

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

JÉSSICA GUERREIRO MARTINS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA  
DETERMINAÇÃO DE FITOESTERÓIS EM ÓLEO VEGETAL  
ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

APUCARANA

2016

JÉSSICA GUERREIRO MARTINS

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA  
DETERMINAÇÃO DE FITOESTERÓIS EM ÓLEO VEGETAL  
ASSISTIDA POR ULTRASSOM**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso Superior de Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Apucarana, como requisito parcial para obtenção do título de licenciada.

Orientador: Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafe  
Co-orientadora: Dra. Luana Caroline de Figueiredo

APUCARANA

2016

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafe  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Apucarana  
Orientador

---

Prof. Dr. Alessandro Francisco Martins  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Apucarana  
Membro

---

Profa. Dra. Silvana Fernandes Montanher  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Apucarana  
Membro

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por iluminar e guiar meus caminhos, pelas graças recebidas e por me dar persistência, determinação e força interior para superar as dificuldades.

Ao meu pai Sebastião e minha mãe Claudinéa, *em memória*, que são e sempre serão o alicerce da minha educação moral, religiosa e profissional. Obrigada pelos incontáveis conselhos e pelo constante apoio e incentivo. Amo vocês. “Mãe, o tempo que passamos juntas foi curto, mas bastante o suficiente para aprender e tentar ser um pouco da pessoa maravilhosa que você foi, meu maior exemplo de luta, amor, perseverança e dedicação. Essa conquista é nossa. Você sempre estará nos meus pensamentos, nas minhas orações e no meu coração. Saudades eternas”.

A minha irmã Myllena, a tia Vi, o tio Ale, a vovó (mãe) Noêmia, o vovô (pai) Divo e as minhas primas Ale e Alice, obrigada por tudo, vocês são a minha base, o meu conforto e a minha alegria.

Ao meu namorado Marcos, pelo companheirismo, pela ajuda nos momentos mais difíceis, pelas palavras de fé, apoio e incentivo para a realização deste curso. Amo você.

Ao meu orientador Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafé, exemplo de paciência, dedicação e competência. Serei eternamente grata a todos os ensinamentos e oportunidades recebidas.

A minha co-orientadora Dra. Luana Caroline de Figueiredo, por toda sua simpatia, como pela ajuda no laboratório e pelos materiais disponibilizados.

Aos professores Dra. Silvana Fernandes Montanher e Dr. Alessandro Francisco Martins por aceitarem o convite de participação da banca.

A professora Profa. Dra. Rúbia Michele Suzuki por me fascinar pela analítica, pela orientação, ajuda e disponibilidade, em todos os momentos que precisei.

A Prof. Dra. Lilian T. D. Tonin pelas diversas oportunidades e tempo de experiência no PIBID, acreditando nos meus trabalhos, apresentando ideias. Você foi a base do meu desenvolvimento acadêmico.

Aos meus amigos da UTFPR: Ana Beatriz, Ana Carla, Ana Paula, Ana Pedrozo, Bia, Bruna, Bruno, Flavianny, Jocácia, Renato, Washington e fora: Ana Caroline, Isadora, Joice e Juliana, pelos conselhos preciosos, pela atenção, apoio, convivência, aprendizado, troca de experiências, momentos alegres e pela amizade.

## RESUMO

MARTINS, Jéssica. Desenvolvimento de método analítico para determinação de fitoesteróis em óleo vegetal assistida por ultrassom. 2016. 45 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2016.

Este trabalho buscou otimizar condições experimentais para determinação de fitoesteróis através da metodologia de superfície de resposta, tipo Box-Behnken, utilizando a radiação na frequência do ultrassom como fonte de energia e validar este novo método. As variáveis foram investigadas em três níveis -1, 0, e +1, sendo: quantidade de amostra, volume de solução etanólica de KOH adicionada e tempo de ultrassom. O novo método desenvolvido foi avaliado a partir dos parâmetros analíticos de validação como a seletividade, linearidade, faixa linear dinâmica, precisão “*intra-day*”, exatidão e limites de detecção e quantificação. As condições otimizadas apresentaram para o estigmasterol valores de 0,25 g de óleo, 2,5 mL de solução básica e 300 segundos para o tempo de ultrassom. Já para o  $\beta$ -sitosterol os pontos ótimos foram obtidos por 0,25 g de óleo, 5,40 mL de solução básica e 300 segundos no tempo de ultrassom. Diante dos resultados obtidos e da análise realizada pelos parâmetros, pode-se dizer que o método possui a mesma eficiência do tradicional, e ainda reduziu significativamente o tempo de análise de 3600 segundos para 300 segundos na etapa da saponificação, quando comparado ao método tradicional.

**Palavras-chave:** Otimização. Box-Behnken. Ultrassom.

## ABSTRACT

MARTINS, Jéssica G. Development of analytical method for determinations of phytosterols in vegetable oil assisted by ultrasound. 2016. 45 p. Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2016.

This work sought to optimize experimental conditions for determination of phytosterols through the methodology of answer surface, kind Box- Behnken, using radiation in the ultrasound frequency as an energy source and validate this new method. The variables were investigated in three levels -1,0, and +1: amount of sample, volume of ethanolic solutions of KOH added and ultrasound time. The new method developed was evaluated from analytical parameters of validation selectivity, linearity, linear dynamic range, precision “intra-day”, accuracy and detection limits and quantification. The optimized conditions presented to a stigmasterol values of 0,25 g of oil, 2,5 mL of basic solution and 300 seconds for ultrasound time. Already for  $\beta$ -sitosterol the optimal point they were obtained 0,25 g of oil, 5,40 mL of basic solution and 300 seconds for ultrasound time. In front of the obtained results and the analysis performed by parameters, it can be said that the method it has the same efficiency of the traditional, and also significantly reduced analysis time of 3600 seconds for 300 seconds in the saponification step as compared to the traditional method.

**Keywords:** Optimization. Box-Behnken. Ultrasound.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos fitoesteróis: (a) Estigmasterol, (b) $\beta$ -sitosterol e (c) Campesterol.....	13
Figura 2 - Box-Behnken design para três fatores.....	18
Figura 3 – Etapas realizadas no desenvolvimento do novo método analítico.....	25
Figura 4 – Cromatograma do azeite de oliva contendo adição dos padrões de fitoesteróis.....	28
Figura 5 - Superfície de resposta para a otimização da concentração do estigmasterol presente na amostra de azeite de oliva.....	32
Figura 6 - Superfície de resposta para a otimização da concentração do $\beta$ -sitosterol presente na amostra de azeite de oliva.....	32
Figura 7 - Curvas analíticas realizadas através dos métodos de padronização interna (A) e adição padrão (B) para o composto $\beta$ -sitosterol.....	34
Figura 8 - Curvas analíticas realizadas através dos métodos de padronização interna (A) e adição padrão (B) para o Estigmasterol.....	35

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
UV	Radiação ultravioleta
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
$\sigma$	Desvio padrão absoluto
s	Estimativa do desvio padrão absoluto
RSD	Estimativa do desvio padrão relativo
CV	Coefficiente de variação
RSM	Metodologia de superfície de resposta
ANOVA	Análise de variância



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>12</b>
3.1 ÓLEOS E GORDURAS.....	12
3.2 FITOESTERÓIS.....	13
3.3 CROMATOGRAFIA.....	14
3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	15
3.4 ULTRASSOM.....	16
3.5 OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL .....	17
3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO.....	18
3.6.1 Linearidade e faixa de aplicação.....	19
3.6.2 Exatidão.....	20
3.6.3 Precisão .....	21
3.6.4 Limite de detecção (LD) .....	21
3.6.5 Limite de quantificação (LQ).....	22
3.6.6 Seletividade.....	22
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>24</b>
4.1 MATERIAIS.....	24
4.1.1 Reagentes.....	24
4.2 PROCEDIMENTOS.....	24
4.2.1 Preparo dos fitoesteróis.....	24
4.2.2 Estudo da otimização.....	25
4.2.3 Análise cromatográfica dos fitoesteróis.....	26
4.2.4 Seletividade.....	27
4.2.5 Linearidade e faixa linear dinâmica.....	27
4.2.6 Precisão e exatidão.....	27
4.2.7 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ).....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>28</b>
5.1 Identificação do cromatograma.....	28
5.2 Otimização do experimento por superfície de resposta tipo Box-Behnken.....	28
5.3 Validação da metodologia analítica.....	33
5.3.1 Seletividade, linearidade e faixa linear dinâmica.....	33
5.3.2 Precisão e exatidão.....	36
5.3.3 Limite de detecção e quantificação.....	38
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>39</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Em busca de uma alimentação mais saudável e com objetivo de prevenir doenças, pode ser observado um aumento no consumo de fitoesteróis, devido aos efeitos benéficos atribuído a ingestão destes compostos apontados em vários estudos, como à redução da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (KATAN et al., 2003; CUNHA; FERNANDES; OLIVEIRA, 2006; ROCCO; FANALI, 2009) e a sua utilização na prevenção de tumores (RUDKOWSKA, 2010; SAKAMOTO et al., 2010).

Os fitoesteróis ou esteróis são álcoois constituídos por 28 ou 29 átomos de carbono, semelhantes ao colesterol tanto na sua estrutura como na função. Sua principal função em células vegetais, está relacionada à capacidade de regular a fluidez e a permeabilidade nas membranas celulares (LAGARDA; GARCIA-LLATAS; FARRÉ, 2006; BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008). Podem ser encontrados em alimentos de origem vegetal, como óleos vegetais, grãos, legumes, nozes, frutas e sementes, porém em concentrações elevadas nos óleos vegetais (WILLEMS; BLOMMAERT; TRAUTWEIN, 2013; ACEVEDO; FRANCHETTI, 2016). Os mais encontrados na natureza são estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e campesterol (BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008; DZIEDZIC et al., 2016).

