta por CG^(6,14).

Esse trabalho objetivou a determinação de β -sitosterol livre e de fitoesteróis totais presentes no óleo de baru. Para tanto foi necessário desenvolver e validar um método analítico em cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

2. MÉTODOS

2.1 Material

O óleo de baru foi obtido por prensagem mecânica utilizando mini prensa contínua (MPE-40 E, Ecirtec®) a partir de sementes/amêndoas obtidas da zona rural de Jussara-GO (15°51' sul; 50°52' oeste; 317 m altitude), em agosto de 2012. Essas foram identificadas pela professora Maria Teresa Freitas Bara (FF/UFMG), estando em conformidade com as características descritas por Lorenzi e Lacerda (15).

A mini prensa utilizada opera em média 50 ciclos/minuto e espaçadores de 0,4 mm. O tempo de prensagem foi de aproximadamente 15 minutos e a temperatura do óleo obtido foi de 70 a 80°C. Após as prensagens, o óleo obtido foi submetido à centrifugação (5000 g por 10 minutos; centrífuga DCS-16-RV LS Logen®). O armazenamento foi realizado em vidro âmbar sob congelamento (-10 °C).

2.2 Desenvolvimento do método cromatográfico e seleção do fragmento a ser monitorado

Utilizou-se o cromatógrafo em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (GCMS-Q2010 Plus, Shimadzu®), coluna capilar do tipo RTX-5MS (5% difenil/95% dimetil polisiloxano, 0,25mm x 15m) da Restek®, hélio (White Martins®, 6.0) como gás de arraste e ionização por impacto eletrônico e potencial de ionização de 70 eV. As amostras foram injetadas automaticamente (modelo AOC-5000, Shimadzu®) e a análise dos resultados foi realizada utilizando o software GCMS solution versão 2. As temperaturas do injetor, do detector e da interface foram mantidas a 300°C e utilizou-se um fluxo de hélio de 0,66 mL/min.

Os espectros de massas do marcador (β -sitosterol: $\geq 95\%$, Sigma®) e do padrão interno (colesterol: $\geq 97\%$, Vetec®) foram obtidos na faixa de 35 a 500 m/z para avaliar quais fragmentos seriam os mais adequados para quantificação, a qual foi realizada no modo SIM (single ion monitoring), por padronização interna.

A fim de otimizar a separação dos componentes, analisou-se uma solução do óleo de baru a 0,1% em hexanogru HPLC, utilizando diversas condições cromatográficas variando-se a temperatura da coluna (quadro 1).

Os parâmetros de adequabilidade do sistema foram calculados para determinar se o método teria precisão e exatidão adequadas^(16,17). Os parâmetros especificados⁽¹⁷⁾ para avaliar o desempenho do método foram: Fator de retenção (k), Repetitividade (DPR), Resolução (Rs), Fator de cauda (TF), Número de pratos teóricos da coluna (N).

Os solventes usados apresentaram grau analítico.

2.3 Validação do método analítico

A validação do método proposto foi realizada⁽¹⁸⁾ e os parâmetros de seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez foram avaliados.

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da determinação do efeito de matriz, análise da pureza do pico de interesse e verificação da ausência de picos interferentes (presentes no óleo de baru) no tempo de retenção do padrão interno.

O efeito de matriz (EMt) foi avaliado através da construção de duas curvas analíticas, uma preparada na ausência e outra na presença da matriz (óleo de baru a 0,50 mg/mL), utilizando as concentrações de 500, 660, 820, 980, 1160, 1320 e 1500 ng/mL para o padrão (β -sitosterol) e de 1000 ng/mL para o padrão interno(16). A intensidade do EMt (aumento ou supressão do sinal) foi calculada pela razão entre o coeficiente angular da curva analítica na presença da matriz e o coeficiente angular da curva analítica com o solvente(19).

A pureza do pico referente ao β -sitosterol foi avaliada através da similaridade do espectro de massas obtido na faixa de 35 a 500 m/z para a substância de interesse no cromatograma do óleo e do padrão.

Verificou-se ainda a presença ou ausência de picos interferentes no tempo de retenção do padrão interno após injeção da solução do óleo de baru a 0,1% em hexano.

Linearidade e intervalo

A curva analítica foi realizada utilizando sete concentrações, em triplicata, contemplando um intervalo de 50 a 150% da concentração esperada de β -sitosterol no óleo de baru. Utilizaram-se as concentrações de 500, 660, 820, 980, 1160, 1320 e 1500 ng/mL para o padrão e de 1000 ng/mL para o PI, em hexano grau HPLC.

O coeficiente de correlação linear foi calculado por regressão linear através do software Microsoft Office Excel 2007. Realizou-se a análise visual do gráfico de resíduos(20).

Precisão

A precisão foi avaliada pela repetibilidade e pela precisão intermediária, esta última realizada em dois dias diferentes. Foram realizadas nove determinações, contemplando o intervalo linear do método, utilizando três concentrações (baixa, média e alta), aproximadamente 75, 100 e 125% da concentração esperada na amostra, em triplicata, adicionadas de PI. Para tal utilizou-se solução do óleo de baru à aproximadamente 0,75, 1,00 e 1,25 mg/mL, em hexano. Foram calculados o coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR)⁽¹⁸⁾.

Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de recuperação de padrão. Foram preparadas soluções de óleo de baru em três níveis de concentração, correspondendo a 75, 100 e 125% da concentração definida no método (1,00 mg/mL), adicionadas de PI (1000 ng/mL), com e sem adição de quantidade conhecida de padrão de β -sitosterol (500 ng/mL), em triplicata. A exatidão foi calculada, para cada nível, pela razão entre a concentração média experimental (correspondente à concentração recuperada do padrão) e a concentração teórica do padrão adicionado (500 ng/mL)^(16,18).

Robustez

Avaliou-se a robustez variando-se o fluxo (velocidade do gás de arraste): 0,66 mL/min \pm 0,1 mL; taxa de aumento da temperatura de 240 a 310°C: 5,0 °C/min \pm 0,1 °C/min e volume de injeção: 3,0 μ L \pm 0,1 μ L.

2.4 Determinação do teor de β -sitosterol livre e estimativa do valor de fitoesteróis livres, esterificados e totais

O teor de β -sitosterol livre (não esterificado) foi calculado de acordo com o método validado, em triplicata. A amostra (aproximadamente 100 mg) foi adicionada em balão de 10 mL e posteriormente diluída em vial (100 μ L para 1000 μ L). O teor foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Teor (mg / kg)} = \frac{\text{Conc. (ng / mL)} \times \text{FD}}{\text{massa (mg)}}$$

Em que: FD= fator de diluição

2.5 Estimativa do teor de fitoesteróis livres

A concentração dos demais fitoesteróis identificados (campesterol, estigmasterol) foi estimada utilizando a área relativa destes (fragmento 107 m/z) em relação à área do β -sitosterol, de acordo com a equação abaixo. A concentração de fitoesteróis totais foi calculada pela soma das concentrações de todos os fitoesteróis identificados.

$$\text{Teor (mg / Kg)} = \frac{\text{Área do fitoesterol identificado}}{\text{Área do } \beta \text{ sitosterol}} \times \text{Teor de } \beta \text{ sitosterol (mg / Kg)}$$

2.6 Estimativa do teor de fitoesteróis totais (livres e esterificados)

Para quantificar os fitoesteróis totais utilizou-se uma saponificação branda da amostra à temperatura ambiente⁽²¹⁾, a fim de hidrolisar a ligação de esterificação e formar fitoesteróis livres, passíveis de quantificação pelo método proposto. Aproximadamente 100 mg do óleo foram adicionados de PI (colesterol, 100 μ g) e saponificado por 20h, na presença de 9 mL de etanol absoluto e 0,5 mL e solução de KOH a 50%. Acrescentou-se então 10 mL de hexano, agitou-se, e uma alíquota de 400 μ L foi adicionada em vial e diluída para 1000 μ L com hexano.

A quantificação foi feita por padronização interna, de acordo com a equação abaixo^(21,22), aplicando-se um fator de correção (fc) calculado pela razão entre as áreas do PI (fragmento 107 m/z) e padrão de β -sitosterol (fragmento 107 m/z) em hexano.

$$\text{Teor (mg / Kg)} = \frac{\text{Área do fitoesterol}}{\text{Área do PI}} \times \frac{\text{Massa de PI adicionada } (\mu\text{g})}{\text{Massa da amostra (mg)}} \times 1000 \times \text{fc}$$

Em que: fc= fator de correção calculado pela razão entre as áreas do PI (fragmento 107 m/z) e padrão de β -sitosterol (fragmento 107 m/z) em hexano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Desenvolvimento do método analítico e seleção do fragmento a ser monitorado

A fim de obter melhor separação entre os picos de interesse e os demais compostos presentes no fitocomplexo (óleo), assim como alcançar melhor simetria do pico –o que influencia na integração e consequentemente na precisão e exatidão do método analítico – diversas condições cromatográficas foram testadas (quadro 1).

Quadro 1: Condições cromatográficas por CG-EM testadas no desenvolvimento do método para quantificação do β -sitosterol no óleo de baru.

Condições	Temperatura programada da coluna	Resultados
1	150°C/min, aumento de 10°C/min até 310°C, mantido por 30 min(23)	Tempo de corrida longo
2	240°/min, aumento de 10°C/min até 310 °C, mantido por 8 min	Interferente muito próximo ao PI e cauda para o β -sitosterol
3	280°C/min, aumento de 5°C/min até 310 °C, mantido por 8 min	Alargamento dos picos
4	200°C/min, aumento de 10°C/min até 310° C, mantido por 8 min	Separação adequada do interferente e o PI, permanece a cauda para o β -sitosterol
5	200°C/min, aumento de 20°C/min até 280°C, aumento de 5°C/min até 310°C, mantido por 7 min	Diminuição da cauda para o β -sitosterol
6	200°/min, aumento de 20°C/min até 250°C, aumento de 5°C/min até 310°C mantido por 4,5 min	Diminuição da cauda para o β -sitosterol
7	200°/min, aumento de 20°C/min até 240°C, aumento de 5°C/min até 310°C mantido por 5 min	Separação de interferentes potenciais e simetria adequada para o PI e β -sitosterol

Os resultados encontrados para a adequabilidade do sistema (Tabela 1) demonstram que o método está em conformidade com os parâmetros recomendados. Essa avaliação deve ser realizada antes mesmo da validação do método, verificando se o sistema utilizado está funcionando adequadamente e que será capaz de fornecer dados confiáveis^(16,17).