Devido as propriedades descritas anteriormente, houve um aumento no interesse em quantificar fitoesteróis nos alimentos. Além disso, passa ser um procedimento importante para a verificação da identidade e qualidade dos óleos vegetais (LAGARDA; GARCIA-LLATAS; FARRE, 2006).

Procedimentos analíticos utilizados para análise de fitoesteróis, geralmente envolvem a extração da fração lipídica, seguida pela hidrólise alcalina, extração da fração insaponificável, a derivatização dos fitoesteróis, separação e quantificação cromatográfica (FENG et al., 2015; DOLATOWSKI; STADNIK; STASIAK, 2007; CHEMAT; HUMA-E; KHAN, 2011). Entretanto, a transferência de energia para o sistema por aquecimento e outras fontes, como a radiação na frequência de micro-ondas e ultrassom vem sendo aplicadas (FERNANDEZ-CUESTA et al, 2012; ZARA et al., 2012; JÚNIOR et al., 2014).

As tecnologias de extração são associadas a técnicas estatísticas e matemáticas, como a metodologia de superfície de resposta, possuindo como principal objetivo o desenvolvimento de projetos, para se obter uma ótima resposta.

Se os dados experimentais não podem ser descritos por uma função linear, é utilizado os modelos experimentais, sendo escolhido o planejamento fatorial tipo *Box-Behnken*. Consiste em uma ferramenta baseada no planejamento fatorial de três níveis que apresentam boa eficiência ao número de experimentos necessários para a obtenção de modelos. Mesmo apresentando pequena aplicação em química analítica, optou-se por esse modelo, pelo fato de avaliar o processo de otimização em três níveis dos fatores e apresentar um número de ensaios reduzidos, mas com eficiência na sua aplicação (BEZERRA et al., 2008).

Existem vários métodos para a determinação de fitoesteróis em óleos vegetais, sendo a maior parte baseada em técnicas cromatográficas. Em especial, a cromatografia líquida de alta eficiência, tanto em fase normal como reversa, é utilizada em análises de lipídios e esteróis em uma ampla variedade de matrizes (LAGARDA; GARCÍA-LLTAS; FARRÉ, 2006; SLAVIN; YU, 2012; SRIRAMAN et al., 2015; GRÜN; BESSEAU, 2016).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar e validar uma nova metodologia analítica para determinação de fitoesteróis em azeites, utilizando a radiação na frequência do ultrassom como fonte de energia na etapa da saponificação ou hidrólise alcalina.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter condições otimizadas para a extração de fitoesteróis presente em óleos vegetais através da metodologia de superfície de resposta tipo Box-Behnken, para as variáveis quantidade de amostra, tempo de ultrassom e volume de KOH/Metanol;
- Avaliar os modelos gerados no processo de otimização pela análise variância (ANOVA);
- Avaliar o novo método proposto a partir de figuras de mérito ou parâmetros de validação, como seletividade, linearidade, faixa linear dinâmica, precisão (*intra-day*), exatidão, limite de detecção e quantificação;
- Aplicar o método desenvolvido em amostra de azeite de oliva para quantificar os fitoesteróis, como  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 ÓLEOS E GORDURAS

Os lipídeos constituem um grupo de substâncias que são chamados de óleos e gorduras, reconhecidos como nutrientes essenciais na alimentação humana, pois são as principais fontes de armazenamento de energia e desempenham uma variedade de funções importantes na fisiologia humana, como na participação da constituição de diversos tecidos, principalmente os tecidos adiposo e nervoso, também atuam como isolantes térmicos na função de proteger os órgãos e a pele e são precursores na síntese de hormônios e lipoproteínas (REDA; CARNEIRO, 2007; OLIVEIRA, 2009; PERINI et al., 2010).

Óleos e gorduras são substâncias de origem animal ou vegetal. A diferença entre eles consiste no estado físico destes compostos à temperatura ambiente. Na forma sólida são chamados de gorduras e na forma líquida são óleos (FARIA et. al., 2002; OLIVEIRA, 2009). É designado o termo azeite exclusivamente para óleos oriundos de frutos, como por exemplo, o azeite de oliva e azeite de dendê (DOSSIÊ ÓLEOS, 2014). Dentre os tipos de azeites, o extravirgem de oliva é obtido a partir da prensagem a frio de azeitonas frescas, sendo o que possui maior reconhecimento pelos seus potenciais benefícios à saúde (FRANKEL, 2010).

Os óleos vegetais são as principais fontes de fitoesteróis. O conteúdo e a composição destes óleos podem variar significativamente, pois dependem de vários parâmetros como, a espécie vegetal, cultura, condições climáticas, sistema de extração e o processo de refino. A determinação de fitoesteróis é essencial para a avaliação analítica da qualidade e possível adulteração de óleos vegetais (MOREDA; PÉREZ-CAMINO, 2000; OLIVEIRA, 2009).

### 3.2 FITOESTERÓIS

Mais de 200 fitoesteróis são encontrados em plantas, segundo a literatura. No entanto, os mais abundantes na natureza são estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e campesterol (Figura 1) (LAGARDA; GARCÍA-LLTAS; FARRÉ, 2006; BRUFAU; CANELA; RAFECAS, 2008; DZIEDZIC et al., 2016).

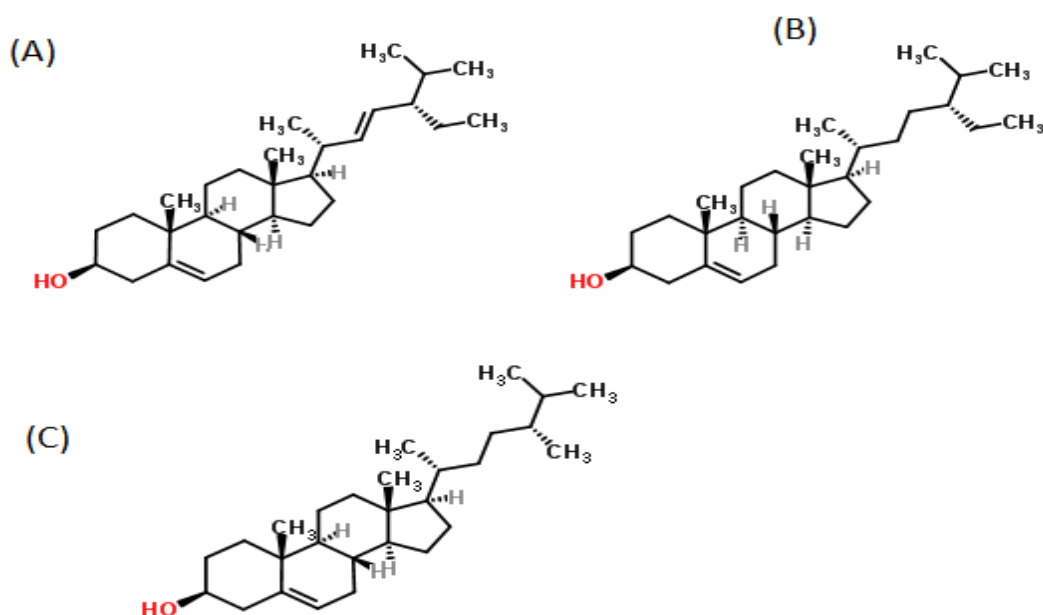


Figura 1 - Estrutura dos fitoesteróis: (a) Estigmasterol, (b)  $\beta$ -sitosterol e (c) Campesterol.  
Fonte: [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com).

Estudos têm retratado o interesse da utilização de fitoesteróis na prevenção de tumores (RUDKOWSKA, 2010; SAKAMOTO et al., 2010). Além disso, pode apresentar propriedades capazes de reduzir níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL), pela absorção no intestino delgado. Como também, propriedades anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngicas, anti-ulcerativas e antioxidantes (CUNHA; FERNANDES; OLIVEIRA, 2006; ROCCO; FANALI, 2009).

A análise de fitoesteróis pode ser utilizada para determinação do controle de qualidade e contaminação nos óleos vegetais (ROCCO; FANALI, 2009). Os métodos para determinação de fitoesteróis geralmente ocorrem pela extração da fração lipídica, seguida pela hidrólise alcalina, extração da fração insaponificável,

derivatização dos fitoesteróis, separação e quantificação cromatográfica (FENG et al., 2015). Entretanto, Fernandez-Cuesta (FERNANDEZ-CUESTA et al., 2012) desenvolveu um método com saponificação direta utilizando o ultrassom como fonte de energia para a determinação de fitoesteróis em óleos de sementes de canola e girassol. Esta etapa envolvia três pontos principais: hidrólise alcalina (saponificação), extração da matéria não-saponificável e a derivatização. Sendo que a principal vantagem consistiu em não realizar a etapa de extração da fração lipídica, o que facilitou a análise de um grande número de amostras.

A cromatografia em fase gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência são técnicas analíticas que vem sendo empregadas para identificação e quantificação de fitoesteróis em alimentos. A cromatografia em fase gasosa se destaca nas determinações de fitoesteróis nos alimentos, no entanto, apresenta algumas desvantagens, como: complexos procedimentos de preparação de amostras, temperatura de operação elevadas e técnicas de detecção destrutivas (LAGARDA; GARCÍA-LLATAS; FARRÉ, 2006; FENG et al., 2015). Em razão disto, a cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal e fase reversa, vem sendo utilizada para análise de classes de lipídios e esteróis individuais em várias matrizes (LAGARDA; GARCÍA-LLATAS; FARRÉ, 2006; SLAVIN; YU, 2012; GRÜN; BESSEAU, 2016).