Tabela 1: Parâmetros avaliados quanto à conformidade do sistema (condição 7, quadro 1).

Parâmetros	Especificação ^(16,17)	Resultado	
		Padrão	Padrão interno
Fator de retenção (k)	> 2	11,73	9,41
Resolução (Rs)	> 2	4,32	9,41
Fator de cauda (TF)	≤ 2	1,07	1,08
Número de pratos teóricos da coluna (N)	> 2000	255151	285485
Repetitividade (DPR)	< 1% para n ≥ 5	0,93%	

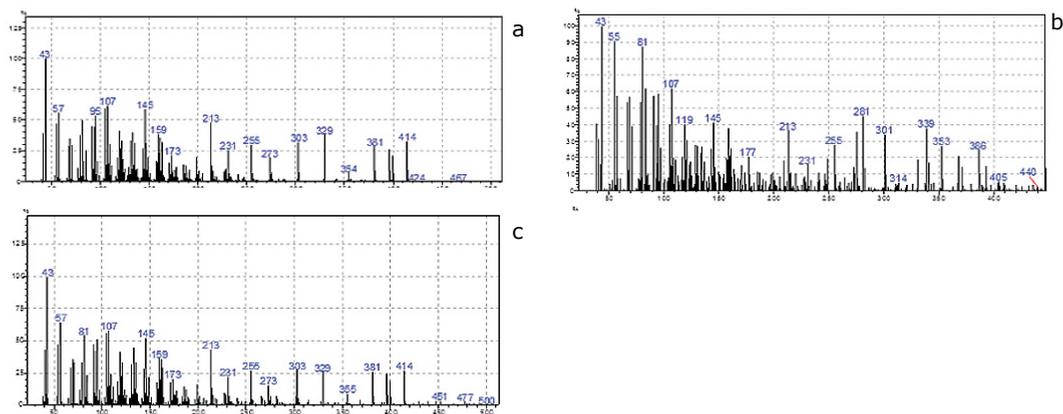
A determinação de fitoesteróis em óleos vegetais é usualmente feita por cromatografia gasosa acoplada a detector de espectrometria de massas ou ionização por chama. O uso de espectrometria de massas apresenta a vantagem de permitir a identificação dos diferentes fitoesteróis através da análise dos espectros de varreduras, sendo, portanto, uma técnica mais seletiva^(7,8).

O colesterol foi selecionado como padrão interno a fim de diminuir o efeito de matriz e aumentar a precisão e exatidão do método. O método de padronização interna é indicado em análises por CG-EM, principalmente por aumentar a exatidão dos resultados encontrados, sendo que um padrão interno ideal deve apresentar estrutura química semelhante ao composto de interesse⁽²⁴⁾. Este mesmo composto foi utilizado por Zhang et al.⁽²¹⁾ na análise de produtos de oxidação do β -sitosterol em óleos vegetais.

Após análise dos espectros de massas (Figura 1) e testes de repetitividade, optou-se por utilizar o fragmento 107 m/z para quantificação do β -sitosterol e do colesterol.

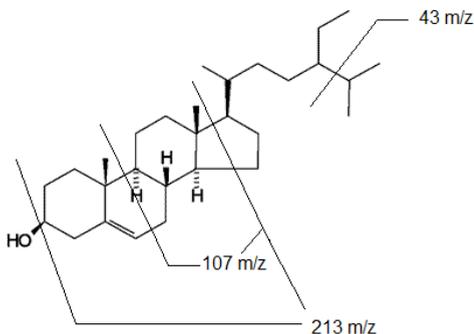
Destaca-se que a quantificação de compostos por espectrometria de massas pode ser feita no modo TIC (Total Ion Counting), em que todos os fragmentos iônicos formados são somados para obtenção da área dos picos, ou no modo SIM (Selected Ion Monitoring)⁽²⁴⁾. Nesse modo, apenas um fragmento iônico selecionado é utilizado para quantificação e é o mais recomendado por aumentar a seletividade e a sensibilidade do método em até 1000 vezes. Assim, optou-se por utilizar apenas um fragmento para quantificação dos compostos de interesse, selecionado após avaliação do espectro de massas do β -sitosterol e do colesterol (PI) e o cromatograma obtido para o óleo de baru (Figura 1). Observa-se que em ambos os espectros, o pico base (de maior intensidade) é o de 43 m/z. Porém o ensaio de repetitividade utilizando este fragmento apresentou coeficiente de variação de 1,81% para a razão entre as áreas do pico do β -sitosterol e PI, maior que o recomendado, que é 1%⁽¹⁷⁾. Os fragmentos 55 e 81 m/z, referentes ao colesterol, apresentaram, assim como o fragmento 43 m/z, instabilidade na linha de base, o que poderia prejudicar a integração dos picos.

Figura 1: Espectros de massas do β -sitosterol (a), colesterol: PI (b) e do pico referente ao β -sitosterol no cromatograma obtido para o óleo de baru – condição 7, quadro 1 (c).



A figura 2 apresenta a fragmentação proposta para o β -sitosterol, na qual se observa que o pico base (43 m/z) corresponde a uma cadeia lateral carbônica, enquanto os picos 107 m/z e 213 m/z pertencem ao núcleo esteroidal, sendo estes últimos, portanto, mais representativos desta molécula.