### 3.3 CROMATOGRAFIA

Em 1906 o botânico russo Mikhael Semenovich Tswett denominou o termo cromatografia, após realizar dois trabalhos relacionados a separação de componentes de extrato de folhas. O nome cromatografia é derivado das palavras gregas *chrom* (cor) e *graphe* (escrever), apesar da cor apenas facilitar a identificação dos componentes separados (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A cromatografia é um método físico-químico de separação que faz o uso de uma fase estacionária e uma fase móvel. O transporte dos componentes de uma mistura ocorre pelo fluxo da fase móvel através da fase estacionária, e as separações pela diferença na velocidade de migração entre componentes da fase móvel (SKOOG et al., 2009).

Os métodos cromatográficos podem ser classificados devido a forma física do cromatógrafo, sendo chamados de cromatografia em coluna e cromatografia planar. Na cromatografia em coluna, a fase estacionária é mantida dentro de um tubo estreito e a fase móvel passa por esse tubo devido a pressão ou pela força da gravidade. Já a cromatografia planar, a fase estacionária encontra-se sob uma placa ou um papel e a fase móvel move-se pela ação da capilaridade ou influência da gravidade (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Em relação ao estado físico da fase móvel, a cromatografia em coluna é classificada em três grupos: a cromatografia em fase gasosa (onde a fase móvel é um gás), a cromatografia líquida (onde a fase móvel é um líquido) e a cromatografia supercrítica (onde a fase móvel é um vapor pressurizado) (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

### 3.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A CLAE se destaca com uma importante técnica de separação, por realizar separações e análises quantitativas de diversos compostos em diferentes tipos de amostras, com alta resolução, eficiência e detectabilidade, em um curto tempo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Nos últimos anos, a CLAE passou a ser uma das técnicas analíticas de separação mais utilizadas, devido à possibilidade de separação de compostos não voláteis e termicamente instáveis, como a sua aplicação a componentes de interesse industriais, para muitos campos da ciência e medicina (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Em um mesmo equipamento, pela troca da fase estacionária e da fase móvel é possível utilizar diferentes tipos de separação por CLAE. A cromatografia líquido-líquido (CLL) realiza a separação dos compostos pelo princípio de partição. Esta técnica baseia-se na diferença de solubilidade dos componentes da amostra na fase móvel e na fase estacionária. Assim os componentes mais solúveis da fase estacionária são seletivamente retidos por ela e os menos solúveis são transportados mais rapidamente pela fase móvel. A desvantagem dessa técnica é a solubilidade da fase estacionária na fase móvel, resultando na deterioração da coluna. Porém isso pode ser resolvido saturando a fase móvel com a fase



estacionária, com a utilização de uma pré-coluna, colocada antes do injetor, contendo uma alta porcentagem da fase estacionária, ou ainda, utilizar materiais contendo a fase estacionária quimicamente ligada a um suporte sólido (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

### 3.4 ULTRASSOM

Ultrassom são ondas sonoras que necessitam de um meio material para se propagar, o qual apresenta uma frequência que excede o limite da audição humana, cerca de 20 KHz (CÁRCEL et al., 2012). A produção do ultrassom se dá a partir de transdutores, feito de materiais piezoelétricos. Quando esses transdutores são submetidos a um campo elétrico sofrem deformações eletroelastomecânicas, resultando em frequência ultrassônicas (KRUG, 2008).

O efeito do ultrassom está relacionado ao fenômeno chamado cavitação. Este, origina-se quando a onda ultrassônica atravessa um meio líquido, ocasionando a alternância de ondas de compressão e rarefação, resultando na produção de bolhas de dimensões micrométricas no líquido irradiado, ou seja, essas bolhas oscilam entre os estados de compressão e rarefação até ocorrer a sua implosão (CHEMAT; HUMA-E; KHAN, 2011; CÁRCEL et al., 2012). A cavitação possui dependentes como a tensão superficial, temperatura e gases dissolvidos no meio líquido, a frequência e amplitude de onda acústica na qual se propaga (KRUG, 2008).

Na tecnologia de alimentos, a utilização da técnica do ultrassom traz vantagens por ser uma técnica rápida e precisa, apresentando melhorias da produtividade, rendimento, seletividade, como na redução de perigos e quantidade de solvente, sendo uma técnica ambientalmente correta (DOLATOWSKI; STADNIK; STASIAK, 2007; CHEMAT; HUMA-E; KHAN, 2011).

A aplicação de ultrassom em alimentos é dividida em alta e baixa energia, dependendo da sua frequência e intensidade. Ultrassons de baixa energia apresentam alta frequência (<100 KHz) e baixa intensidade (<1 Wcm<sup>-2</sup>) (PICÓ, 2014). Já ultrassons de alta energia são de baixas frequências (20-50 kHz) e

desenvolvem níveis de potência mais altos ( $>1\text{Wcm}^{-2}$ ) (PIYASENA; MOHAREB; MCKELLAR, 2003; JAYASOORIYA et al., 2007).

O ultrassom de alta energia é eficaz na extração de compostos provenientes de fontes vegetais (SHIRSATH; SONAWANE; GOGATE, 2012). A cavitação gera bolhas em baixas frequências, maiores que as formadas em altas frequências, implodindo com maior intensidade, com isso, há erosão, fragmentação, aumento da área superficial e transferência de massa, sendo conseqüentemente eficiente no processo de extração (ESCLAPEZ; GARCÍA-PÉREZ, 2011).

### 3.5 OTIMIZAÇÃO DE EXPERIMENTOS E PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

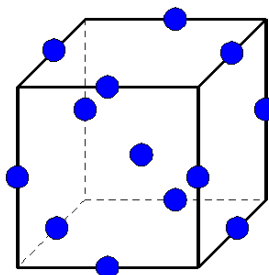
Em química analítica a otimização tem sido empregada para a realização de experiências, em busca de melhores resultados para desenvolvimento de um método analítico. Em um procedimento tradicional a influência de cada variável experimental é monitorada individualmente numa resposta experimental mantendo as demais constantes. Levando em conta as desvantagens que essa técnica apresenta, como: uma maior quantidade de experimentos a serem realizados e a não consideração de interações entre as variáveis durante o experimento, estão sendo utilizadas as técnicas de estatística multivariada na otimização de métodos analíticos (FERREIRA, 2015; BEZERRA et al., 2016).

A metodologia de superfície de resposta (do inglês, Response Surface Methodology, RSM), baseada em planejamentos fatoriais, foi introduzida por George Edward Pelham Box por volta dos anos cinquenta, vem sendo utilizada na modelagem de diversos processos industriais (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

A metodologia de superfície de resposta (RSM) é definida como um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas, utilizada para o desenvolvimento, melhoria e otimização de produtos e processos. Por conseqüência a resposta de interesse é influenciada por diversas variáveis. O principal objetivo é a realização de experimentos para atingir uma região ótima da superfície investigada.

O Planejamento fatorial tipo Box-Behnken consiste em uma ferramenta baseada em planejamentos fatoriais de no mínimo três níveis que apresentam boa eficiência relacionado ao número de experimentos necessários para a obtenção de

modelos. A distribuição espacial dos pontos experimentais pode ser representada, como na Figura 2, por um cubo, sendo que as coordenadas da matriz são estabelecidas pelos pontos médios dos três eixos e o ponto central (FERREIRA, 2015).



**Figura 2 – Box-Behnken design para três fatores.**

**Fonte: Autoria própria.**

Sua matriz de planejamento não inclui condições experimentais, onde os fatores são estabelecidos com nível superior ou com nível inferior e os pontos experimentais estão distribuídos de forma equidistantes do ponto central. Vem sendo aplicado experimentalmente para otimização de métodos cromatográficos. No entanto, sua aplicação em química analítica ainda é pequena em comparação a outros planejamentos fatoriais. Porém, este tipo de planejamento foi escolhido neste trabalho por avaliar o processo de otimização em três níveis dos fatores e por apresentar um número de ensaios reduzidos, mas com eficiência na sua aplicação (FERREIRA et al., 2007; BEZERRA et al., 2008).

### 3.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODO

Para assegurar que um novo método analítico forneça informações confiáveis e interpretáveis em relação a uma dada amostra, este é submetido a uma série de estudos experimentais denominado validação.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), “a validação de métodos deve garantir, através de estudos experimentais, que o

método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados”.

Na validação de métodos analíticos normalmente são utilizados os seguintes parâmetros: linearidade e faixa de aplicação, exatidão, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, seletividade e robustez. Além disso, esses termos também são conhecidos como parâmetros de desempenho analítico, características de desempenho e figuras analíticas de mérito (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

### 3.6.1 Linearidade e faixa de aplicação

A linearidade está relacionada à capacidade do método em fornecer resultados proporcionais à concentração da substância em análise, sob uma determinada faixa de aplicação. A relação matemática entre o sinal e a concentração ou massa da espécie de interesse pode ser determinada pela equação da reta  $y = ax + b$ , chamada de curva analítica. Esta deve ser definida com o mínimo de cinco pontos que não incluam o ponto zero na curva, devido aos possíveis erros associados. A curva analítica é constituída por uma variável independente relacionada às concentrações preparadas do padrão analítico da substância de interesse, e a dependente, ao sinal analítico obtido para cada concentração do padrão. Buscando corrigir desvios durante a análise é adicionado um padrão interno a cada solução do padrão analítico. E para eliminar possíveis interferentes de matriz é realizado o método de adição padrão, que consiste em adicionar quantidades crescentes do analito padrão na matriz original da amostra. Com a regressão linear, obtida através dos diferentes métodos de quantificação, pode-se estimar os coeficientes, linear e angular, **a** e **b** e o coeficiente de correlação, estimando a qualidade da curva obtida quando mais próximo de 1,0 for menor a dispersão de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2009).

A faixa de aplicação corresponde ao intervalo de massas ou concentrações do analito, no qual a linearidade, exatidão e precisão são aceitáveis.

É normalmente expressa nas mesmas unidades dos resultados obtidos pelo método (RIBANI et al., 2004; ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

### 3.6.2 Exatidão

Exatidão é o grau de concordância dos resultados individuais e um valor de referência (verdadeiro). Esse valor verdadeiro é obtido através de uma medição perfeita e indeterminado por natureza. Os métodos utilizados com frequência para avaliar a exatidão são: materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão (RIBANI et al., 2004).

Os materiais de referência certificados são materiais que possuem referência e certificação para uma dada substância, ou seja, para avaliação da exatidão os dados obtidos no laboratório devem ser comparados a essas referências (RIBANI et al., 2004).

Para a comparação de métodos os resultados obtidos pelo método em desenvolvimento e por um método de referência são avaliados pelo grau de proximidade entre os resultados fornecidos pelos dois métodos. As análises acontecem em replicata, avaliadas pelo valor de referência. Porém este método nem sempre é utilizado, pelo fato de não ter um valor determinado de referência para todos os tipos de análise (RIBANI et al., 2004).

O ensaio de recuperação é o método mais utilizado que expressa os resultados em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada a matriz (ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

Considerando que a eficiência do método varia em função da concentração da substância, a recuperação deve ser avaliada na faixa de concentração esperada para o composto de interesse. Ou seja, pela adição da substância em três diferentes concentrações: próxima: ao limite de quantificação, a concentração máxima permitida pelo método em teste e em uma concentração e a média da faixa de uso do método (RIBANI et al., 2004).

### 3.6.3 Precisão

A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto ( $\sigma$ ), quando se tem um número significativo de medições, maior que vinte. Se o número de determinações for pequeno então se calcula pela estimativa do desvio padrão absoluto ( $s$ ). Pode ainda ser expressa pelo intervalo de confiança da média ou através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também denominado como coeficiente de variação (CV). Na validação de métodos a precisão é definida em três níveis: a repetitividade; precisão intermediária; reprodutibilidade (RIBANI et al., 2004).

A repetitividade expressa a concordância entre os resultados de diversas medições de um método, executada nas mesmas condições de medição, portanto, mesmo procedimento, analista, instrumento, local e repetições em um tempo pequeno (RIBANI et al., 2004).

A precisão intermediária irá indicar as variações que ocorrem dentro do laboratório, como diferentes dias, analistas, equipamentos ou pela combinação desses fatores (RIBANI et al., 2004).

Por último a reprodutibilidade, que se refere ao grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, realizadas por condições variadas, pelo estudo de colaboradores entre diferentes laboratórios. Como a sua utilização na padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos por farmacopéias, procedimentos do CODEX e outros (RIBANI et al., 2004).

### 3.6.4 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a menor concentração do analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Existem três maneiras de se calcular o LD: pelo método visual, relação sinal-ruído e método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

No método visual, é adicionado à matriz concentrações conhecidas da substância de interesse, suficientes para que haja distinção entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração detectável. Já o método relação

sinal-ruído é aplicado somente em processos analíticos apresentam o ruído da linha base, e a determinação da relação sinal-ruído se dá pela comparação entre a medição dos sinais de amostras com baixas concentrações do composto de interesse na matriz e o branco. Com isso, tem-se uma concentração mínima no qual o composto pode ser detectado. E pelo método baseado em parâmetros da curva analítica o LD é calculado pela expressão:  $LD = 3,3S/b$ , onde  $s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta e  $b$  é o coeficiente angular da curva analítica. Então uma curva analítica deve ser construída para calcular estes dados (RIBANI et al., 2004; ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

### 3.6.5 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor concentração do analito que pode ser quantificado na amostra. Pode ser calculado também através do método visual, pela relação sinal/ruído ou método baseado em parâmetros da curva analítica, em relação ao último método citado, LQ é calculado através da equação:  $LQ = 10S/b$ , onde  $s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta e  $b$  é o coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004; ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

### 3.6.6 Seletividade

A seletividade se destaca como um método capaz de identificar o analito de interesse na presença de outras componentes, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Visto, que se a houver interferências na seletividade, a linearidade, a exatidão e a precisão serão comprometidas (RIBANI et al., 2004; ARAGÃO; VELOSO; ANDRADE, 2009).

Este método pode ser obtido de várias formas. Pode ser pela comparação da matriz isenta da substância de interesse e a matriz adicionada com esta

substância (padrão), sendo que o analito deve estar bem separado dos demais compostos presentes na amostra e nenhum interferente deve eluir no tempo de retenção. Outra maneira de determinar a seletividade é através da avaliação com detectores modernos (arranjo de diodos, espectrômetro de massas), pela comparação de um espectro do pico obtido na separação com o de um padrão, para indicação da presença de um analito. É utilizado o método de adição padrão, quando não se pode obter uma matriz isenta do analito de interesse, obtendo uma curva analítica com a adição do composto de interesse na amostra e comparada a uma curva analítica sem a presença da matriz, caso estas sejam paralelas é observado que não há interferência da matriz na determinação da substância de interesse e o método é designado seletivo. Por fim, outro processo para avaliar a seletividade é através de nova análise por outra técnica cromatográfica, ou através de métodos e técnicas específicos para a estrutura do composto de interesse, por exemplo, a espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho ou bioensaios específicos (RIBANI et al., 2004).

A seletividade na CLAE ocorre através da otimização das etapas de extração, separação e detecção de analitos, podendo variar na análise cromatográfica de acordo com o tipo de fase estacionária, composição da fase móvel, as condições físicas, a natureza dos compostos a serem analisados e o sistema de detecção utilizado (MALDANER; COLLINS; JARDIM, 2010).



## 4 METODOLOGIA

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Reagentes

Os padrões de  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol foram todos de grau de pureza analítica (Sigma-Aldrich). Metanol e acetonitrila, ambos grau HPLC, foram utilizados como fase móvel nas análises cromatográficas. Os solventes de extração o éter etílico e água ultra pura. O Azeite de oliva extravirgem usado no desenvolvimento do método analítico foi adquirido no mercado local.

### 4.2 PROCEDIMENTOS

#### 4.2.1 Preparação das amostras

A etapa de saponificação ocorreu em uma cuba de ultrassom como fonte de energia da marca Cristofoli, produzida dentro dos padrões da ISO 9001 - Sistema de Gestão de Qualidade, ISO 14001 - Gestão Ambiental, ISO 13485 - Aparelhos Médicos e Certificado de Boas Práticas de Fabricação. As Dimensões internas da cuba de inox (Comprimento x Largura x Profundidade) são: 26,4 cm x 16,4 cm x 8,0 cm. A frequência do equipamento é de 42 kHz e 160 watts de potência.

As etapas desenvolvidas na nova metodologia analítica encontram-se descritas na Figura 3.

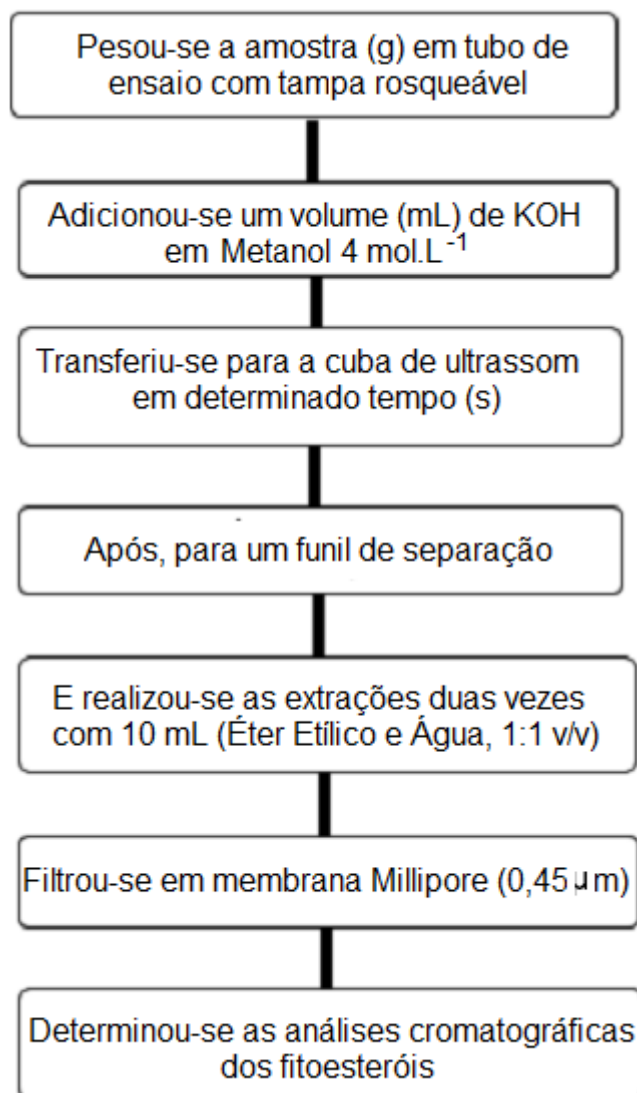


Figura 3 – Etapas realizadas no desenvolvimento do novo método analítico.

Fonte: Autoria própria.

#### 4.2.2 Estudo da otimização

A otimização para a obtenção de maiores concentrações do estigmasterol e o  $\beta$ -sitosterol em amostras de azeite, foi realizada através da análise da superfície de resposta tipo Box-Behnken (análise em três níveis das variáveis investigadas), que é gerado após o monitoramento de três variáveis: quantidade de amostra (g), volume de KOH (mL) adicionado e tempo (s) de exposição à radiação na frequência do ultrassom.