Figura 2: Fragmentação por EM proposta para o β -sitosterol.



Fonte: Zhanget al.⁽²⁵⁾

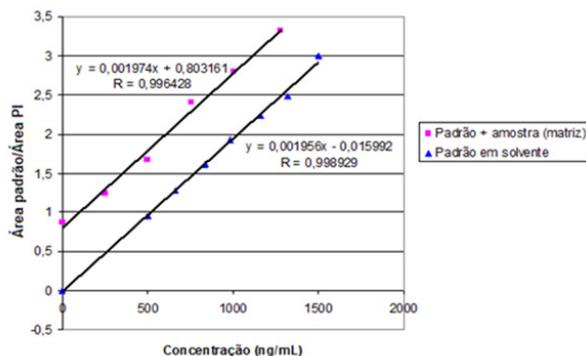
3.2 Validação do método analítico por CG-EM para quantificação do marcador β -sitosterol

Seletividade

A ausência de efeito de matriz foi verificada comparando-se o coeficiente angular das curvas obtidas do padrão em solvente e da amostra em concentrações crescentes acrescida de padrão. A Figura 3 apresenta as curvas obtidas, em que a intensidade do efeito de matriz encontrado foi de 0,92%. Valores de até 20% são considerados de baixa intensidade⁽¹⁹⁾. Dessa forma, demonstrou-se que o método proposto não apresenta interferência da matriz em diferentes concentrações do óleo. Vale ressaltar que sem o PI os valores de efeito matriz foram de 24,05%, o que poderia prejudicar, principalmente, a exatidão do método.

Para análises de teor, em amostras em que a matriz isenta do composto de interesse não pode ser obtida, como no caso de produtos vegetais, pode-se avaliar a seletividade do método por meio da determinação do efeito de matriz, comparando-se o paralelismo de curvas analíticas preparadas com padrão na presença e na ausência da amostra⁽¹⁶⁾, justificando assim o uso desta técnica no presente trabalho.

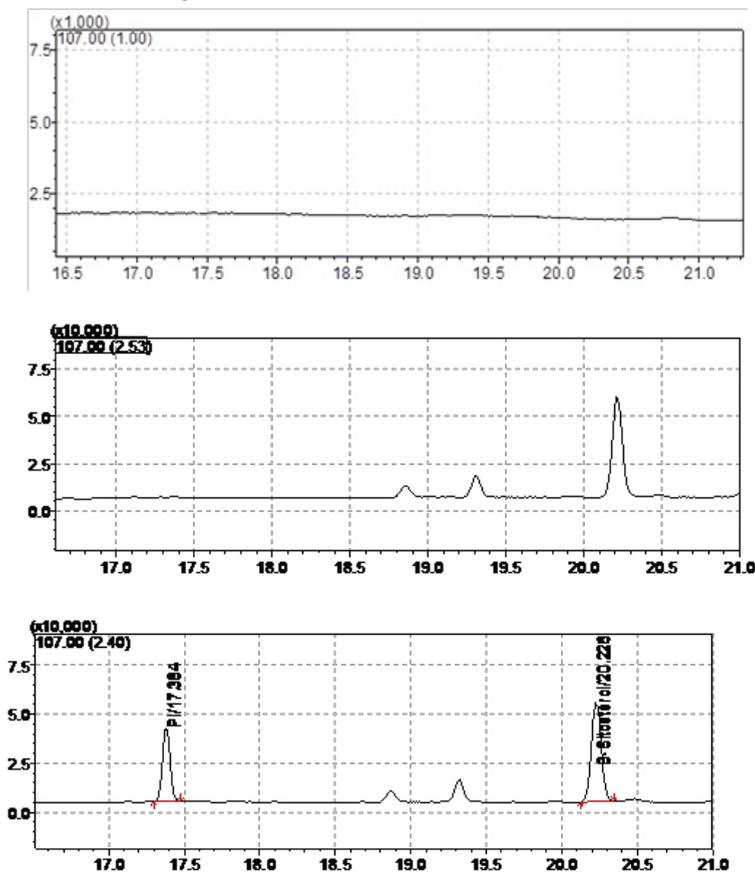
Figura 3: Avaliação do efeito de matriz. Curvas analíticas obtidas para o β -sitosterol na presença da amostra (óleo de baru) e em solvente (hexano).



Além disso, os espectros de massas do pico referente ao β -sitosterol no padrão e no óleo de baru (Figura 1) apresentaram similaridade de 97%. Um alto índice de similaridade indica a ausência de interferentes co-eluído com o analito no método proposto⁽²⁶⁾.

A Figura 4 demonstra a ausência de possíveis interferentes no solvente utilizado (hexano) e no tempo de retenção do colesterol (PI) na amostra de óleo de baru, confirmando que este PI pode ser utilizado no método definido.

Figura 4: Cromatogramas ampliados. (a) hexano; (b) óleo de baru a 1,00 mg/mL; (c) óleo de baru a 1,00 mg/mL adicionada de PI a 1000 ng/mL.



A diluição empregada para determinação do perfil cromatográfico do óleo de baru foi elevada, o que pode ser justificado pela sensibilidade do método validado por CG-EM. Além disto, como existem dificuldades analíticas na determinação dos fitosteróis em óleos vegetais, devido ao baixo conteúdo encontrado e o número de interferentes, esse método por CG-EM apresenta vantagens em relação aos aspectos analíticos.