O planejamento Box-Behnken foi adotado para avaliar o efeito dos fatores que afetam a extração dos fitoesteróis e para minimizar o número de experimentos à serem executados. A Tabela 1 apresenta os experimentos realizados e seus respectivos níveis, com valores reais e codificados, para todas as variáveis investigadas.

**Tabela 1: Planejamento experimental tipo Box-Behnken com triplicata no ponto central para otimização da reação dos fitoesteróis.**

<b>Experimentos</b>	<b>Quantidade de amostra (g)</b>	<b>KOH adicionado (mL)</b>	<b>Tempo de ultrassom (s)</b>
1	0,25 (-1)	2,5 (-1)	600 (0)
2	0,75 (+1)	2,5 (-1)	600 (0)
3	0,25 (-1)	7,5 (+1)	600 (0)
4	0,75 (+1)	7,5 (+1)	600 (0)
5	0,25 (-1)	5,0 (0)	300 (-1)
6	0,75 (+1)	5,0 (0)	300 (-1)
7	0,25 (-1)	5,0 (0)	900 (+1)
8	0,75 (+1)	5,0 (0)	900 (+1)
9	0,50 (0)	2,5 (-1)	300 (-1)
10	0,50 (0)	7,5 (+1)	300 (-1)
11	0,50 (0)	2,5 (-1)	900 (+1)
12	0,50 (0)	7,5 (+1)	900 (+1)
13	0,50 (0)	5,0 (0)	600 (0)
14	0,50 (0)	5,0 (0)	600 (0)
15	0,50 (0)	5,0 (0)	600 (0)

#### 4.2.3 Análise cromatográfica dos fitoesteróis

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência equipado com bomba quaternária, detector UV (Perkin Elmer, modelo Flexar) no comprimento de onda de 205 nm e coluna de fase reversa C18 (Xterra MS da Waters), com dimensões de 250 mm de comprimento x 4,6 mm de diâmetro e tamanho da partícula de 5 µm. A eluição dos analitos ocorreu no modo isocrático com os solventes metanol e acetonitrila na proporção 80:20 (v/v), com vazão de 1,2 mL min<sup>-1</sup>, com tempo total de análise de 15 minutos e volume de injeção de 20 µL.

#### 4.2.4 Seletividade

Determinou-se este parâmetro pela avaliação da inclinação de curvas analíticas geradas através dos métodos de adição padrão e padronização interna, na faixa de concentração de 40 a 1060  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , monitorando-se no comprimento de onda de 205 nm. Os valores do “parâmetro b” foram comparados através do teste-*t* com 95% de confiança (CARERI; ELVIRI; MANGIA, 2001).

#### 4.2.5 Linearidade e faixa linear dinâmica

Os parâmetros foram avaliados a partir dos valores gerados pelo coeficiente de correlação de Pearson obtidos através da análise da curva de calibração (SRIGLEY; HAILE, 2015).

#### 4.2.6 Precisão e exatidão

Avaliou-se a precisão do método em três níveis de concentração em diferentes períodos do mesmo dia, *intra-day*, através do coeficiente de variação, para ambos os compostos. A exatidão da metodologia foi obtida pelo teste de adição de quantidade conhecida do analito e a recuperação deste, avaliado em três níveis de concentração (LOPES et al., 2011).

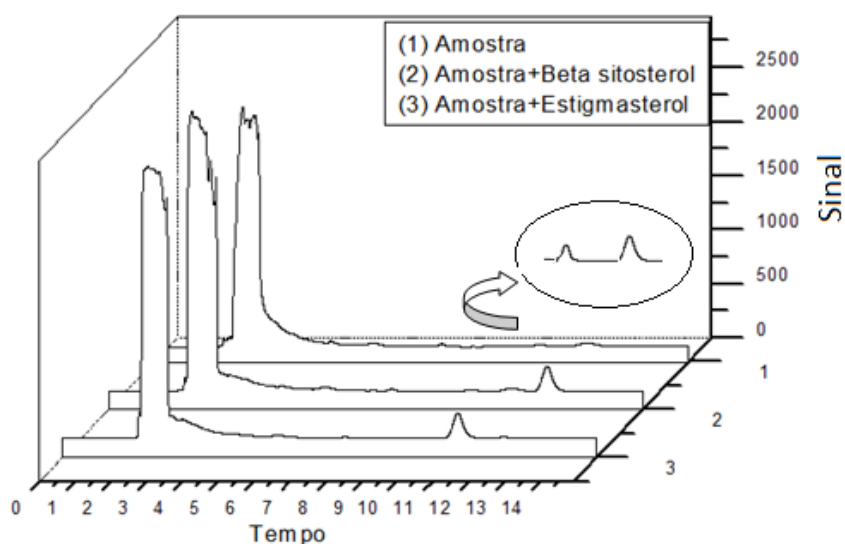
#### 4.2.7 Limite de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Avaliou-se os limites de detecção e quantificação a partir dos parâmetros da curva analítica, com o erro do intercepto da curva e a inclinação. Os cálculos para estes parâmetros ocorreram pela relação  $3,3 \times s/b$  e  $10 \times s/b$ , para LD e LQ, respectivamente, onde *s* corresponde a estimativa do desvio padrão do intercepto e *b* corresponde a inclinação da curva analítica (GONG et al., 2012).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Identificação do cromatograma

A Figura 4 expõe os três cromatogramas usados na identificação dos fitoesteróis, em amostra de azeite de oliva. Foi adicionado na amostra uma quantidade de solução padrão dos fitoesteróis, com objetivo de identificar os tempos de retenção de cada composto. Foi possível identificar o estigmasterol, composto menos retido na coluna, próximo de 10 minutos, e o  $\beta$ -sitosterol, com tempo de retenção aproximado de 12 minutos.



**Figura 4 - Cromatograma do azeite de oliva contendo adição dos padrões de fitoesteróis.**

**Fonte: Autoria própria.**

### 5.2 Otimização do experimento por superfície de resposta tipo Box-Behnken

Para o processo de otimização foi realizado treze ensaios, com triplicata no ponto central, perfazendo um total de 15 experimentos. Os resultados obtidos foram avaliados em porcentagem de área normalizada. Esta normalização ocorreu selecionando um pico da própria amostra, tendo-o como referência, e com isso,

quaisquer alterações que a amostra sofresse nos procedimentos experimentais seriam detectados pela modificação deste.

Após a análise em três níveis das variáveis investigadas, a Tabela 2 apresenta os resultados obtidos em porcentagem de área normalizada, para o estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol na amostra de azeite de oliva extravirgem.

**Tabela 2: Planejamento experimental tipo Box-Behnken com triplicata no ponto central para otimização da reação dos fitoesteróis determinados em % de área normalizada.**

Experimentos	Quantidade de amostra (g)	KOH adicionado (mL)	Tempo de ultrassom (s)	Estigmasterol (% normalizada)	$\beta$ -Sitosterol (% normalizada)
1	0,25	2,5	600	37,60	47,19
2	0,75	2,5	600	33,58	48,37
3	0,25	7,5	600	31,15	52,70
4	0,75	7,5	600	32,72	49,39
5	0,25	5,0	300	32,53	49,67
6	0,75	5,0	300	33,11	49,18
7	0,25	5,0	900	33,11	49,08
8	0,75	5,0	900	32,55	51,11
9	0,50	2,5	300	33,49	48,13
10	0,50	7,5	300	33,46	48,85
11	0,50	2,5	900	29,14	52,37
12	0,50	7,5	900	32,13	49,97
13	0,50	5,0	600	32,98	49,50
14	0,50	5,0	600	32,95	49,76
15	0,50	5,0	600	32,90	49,41

As concentrações dos compostos variaram de 29,14 a 37,60% para o estigmasterol e de 47,19 a 52,70 % para o  $\beta$ -sitosterol. Com base nesses dados, foi possível obter modelos matemáticos para a construção da superfície de resposta, através do programa Design-Expert® Software.

Os parâmetros usados para avaliar o modelo escolhido, estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3: Teste de ANOVA e validação do modelo para otimização da reação dos fitoesteróis determinados em % de área normalizada.**

Termos	Estigmasterol			B-Sitosterol		
	Soma dos quadrados	Valores de F	Valores de p	Soma dos quadrados	Valores de F	Valores de p
Modelo	41,39	1876,52	0,0005	30,23	73,58	0,0135
A- (Amostra, g)	-	-	-	-	-	-
B- (KOH, mL)	2,19	1190,33	0,0008	0,70	20,56	0,0453
C- (Tempo, seg)	8,06	4382,49	0,0002	7,19	210,09	0,0047
AB	7,83	4261,81	0,0002	5,02	146,73	0,0067
AC	0,33	177,93	0,0056	1,59	46,56	0,0208
BC	2,28	1239,50	0,0008	2,43	71,05	0,0138
A <sup>2</sup>	2,35	1277,48	0,0008	-	-	-
C <sup>2</sup>	3,06	1667,22	0,0006	0,36	10,37	0,0844
A <sup>2</sup> B	13,17	7166,49	0,0001	8,43	246,22	0,004
A <sup>2</sup> C	4,06	2207,57	0,0005	2,01	58,84	0,0166
AB <sup>2</sup>	0,76	413,18	0,0024	1,68	49,13	0,0198
Falta de ajuste	0,00	0,58	0,6347	1,03	7,51	0,1210
Erro Puro	0,00			0,07		
Total	41,39			30,30		
Valor predito	37,15			50,34		
Valor experimental	36,62 ± 1,27			52,54 ± 2,29		
Desvio em relação ao Predito (%)	-1,42			+4,37		

Valores de significância de 5%.