Linearidade

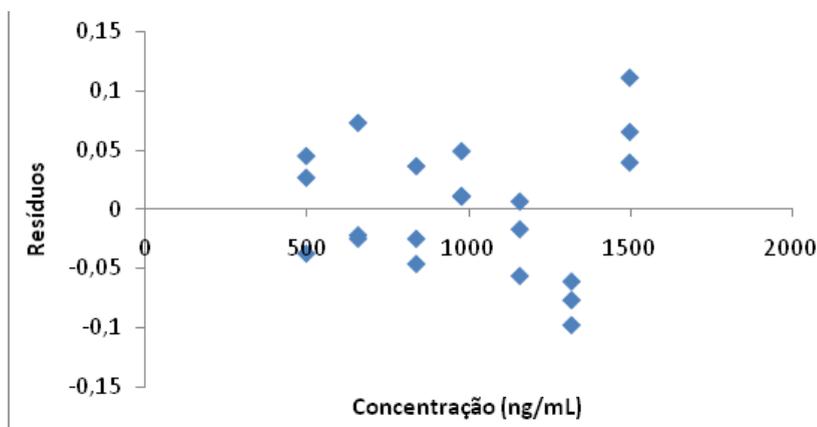
O método apresentou linearidade e o coeficiente de correlação (R) obtido foi $R=0,997889$, estando em conformidade com a normatização⁽¹⁸⁾. A equação da reta obtida para o padrão de β -sitosterol foi $y= 0,001976x - 0,038827$. Os valores de erro relativo calculados variaram de -0,71 a 3,01% (Tabela 2).

Tabela 2: Resultados da curva analítica obtida para o padrão de β -sitosterol em hexano.

Concentração teórica (ng/mL)	Razão das áreas β -sitosterol/Padrão interno	Concentração calculada (ng/mL)	Erro relativo (%)
500	0,96	505,62	1,12
660	1,27	664,32	0,65
840	1,61	834,08	-0,71
980	1,92	991,94	1,22
1160	2,23	1148,76	-0,97
1320	2,49	1280,29	-3,01
1500	2,30	1536,46	2,43

É recomendado ainda a análise visual do gráfico de resíduos para validação de métodos analíticos para produtos vegetais⁽²⁰⁾. Os resíduos são calculados pela diferença entre o valor observado em y e o valor que foi predito pelo modelo de regressão aplicado. Os valores de resíduos encontraram-se randomicamente distribuídos ao redor da linha zero (Figura 5) e com isso assume-se que o modelo adotado para regressão foi adequado⁽²⁰⁾.

Figura 5: Gráfico de resíduos da curva analítica obtida para o padrão de β -sitosterol.



Precisão

Os resultados encontrados para precisão ao nível de repetibilidade e precisão intermediária estão descritos na Tabela 3. Os coeficientes de variação (CV) calculados foram menores que 5%, conforme o estabelecido⁽¹⁸⁾.

Tabela 3: Resultados referentes à precisão ao nível de repetibilidade e precisão intermediária do teor de β -sitosterol no óleo de baru.

Nível	Massa de OBa (mg)	Conc. de BSb calculada (ng/mL)	Teor de BSb (mg/kg)	Média	%CVc (intra-dia)	%CVc (inter-dia)
Dia 1						
75%	74,2	704,21	949,07			
75%	76,6	740,64	966,90			
75%	74,2	702,14	946,23			
100%	100,6	904,94	899,54			
100%	101,3	938,73	926,69	919,91	3,07	4,49
100%	102,9	926,41	900,30			
125%	127,1	1150,42	905,13			
125%	123,4	1094,89	887,27			
125%	125,0	1122,58	898,06			
Dia 2						
75%	74,8	770,41	1029,96			
75%	77,9	742,95	953,73			
75%	74,8	707,35	945,65			
100%	106,7	1049,01	983,14			
100%	107,7	1007,34	935,32	965,79	4,43	4,49
100%	99,4	1018,30	1024,45			
125%	123,8	1147,03	926,52			
125%	124,8	1132,77	907,67			
125%	125,3	1235,06	985,68			

^aÓleo de baru; ^b β -sitosterol; ^cCoeficiente de variação.

Exatidão

Nos resultados de exatidão (Tabela 4) foram verificados valores entre 93,79% e 105,15% (%CV=3,23). De acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC)⁽²⁷⁾, a faixa de aceitação varia de acordo com a concentração do analito na amostra. Uma vez que o teor calculado para o óleo de baru foi de 0,091%, a faixa de aceitação de recuperação é de 90 a 107% (para concentrações entre 0,01 e 0,1%), sendo assim, o método foi considerado exato.

Tabela 4: Resultados referentes à exatidão do teor de β -sitosterol no óleo de baru, avaliada pelo método de recuperação de padrão.