A partir dos modelos gerados, algumas variáveis não apresentaram valores significativos, e desta forma, foram removidas do planejamento para melhor ajuste de dados, o que contribui para diminuição de resíduos.

Através dos parâmetros escolhidos para avaliação do modelo gerado, optou-se pelo modelo cúbico, por apresentar valores de  $p$  inferiores a 0,05, considerados significativos (CHEN et al., 2015). Todos os modelos indicaram quantidades insignificantes de resíduos, valores menores que 3,63%, pela análise de variância, ANOVA, (Tabela 1), o que caracteriza um excelente modelo para explicação de dados.

As equações 1 e 2 mostram as variáveis significativas utilizadas para a construção da superfície de resposta.

$$\text{ESTIGMASTEROL (\%)} = + 32,96 + 0,74*B - 1,42*C + 1,40*A*B - 0,29*A*C + 0,75*B*C + 0,80*A^2 - 0,91*C^2 - 2,57*A^2*B + 1,42*A^2*C - 0,61*A*B^2$$

**Equação 1**

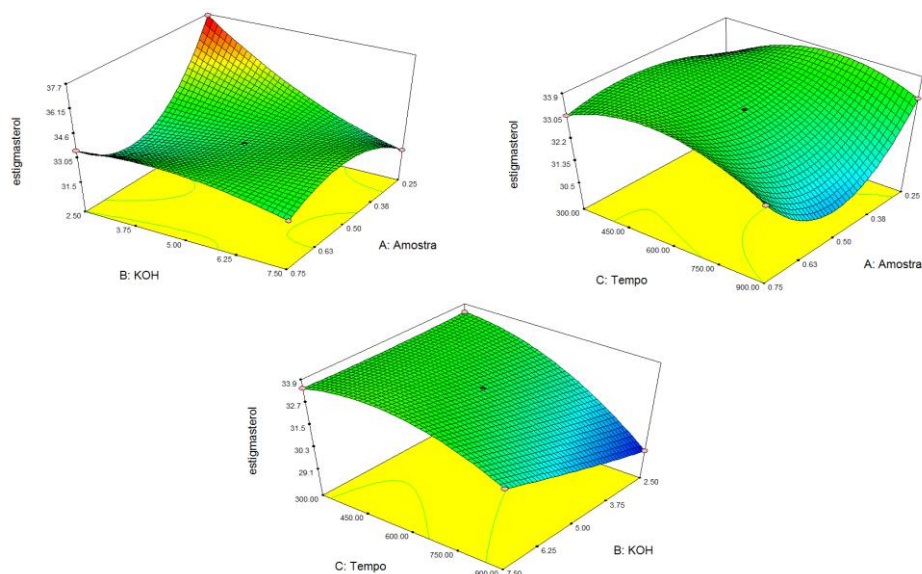
$$\text{B-SITOSTEROL (\%)} = + 49,65 - 0,42*B + 1,34*C - 1,12*A*B + 0,63*A*C - 0,78*B*C + 2,05*A^2*B - 1,00*A^2*C - 0,53*A*B^2$$

**Equação 2**

De acordo com os coeficientes expressos nas equações 1 e 2, nota-se que alguns termos foram mais expressivos para a construção do modelo. Os termos mais importantes para otimização do estigmasterol e do  $\beta$ -sitosterol foram: tempo de ultrassom (C), interação entre quantidade de amostra e volume de KOH (A\*B), quantidade de amostra elevado ao quadrado em relação ao volume de KOH (A<sup>2</sup>\*B) e ao tempo de ultrassom (A<sup>2</sup>\*C).

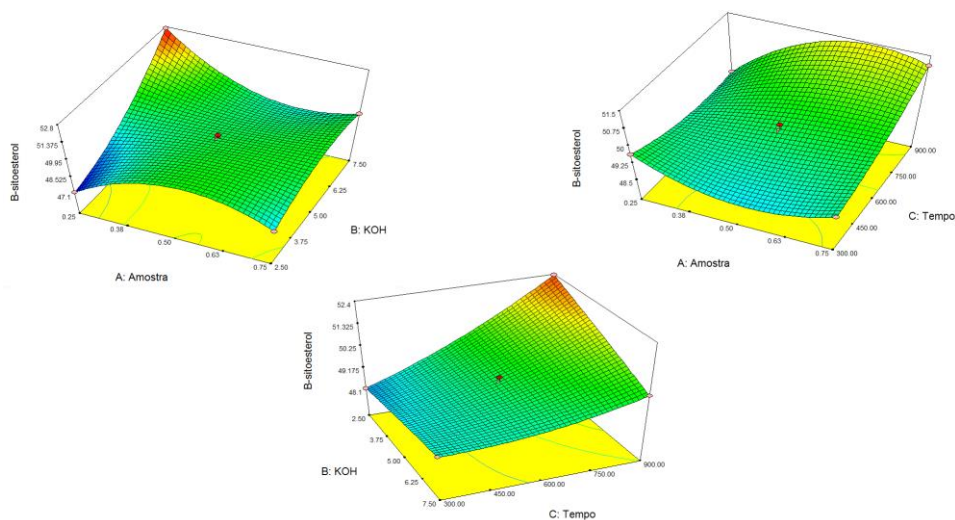
Com as equações geradas, pode-se construir as superfícies de respostas, avaliando juntamente as variáveis e os níveis de concentração. Como estas foram originadas por um modelo cúbico, obteve-se o perfil de onda. Avaliando as superfícies criadas para os dois compostos, como mostra a Figura 5 e 6, foi possível determinar as condições otimizadas.





**Figura 5 - Superfície de resposta para a otimização da concentração do estigmasterol presente na amostra de azeite de oliva.**

Fonte: Design-Expert® Software.



**Figura 6 - Superfície de resposta para a otimização da concentração do  $\beta$ -sitosterol presente na amostra de azeite de oliva.**

Fonte: Design-Expert® Software.

Com relação aos parâmetros desejáveis neste trabalho, menores valores de quantidade de amostra e volume de base empregada, como a minimização do tempo de ultrassom, os pontos ótimos foram obtidos para cada modelo, priorizando o maior rendimento dos compostos investigados. O ponto ótimo sugerido para o estigmasterol foi de 0,25 g de óleo, 2,5 mL de solução etanólica de KOH e 300 segundos para o tempo de ultrassom. Além disso, o  $\beta$ -sitosterol apresentou como

ponto ótimo a mesma quantidade de amostra e tempo de ultrassom encontrados para o estigmasterol, diferenciando apenas no volume adicionado de solução etanólica de KOH, valor este de 5,40 mL.

Os valores ótimos previstos pelos modelos também estão apresentados na Tabela 3, sendo 37,15% para o estigmasterol e 50,34% do  $\beta$ -sitosterol. Como o valor do desvio obtido para os valores experimentais e valores previstos pelos modelos foram menores que 5%, ressalta-se a significância dos modelos gerados, sendo estes de -1,42% para o estigmasterol e 4,37% para o  $\beta$ -sitosterol.

### 5.3 Validação da metodologia analítica

A validação busca verificar se a metodologia analítica desenvolvida, responde de maneira eficaz à concentração do analito investigado. No presente trabalho o termo validação foi utilizado para avaliação da metodologia desenvolvida pelos parâmetros: seletividade, linearidade, faixa linear dinâmica, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação.

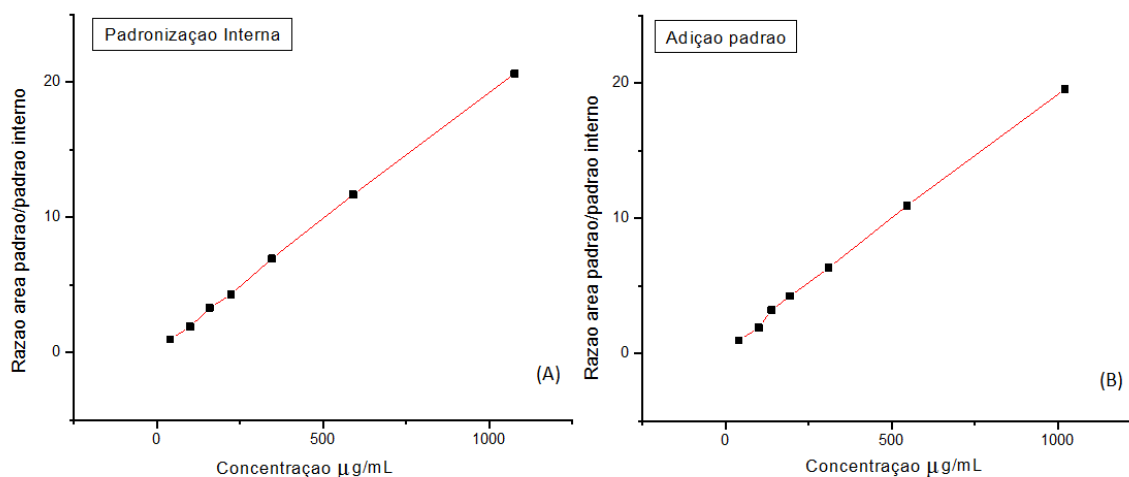
#### 5.3.1 Seletividade, linearidade e faixa linear dinâmica

Normalmente a seletividade é o primeiro parâmetro analítico a ser determinado, tendo em vista que uma determinação equivocada pode causar erros subsequentes a outros parâmetros, comprometendo a linearidade, exatidão e precisão. Desta forma, para que o método fosse seletivo aos analitos de interesses estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol, realizou-se uma comparação entre a inclinação de duas curvas analíticas, tipo  $y = a + bx$ , onde  $y$  é a razão entre as áreas do padrão e do padrão interno,  $a$  é o intercepto da curva,  $b$  é a inclinação da curva e  $x$  o valor da concentração.