Nível	Massa de OBa (mg)	Concentr. calculada sem padrão (ng/mL)	Concentr. calculada com padrão (ng/mL)	Concentr. real do padrão (ng/mL)	Concentr. teórica do padrão (ng/mL)	Exatidão (%)
75%	75,0	770,41	1248,18	477,77		95,71
75%	78,0	742,95	1228,61	485,66		97,23
75%	74,4	707,35	1175,53	468,18		93,79
100%	100,5	915,71	1401,92	486,21		97,40
100%	100,3	921,59	1404,85	483,26	499,19 \pm 21,63	96,81
100%	101,4	964,75	1450,33	485,58		97,27
125%	131,9	1235,06	1730,66	495,59		99,28
125%	127,4	1122,83	1647,71	524,88		105,15
125%	123,7	1156,39	1651,40	495,01		99,16

^aÓleo de baru.

A exatidão investigada pelo ensaio de recuperação do padrão (medida em porcentagem) representa a proporção de substância adicionada na amostra que é passível de ser quantificada. Deve-se considerar que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra, o que pode levar a valores errôneos de recuperação. Para garantir que tal equívoco não ocorra, o ensaio deve ser realizado em, pelo menos, três concentrações diferentes, abrangendo o intervalo do método. Além disso, o efeito de matriz deve ser investigado, o qual apresentou resultados adequados (Figura 4).

Robustez

Os resultados dos ensaios de robustez estão dispostos na Tabela 5. Observa-se que todos os desvios foram menores que 2,35%, indicando que o método é robusto nas condições avaliadas, não sendo afetado por pequenas modificações.

Tabela 5: Resultados de robustez para o método de determinação do β -sitosterol no óleo de baru.

Modificação	Conc. calculada (ng/mL)	%CV ^a entre o método modificado e original
Método original	863,56 \pm 7,83	-
Volume de injeção	2,9 μ L	1,27
	3,1 μ L	0,74
Fluxo	0,56 mL/min	1,58
	0,76 mL/min	1,08

Modificação		Conc. calculada (ng/mL)	%CV ^a entre o método modificado e original
Taxa de aumento da temperatura entre 240 e 310°C	4,9 °C/min	892,71 ± 4,18	2,35
	5,1 °C/min	843,40 ± 7,69	1,67

^aCoeficiente de variação.

3.3 Determinação do teor de β -sitosterol livre e valor estimado de fitoesteróis livres e totais no óleo de baru

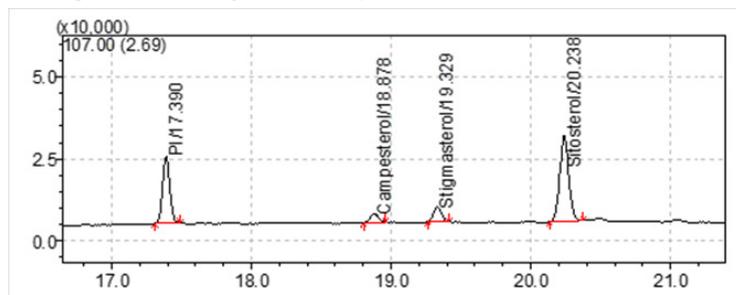
Foram identificados fitoesteróis como o campesterol, estigmasterol e β -sitosterol (Figura 6), os quais apresentam atividades hipocolesterolemiantes^(12,28), anti-inflamatória⁽²⁹⁾, antioxidante⁽³⁰⁾ e anticarcinogênica⁽³¹⁾.

Estudos sugerem que os fitoesteróis, principalmente o β -sitosterol, possuem efeito sobre o sistema reprodutor de animais e que possuem efeitos estrogênicos⁽¹¹⁾. Tal fato coincide com o uso popular do baru como regulador da menstruação^(1,2). Além disso, a presença de compostos com atividade anti-inflamatória como os fitoesteróis pode estar relacionada com o uso do óleo de baru pela população como antirreumático^(1,2).

O procedimento proposto de determinação de esteróis em óleos vegetais após saponificação, sem etapa posterior de isolamento se aplica ao óleo estudado.

O interesse em avaliar fitoesteróis em óleos vegetais vem crescendo devido a sua aplicação em prevenção de dislipidemias e doenças cardiovasculares (pela diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo) e proteção contra tumores estimulados por estrogênio^(8,11,12).

Figura 6: Cromatograma obtido por CG-EM (modo TIC), indicando os fitoesteróis identificados no óleo de baru.



Observou-se uma concentração de fitoesteróis totais neste óleo de baru de 1464,41 mg/kg e que a maior parte desses está na forma livre (1195,49 mg/kg) (Tabela 6). Os fitoesteróis livres e esterificados são igualmente eficazes na redução do colesterol plasmático e hepático⁽³²⁾.

Tabela 6: Teor de fitoesteróis livres e totais no óleo de baru obtido por prensagem mecânica.

	Fitoesteróis livres		Fitoesteróistotais	
	Área relativa (%)	Teor (mg/kg)	Área relativa (%)	Teor (mg/kg)
β-sitosterol	76,02 ± 1,29	908,84 ± 15,46	78,11 ± 0,75	1143,95 ± 11,06
Campesterol	8,97 ± 0,13	107,29 ± 1,59	7,59 ± 0,19	111,03 ± 2,70
Estigmasterol	15,01 ± 0,26	179,36 ± 3,20	14,30 ± 0,19	209,43 ± 2,79
	100	1195,49 ± 11,28	100	1464,41 ± 21,43

A identificação de campesterol, estigmasterol e β-sitosterol no óleo de baru foi descrita na literatura⁽¹⁰⁾ e a quantificação por meio de um método diferente por CG com detector de ionização de chamas⁽¹³⁾ foi respectivamente de 272,0 ± 0,02; 238,9 ± 1,40 e 691,2 ± 0,47 mg/Kg. Esses valores distintos dos encontrados nesse estudo podem ser justificados por diferenças relacionadas ao local de cultivo, época de coleta, processamento, método extrativo⁽³³⁾ ou mesmo pelo uso de outra metodologia analítica.