Através da comparação entre a inclinação da curva, “parâmetro  $b$ ”, foi possível analisar a seletividade (Figura 7), esta obtida pelo método de padronização interna, isenta de analito e matriz, contendo apenas o padrão, 0,01926 ( $\pm 1,508 \times 10^{-4}$ )

<sup>4</sup>) e pelo método de adição padrão, contendo matriz, analito e padrão  $0,01922 (\pm 2,700 \times 10^{-4})$ , pelo teste-*t*, com confiança de 95%, para duas médias e variância independente.

Os dados obtidos pelo teste-*t* com confiança de 95%, determinavam que valores de  $p > 0,05$ , são característicos de hipótese nula, ou seja, os valores das inclinações não são diferentes, já se apresentassem valores inferiores ao  $p < 0,05$ , as inclinações apresentam diferença significativa entre si. Desta forma, a partir destas análises, observou-se que as inclinações não foram diferentes estatisticamente, uma vez que o valor encontrado foi superior a 0,05, sendo de 0,8367, para o  $\beta$ -sitosterol.

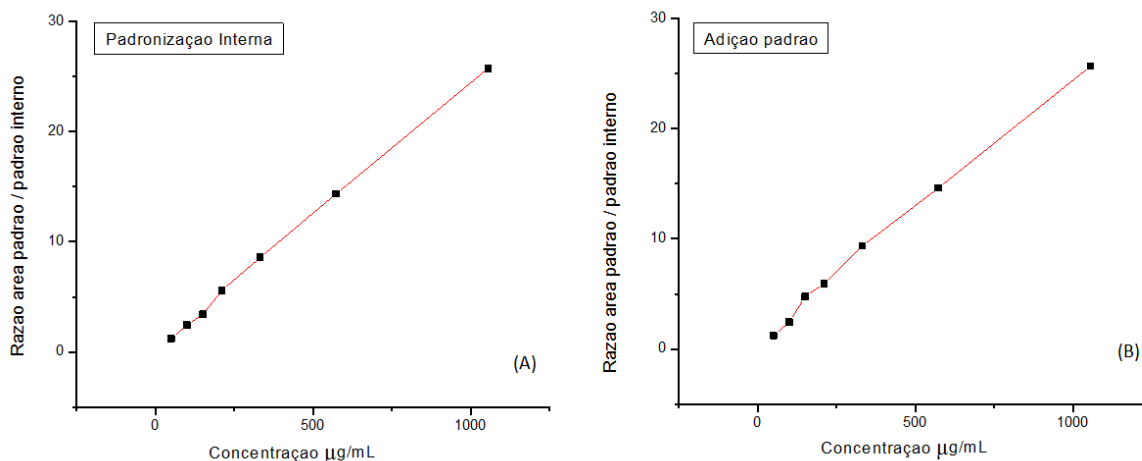


**Figura 7: Curvas analíticas obtidas através dos métodos de (A) padronização interna e (B) adição padrão, para o composto  $\beta$ -sitosterol.**

**Fonte: Autoria própria.**

Para o composto estigmasterol foi realizado o mesmo procedimento, sendo construídas duas curvas analíticas com e sem matriz (Figura 8), com intuito de verificar possíveis interferências. Os valores obtidos para o “parâmetro b” das curvas foi de  $0,02455 (\pm 2,455 \times 10^{-4})$  e  $0,02450 (\pm 5,509 \times 10^{-4})$  para os métodos de padronização interna e adição padrão, respectivamente. O resultado obtido após a aplicação do teste-*t* para a comparação entre as inclinações das curvas analíticas (ANDRADE et al., 2016), foi maior que 0,05 (0,8883) com 95% de confiança, comprovando que as inclinações não apresentaram diferença significativa. O procedimento adotado neste trabalho, de comparar as inclinações pelo teste-*t* e avaliar a interferência de matriz, foi utilizado também por (CARERI; ELVIRI;

MANGIA, 2001), analisando a composição  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol em óleo de soja.



**Figura 8: Curvas analíticas realizadas através dos métodos de padronização interna (A) e adição padrão (B) para o Estigmasterol.**

Fonte: Autoria própria.

A linearidade foi avaliada pelas curvas analíticas obtidas para o  $\beta$ -sitosterol (Figura 7A) e estigmasterol (Figura 8A), na faixa de 40 a 1060  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , através da padronização interna. Os valores obtidos foram próximos a unidade para o coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ), estes de 0,9995 e 0,9991, respectivamente, o que aponta pouca dispersão entre os pontos experimentais.

O modelo linear foi melhor ajustado com base nos dados gerados pela análise de ANOVA, para explicar o arranjo dos dados (Tabela 4).

**Tabela 4: Análise de variância para o ajuste de um modelo linear.**

$\beta$ -sitosterol					
	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	Valor f	Prob>F
Modelo	1	395,35	395,35	16312	$1,58 \times 10^{-14}$
Erro	8	0,19	0,02		
Total	9	395,54			
Estigmasterol					
Modelo	1	612,06	612,06	10027	$1,10 \times 10^{-13}$
Erro	8	0,49	0,06		
Total	9	612,54			

Realizando a comparação entre valores de  $f$  calculado e  $f$  experimental, obteve-se significância do modelo para os dois compostos. O valor de  $f_{exp}$  foi calculado pela razão entre a média quadrática do modelo e a média quadrática do erro deixado pelo modelo. Já o  $f_{tab}$ , pelo nível de significância desejado, contendo os graus de liberdade de cada valor. Assim, se o valor tabelado for menor que o experimental, conclui-se que o modelo é significativo.

O valor de  $f_{tab}$  para o  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol com os graus de liberdade 1 e 8 para a regressão e modelo, respectivamente, com 95% de confiança foi de 5,32. Quando é realizado a comparação entre os valores experimentais, nota-se a superioridade desses, de 16312 e 10027. Assim, é possível considerar a relação linear entre o sinal gerado pelo detector e a concentração dos analitos sob determinada faixa de aplicação, ou seja, a faixa de concentração investigada pelas curvas analíticas.

Além disso, os resíduos deixados pelo modelo não atingiram o valor de 0,1% do total explicado pela regressão, destacando a significância do modelo para os compostos analisados.

### 5.3.2 Precisão e exatidão

A Precisão foi avaliada em três níveis de concentração, em curto período de tempo, realizadas no mesmo dia, “*intra-day*”. Os resultados obtidos foram expressos com as respectivas estimativas dos desvios padrão, a partir destas, foi possível calcular o coeficiente de variação para os resultados, descritos na Tabela 5.

Tabela 5: Nível de precisão "intra-day" realizado em três níveis de concentração para o  $\beta$ -sitosterol e estigmasterol.

<b>Precisão</b>				
	<b><math>\beta</math>-sitosterol</b>		<b>Estigmasterol</b>	
	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	CV(%)	Concentração ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	CV(%)
1	159,66 $\pm$ 3,47	2,17	190,73 $\pm$ 8,69	4,56
2	344,56 $\pm$ 22,73	6,60	373,94 $\pm$ 8,22	2,20
3	1017,82 $\pm$ 16,16	1,59	981,64 $\pm$ 42,45	4,32
<b>Recuperação</b>				
<b>Inicial</b>	140,26		115,89	
<b>Adicionada</b>	200		174	
	346		300	
	748		648	
<b>Encontrada</b>	344,98		284,37	
	461,37		395,91	
	774,50		710,14	
<b>Recuperado (%)</b>	102,36		96,83	
	91,39		93,34	
	84,13		91,71	
<b>Média (%)</b>	92,63		93,96	

Valores são médias de três amostras, seguidas dos respectivos desvios padrão (DP). CV – coeficiente de variação.

Os resultados obtidos para o coeficiente de variação, em diferentes níveis de concentração para os compostos (Tabela 5), descrevem valores de 1,59 a 6,60% para o  $\beta$ -sitosterol e entre 2,20 a 4,56% para o estigmasterol. Segundo Ribani et al., (2014), valores com até 20% são aceitáveis, ou seja, desta forma, pode-se destacar que o método apresentou uma boa precisão.

Para determinar a exatidão, executou-se o teste de adição de quantidade conhecida do analito e a recuperação deste, em três níveis de concentração. O valor obtido caracterizou uma excelente exatidão, entre 84 a 102%, tendo em vista, como base, os valores das agências reguladoras, de 70-120%, que determinam como exato um método, nesta faixa de porcentagem (RIBANI et al., 2004).

### 5.3.3 Limite de detecção e quantificação

Com base nos parâmetros gerados pelas curvas analíticas por padronização interna, determinou-se os limites de detecção e quantificação através da relação  $3,3 \times s/b$  e  $10 \times s/b$ , para LD e LQ, respectivamente para os compostos, onde  $s$  corresponde a estimativa do desvio padrão do intercepto e  $b$  corresponde a inclinação da curva analítica (GONG et al., 2012). O limite de detecção calculado para o estigmasterol foi  $13,31 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o limite de quantificação foi  $40,35 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Para o  $\beta$ -sitosterol valores inferiores foram obtidos,  $10,70 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o limite de detecção e  $32,42 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o limite de quantificação.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos, verificou-se que a radiação na frequência do ultrassom forneceu energia suficiente para a reação da saponificação. E com a utilização da metodologia de superfície de resposta, tipo Box-Behnken, foi possível otimizar as condições experimentais para obtenção de maiores concentrações, sendo que o tempo utilizado para realizar essa reação de 3600 segundos, foi reduzido a 300 segundos, como quantidade de amostra para ambos e menor quantidade de base para o estigmasterol.