Os valores de fitoesteróis livres encontrados nesse estudo (tabela 6) são próximos aos do óleo de amendoim e azeite de oliva⁽³⁴⁾ (Quadro 2). O óleo de soja⁽³⁴⁾ e de girassol⁽³⁵⁾ apresentam valores superiores ao baru.

Em relação aos fitoesteróis totais, o óleo de baru apresentou valor mais próximo do azeite de oliva⁽²²⁾. Foram verificados valores superiores ao baru para os óleos de amendoim⁽³⁴⁾ e de girassol⁽³⁵⁾ (Quadro 2).

O teor de β-sitosterol livre no óleo de baru (tabela 6) foi próximo aos relatados para os óleos de soja e amendoim⁽³⁴⁾. Para o óleo de milho é descrito um valor inferior ao baru⁽³⁶⁾ e para os óleos de gérmen de trigo e de semente de algodão⁽³⁶⁾, de girassol⁽³⁵⁾ e azeite de oliva⁽²²⁾ valores superiores ao baru (Quadro 2).

Quadro 2: Valores de fitoesteróis encontrados em óleos vegetais.

Fitoesteróis livres	
óleo de amendoim	1128,44 - 1956,6 mg/kg ⁽³⁴⁾
azeite de oliva	911,8 mg/kg ⁽³⁴⁾
óleo de soja	2102,2 mg/kg ⁽³⁴⁾
óleo de girassol	2060,84 - 2802,7 mg/kg ⁽³⁵⁾
Fitoesteróis totais	
azeite de oliva	1211 - 2870,5 mg/kg ⁽²²⁾
óleo de amendoim	2097 - 8200,9 mg/kg ⁽³⁴⁾
óleo de girassol	3269 - 6586,7 mg/kg ⁽³⁵⁾
óleo de baru	121,73 mg/100g ⁽¹³⁾
β-sitosterol livre	
óleo de soja	703,30 - 1720,1 mg/kg ⁽³⁴⁾
óleo de amendoim	635,9 - 1530 mg/kg ⁽³⁴⁾
óleo de milho	329,67 mg/kg ⁽³⁶⁾
óleo de gérmen de trigo	1780,22 mg/kg ⁽³⁶⁾

óleo da semente de algodão	1428,57 mg/kg ⁽³⁶⁾
óleo de girassol	2177 - 4023,2 mg/kg ⁽³⁵⁾
azeite de oliva	1497,2 mg/kg ⁽²²⁾
óleo de baru	69,12 ± 0,47 mg/100g ⁽¹³⁾

Baseado no conteúdo de fitoesteróis livres e totais presentes no óleo de baru pode-se sugerir seu potencial para estudos de pesquisa e desenvolvimento de bioprodutos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo contribuiu para um maior conhecimento sobre a composição química do baru, espécie vegetal do Cerrado. Foi possível desenvolver e validar um método analítico por CG-EM que constitui uma possibilidade para uso no controle de qualidade do óleo de baru.

Agência de fomento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).

5. REFERÊNCIAS

1. Barros MAG. *Flora medicinal do Distrito Federal*. Brasil Florestal. 1982; 12(50): 35-45.
2. Sano SM, Ribeiro JF, Brito MA. *Baru: biologia e uso*. Documentos 116, Planaltina: EMBRAPA; 2004.
3. Takemoto E, Okada IA, Garbelotti ML, Tavares M, Aued-Pimentel S. *Composição química da semente e do óleo de baru (Dipteryx alata Vog.) nativo do Município de Pirenópolis, Estado de Goiás*. Rev. Instituto Adolfo Lutz. 2001; 60(2):113-117.
4. Klein T, Longhini R, Bruschi ML, Mello JCP. *Fitoterápicos: um mercado promissor*. Rev. Cienc. Farm. Bas. Apl. 2009; 30(3):241-248.
5. Tarazi R, Moreno MA, Gandara FB, Ferraz EM, Moraes MLT, Vinson CC, Ciampi AY, Vencovsky R, Kageyama PY. *High levels of genetic differentiation and selfing in the Brazilian cerrado fruit tree Dipteryx alata Vog. (Fabaceae)*. Genet. Mol. Biol. 2010; 33(1):78-85.
6. Abidi SL. *Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils*. J. Chromatogr. A. 2001;935:173–201.
7. Cert A, Moreda W, Pérez-Camino MC. *Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils*. J. Chromatogr. A. 2000; 881(1-2):131-148.
8. Gromadzka J, Wardencki W. Trends in Edible Vegetable Oils Analysis. Part A. *Determination of Different Components of Edible Oils – a Review*. Pol. J. Food Nutr. Sci. 2011; 61(1):33-43.
9. Marques FG. *Estudo da composição química e microencapsulação do óleo fixo de Dipteryx alata Vogel Fabaceae (baru)*. [Dissertação de mestrado]. Goiânia:Universidade Federal de Goiás; 2013. 115 p.
10. Marques FM, Oliveira Neto JR, Cunha LC, Paula JR, Bara MTF. *Identification of terpenes and phytosterols in Dipteryx alata (baru) oil seeds obtained through pressing*. Braz. J. Pharmacogn. 2015; 25(4) :522–525.