O método utilizado foi validado pelos parâmetros analíticos de avaliação como a seletividade, linearidade, faixa linear dinâmica, exatidão, precisão, limites de detecção e quantificação. Pela análise de valores fornecidos pelos parâmetros analíticos, foi possível determinar que a metodologia proposta atendeu os requisitos necessários para alcançar os objetivos propostos neste trabalho.



## REFERÊNCIAS

ACEVEDO, N. C.; FRANCHETTI, D. Analysis of co-crystallized free phytosterols with triacylglycerols as a functional food ingredient. **Food Research International**, v. 85, p. 104-112, 2016.

ANDRADE, J. K., KOMATSU, E., PERREAULT, H., TORRES, Y. R., ROSA, M. R., FELSNER, M. L. In house validation from direct determination of 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Brazilian corn and cane syrups samples by HPLC-UV. **Food Chemistry**, v. 190, p. 481-486, 2016.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Validação. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2002/475\\_02re.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/genericos/legis/resolucoes/2002/475_02re.htm)>. Acesso em: 15 abr. 2016.

ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965-977, 2008.

BEZERRA, M. A.; SANTOS, Q. O.; SANTOS, A. G.; NOVAES, C. G.; FERREIRA, S. L. C.; SOUZA, V. S. Simplex optimization: A tutorial approach and recent applications in analytical chemistry. **Microchemical Journal**, v. 124, p. 45-54, 2016.

BRUFAU, G.; CANELA, M. A.; RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**, v. 28, n. 4, p. 217-225, 2008.

CÁRCEL, J. A.; GARCÍA-PÉREZ, J. V.; BENEDITO, J.; MULET, A. Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 2, p. 200-207, 2012.

CARERI, M.; ELVIRI, L.; MANGIA, A. Liquid chromatography-UV determination and liquid chromatography – atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric characterization of sitosterol and stigmasterol in soybean oil. **Journal of Chromatography A**, v. 935, n. 1-2, p. 249-257, 2001.

CHEMAT, F.; HUMA-E, Z.; KHAN, M. K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 4, p. 813-835, 2011.

CHEN, C., SHAO, Y., TAO, Y. D., WEN, H. X. Optimization of dynamic microwave-assisted extraction of *Armillaria polysaccharides* using RSM, and their biological activity. **Lwt-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1263-1269, 2015.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia**. 3. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

CUNHA, S. S.; FERNANDES, J. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Quantification of free and esterified sterols in Portuguese olive oils by solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1128, p. 220-227, 2006.

DESIGN-EXPERT, Software. Version 7.0. Stat-Ease Inc., 2014.1 CD-ROM.

DOLATOWSKI, Z. J.; STADNIK, J.; STASIAK, D. Applications of ultrasound in food technology. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 6, n. 3, p. 89-99, 2007.

DOSSIÊ ÓLEOS. Óleos. **Food Ingredients Brasil**, n. 31, 2014.

DZIEDZIC, K.; SZWENGIEL, A.; GÓRECKA, D.; RUDZINSKA, M.; KORCZAK, J.; WALKOWIAK, J. The effect of processing on the phytosterol content in buckwheat groats and by-products. **Journal of Cereal Science**, v. 69, p. 25-31, 2016.

ESCLAPEZ, M. D.; GARCÍA-PÉREZ, J. V. Ultrassound-Assisted extraction of natural products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, p. 108-120, 2011.

FARIA, E. A.; LELES, M. I. G.; IONASHIRO, M.; ZUPPA, T. O.; FILHO ANTONIOSI, N. R. Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclética Química**, v. 27, p. 00-00, 2002.

FENG, S.; LIU, S.; LUO, Z.; TANG, K. Direct saponification preparation and analysis of free and conjugated phytosterols in sugarcane (*Saccharum officinarum*L.) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Food Chemistry**, v. 181, p. 9-14, 2015.

FERNANDEZ-CUESTA, A.; AGUIRRE-GONZALEZ, M. R.; RUIZ-MENDEZ, M. V.; VELASCO, L. Validation of a method for the analysis of phytosterols in sunflower seeds. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n. 3, p. 325-331, 2012.

FERREIRA, S. L. C.; BRUNS, R. E.; FERREIRA, H. S.; MATOS, G. D.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, G. C.; SILVA, E. G. P.; PORTUGAL, L. A.; REIS, P. S.; SOUZA, A. S.; SANTOS, W. N. L. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 178-186, 2007.

FERREIRA, S. L. C. **Introdução às técnicas de planejamento de experimentos**. 1. ed. Salvador: Vento Leste, 2015.

FRANKEL, E. N. Chemistry of Extra Virgin Olive Oil: Adulteration, Oxidative Stability, and Antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5991-6006, 2010.

GONG, Y.; HUANG, J.-a.; SHAO, Y.; LIU, Z.; PEN, J.; LI, J. Measurement of theanine using reverse-phase ion-pair liquid chromatography with photodiode array detection. **Food Chemistry**, v. 131, n. 1, p. 309-312, 2012.

GRÜN, C. H.; BESSEAU, S. Normal-phase liquid chromatography–atmospheric-pressure photoionization–mass spectrometry analysis of cholesterol and phytosterol oxidation products. **Journal of Chromatography A**, v. 1439, p. 74-81, 2016.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCHS, R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009.

JAYASOORIYA, S. D.; TORLEY, P. J.; D'ARCY, B. R.; BHANDARI, B. R. Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine *Semitendinosus* and *Longissimus* muscles. **Meat Science**, v. 75, n. 4, p. 628-639, 2007.

JÚNIOR, O. O. S., MONTANHER, P. F., BONAFE, E. G., PRADO, I. N., MARUYAMA, S. A., MATSUSHITA, M., VISENTAINER, J. V. A simple, fast and efficient method for transesterification of fatty acids in foods assisted by ultrasound energy. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 9, p. 1712-1719, 2014.

KATAN, M. B.; GRUNDY, S. M.; JONES, P.; LAW, M.; MIETTINEN, T.; PAOLETTI, R. Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 78, n. 8, p. 965-978, 2003.

KRUG, F. J. **Métodos de preparo de amostras**: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1. ed. Piracicaba-SP: Editado por Francisco José Krug, 2008.

LAGARDA, M. J.; GARCÍA-LLATAS, G.; FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 1486-1496, 2006.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna**. Campinas: Editora Átomo, 2009.

LOPES, G.; SOUSA, C.; BERNARDO, J.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P.; FERRERES, F.; MOUGA, T. Sterol profiles in 18 macroalgae of the portuguese coast. **Journal of Phycology**, v. 47, n. 5, p. 1210-1218, 2011.

MALDANER, L.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Fases estacionárias modernas para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1559-1568, 2010.

MOREDA, A. C. W.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, v. 881, n. 1-2, p. 131-148, 2000.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas: Editora da Unicamp, 2001.

OLIVEIRA, R. G. **Aplicação de parâmetros termo-ópticos para o monitoramento da degradação de óleos vegetais**. 2009. 154 f. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

PEREZ, M. A. F. Validação de métodos analíticos: Como fazer? Por que ela é importante? **Boletim de tecnologia e desenvolvimento de embalagens**, v. 22, n. 3, p. 1-9, 2010.

PERINI, J. A. L.; STEVANATO, F. B.; SARGI, S. C.; VISENTAINER, J. E. L.; DALALIO, M. M. O.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolism em mamíferos e resposta immune. **Revista Nutrição**, v. 23, n. 6, p. 1075-1086, 2010.

PICÓ, Y. **Análise química de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Elsevier, 2014.

PIYASENA, P.; MOHAREB, E.; MCKELLAR, R. C. Inactivation of microbes using ultrasound: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 87, n. 3, p. 207-216, 2003.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Revista Analytica**, n. 27, p. 60-67, 2007.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROCCO, A.; FANALI, S. Analysis of phytosterols in extra-virgin olive oil by nano-liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 43, p. 7173-7178, 2009.

RUDKOWSKA, I. Plant sterols and stanols for healthy ageing. **Maturitas**, v. 66, n. 2, p. 158-162, 2010.

SAKAMOTO, T.; HORIGUCHI, H.; OGUMA, E.; KAYAMA, F. Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, n. 9, p. 856-864, 2010.

SEARCH CHEMSPIDER. Disponível em: <<http://www.chemspider.com/>>. Acesso em: 12 abr. 2016.

SHIRSATH, S. R.; SONAWANE, S. H.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations—A review of current status. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 53, p. 10-23, 2012.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de química analítica**. São Paulo: Cengage Learning, 2009.

SLAVIN, M.; YU, L. A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2789-2795, 2012.

SRIGLEY, C. T.; HAILE, E. A. Quantification of plant sterols/stanols in foods and dietary supplements containing added phytosterols. **Journal of Food Composition and Analysis**, n. 40, p. 163-176, 2015.

SRIRAMAN, S.; RAMANUJAM, G. M.; RAMASAMY, M.; DUBEY, G. P. Identification of beta-sitosterol and stigmasterol in *Bambusa bambos* (L.) Voss leaf extract using HPLC and its estrogenic effect *in vitro*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 115, p. 55-61, 2015.

WILLEMS, J. I.; BLOMMAERT, M. A. E.; TRAUTWEIN, E. A. Results from a post-launch monitoring survey on consumer purchases of foods with added phytosterols in five European countries. **Food and Chemical Toxicology**, v. 62, p. 48-53, 2013.

ZARA, R. F., BONAFE, E. G., MARTIN, C. A., SOUZA, N. E. d., MUNIZ, E. C., VISENTAINER, J. V. Preparation of Fame by Microwave Irradiation Using Boron Trifluoride as a Catalyst. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 288-294, 2012.