11. Ju YH, Clausen LM, Allred KF, Almada AL. *β -Sitosterol, β -Sitosterol Glucoside, and a Mixture of β -Sitosterol and β -Sitosterol Glucoside Modulate the Growth of Estrogen-Responsive Breast Cancer Cells in vitro and in Ovariectomized Athymic Mice*. J. Nutrition. 2004; 134(5):1145-1151.
12. Sposito AC, Caramelli B, Fonseca FAH, Bertolami MC. *IV Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose*. Arq. Bras. Cardiol. 2007; 88(suppl. 1):S1-19.
13. Luzia DMM. *Propriedades funcionais de óleos extraídos de sementes de frutos do cerrado brasileiro* (tese doutorado). São José do Rio Preto: [s.n.], 2012. 234 f. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas
14. Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. *Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses*. ProgressLipid Res. 2002; 41:457–500.
15. Lorenzi H, Bacher L, Lacerda M, Sartori S. *Frutas brasileiras e exóticas cultivadas*. São Paulo: Instituto Plantarum; 2006.
16. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Quim. Nova. 2004; 27(5): 771-780.
17. United States Food and Drug Administration (US – FDA), Center of Drug Evaluation and Research (CDER) Reviewer Guidane. *Validation of Chromatographic Methods*, 1994.
18. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003 - *Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. Brasília (Brasil): Ministério da Saúde; 2003.
19. Economou A, Botitsi H, Antoniou S, Tsipi D. *Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A. 2009; 1216: 5956-5867.
20. *Brasil, Orientações sobre “Controle de qualidade de extratos vegetais e fitoterápicos”*. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/Controle_qualidade_extratos.pdf, Acesso em 09 de julho de 2012.
21. Zhang X, Julien-David D, Miesch M, Raul F, Geoffroy P, Aoude Werner D, Ennahar S, Marchioni E. *Quantitative Analysis of β -Sitosterol Oxides Induced in Vegetable Oils by Natural Sunlight, Artificially Generated Light, and Irradiation*. J. Agricult. Food Chem. 2006; 54:5410-5415.
22. Becker DFS, Gonçalves LAG, Grimaldi R, Fernandes GB. *Quantificação de fitosteróis em azeite de Oliva importados e disponíveis no comércio de Campinas utilizando Cromatografia em Fase Gasosa*. Braz. J. Food Technol. 2005; 8(3):190-199.
23. Kadioglu Y, Demirkaya F, Demirkaya AK. *Quantitative determination of underivatized β -tocopherol in cow milk, vitamin and multivitamin drugs by GC-FID*. Chromatographia 2009;70(3/4):665-670.
24. Hites RA. *Gas Chromatography Mass Spectrometry*. In: Settle, FA, editor. Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Arlington: Prentice Hall; 1997. p.609-626.
25. Zhang C, Wang Y, Qi S. *Identification and significance of sterols in MSW landfill leachate*. J. Chromatogr. B. 2008; 874:1–6.
26. Bertol G. 2010. *Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de matérias-primas e produto contendo *Uncaria tomentosa* (willd.) DC. Rubiaceae*. [Dissertação de mestrado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010. 141 p.

27. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Peer-Verified Methods Program, Manual on policies and procedures, Arlington: AOAC International; 1998.
 28. Bartnikowska E. *Biological activities of phytosterols with particular attention to their effects on lipid metabolism*. Polish J.Food Nutr.Sci. 2009; 59(2):105-112.
 29. Garcia MD, Saenz MT, Gomez MA, Fernandez MA. *Topical antiinflammatory activity of phytosterols isolated from Eryngiumfoetidum on chronic and acute inflammation models*. Phytother. Res. 1999; 13(1):78-80.
 30. Yoshida Y, Niki E. *Antioxidant effects of phytosterol and its components*. J.Nutr. Sci.Vitaminol.2003; 49(4):277-280.
 31. Awad AB, Fink CS. *Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action*. J. Nutr. 2000; 130:2127-2130.
 32. Hayes KC, Pronczuk A, Wijendran V, Beer M. *Free Phytosterols Effectively Reduce Plasma and Liver Cholesterol in Gerbils Fed Cholesterol*. J. Nutrition. 2002; 132(7):1983-1988.
 33. Gobbo-Neto L, Lopes NP. *Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários* Quim. Nova. 2007; 30: 374-381.
 34. Choong Y, Lin H, Chen C, Wang MA. *Rapid Gas Chromatographic Method for Direct Determination of Free Sterols in Animal andVegetable Fats and Oils*. J. Food Drug Anal. 1999; 7(4):279-290.
 35. Kalo P,Kuuranne T. *Analysis of free and esterified sterols in fats and oils by flash chromatography, gas chromatography and electrospray tandem mass spectrometry*. J.Chromatogr. A. 2001; 935: 237-248.
 36. Ye J, Chang W, Hsieh DJ, Hsiao M. *Extraction and analysis of β -sitosterol in Herbal Medicines*. J. Med. Plants Res. 2010; 4(7):522-527.
-