

Artigo

Análise de Acilgliceróis em Amostras de Azeites de Oliva Comerciais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Aerossol Carregado (Corona DAC) e Métodos Quimiométricos

Bragueroli, H. S.; da Silva, T. R.; Simas, D. L. R.; da Silva, A. J. R.*

Rev. Virtual Quim., 2019, 11 (5), 1513-1520. Data de publicação na Web: 28 de outubro de 2019

<http://rvq.sbg.org.br>

Analysis of Acylglycerols in Samples of Commercial Olive Oils by High Performance Liquid Chromatography with Charged Aerosol Detector (Corona CAD) and Chemometric Methods

Abstract: Triacylglycerols (TAG) are triesters of fatty acids (FA) and glycerol, differing in the length of the FA chains, in the number, position and *cis/trans* configuration of the double bonds. TAGs are the main compounds in vegetable oils and represent an important part of the human diet because their nutritional value and beneficial health effects. Determination of the composition of TAGs in oils is important as adulteration may occur, especially with expensive oils such as olive oil. The use of HPLC with the charged aerosol detector (CAD) is attracting increased interest, due to its applicability in the determination of non-volatile analytes containing weak chromophores. Detectors like CAD and ELSD have been used for the direct determination of TAGs in oils without the need for hydrolysis, methylation and analysis by gas chromatography. In this report we demonstrate the utilization of HPLC/CAD in the determination of the composition of TAGs in commercial extra virgin olive oils. Multivariate analysis was used to point the differences in the TAG profiles induced by the addition of soybean oil to extra virgin olive oil. The method developed is of simple execution and presents advantages regarding the time of analysis, reproducibility and chromatographic resolution, in comparison to the methods based on the detection with refractive index detector for the determination of triacylglycerols in extra virgin olive oils. The application of chemometric methods (PCA and HCA) to the results of the oil analysis with addition of soybean oil evidenced the differences between the types of triacylglycerols present in these oils, in relation to those present in extra virgin olive oils.

Keywords: Vegetable oils; acylglycerols; HPLC/CAD; PCA; HCA.

Resumo

Os triacilgliceróis (TAG) são triésteres de ácidos graxos (AG) e glicerol, diferindo no comprimento das cadeias dos AG bem como no número, posição e configuração *cis/trans* das ligações duplas. TAGs são componentes majoritários de óleos vegetais e são componentes importantes da dieta humana por causa do seu valor nutricional e pelos seus benefícios à saúde humana. A determinação da composição de TAGs em óleos é importante, pois pode ocorrer adulteração, especialmente com óleos de custo elevado como o azeite de oliva. O uso da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com o detector de aerossol carregado (DAC) está atraindo um interesse crescente, devido à sua aplicabilidade na determinação de analitos não voláteis contendo cromóforos com absorvidade baixa ou inexistente. Detectores como DAC e ELSD (do inglês: *evaporative light scattering detector*) têm sido utilizados por permitir a determinação direta de TAGs em óleos sem a necessidade de hidrólise, metilação e análise por cromatografia em fase gasosa. No presente relato, demonstramos a utilização de CLAE/DAC na determinação da composição de TAGs em azeites de oliva extra virgens comerciais. A análise multivariada foi utilizada para apontar as diferenças nos perfis de TAG induzidos pela adição de óleo de soja ao azeite de oliva extra virgem. O método desenvolvido é de simples execução e apresenta vantagens quanto ao tempo de análise, reprodutibilidade e resolução cromatográfica, em comparação com os métodos baseados na detecção com detector de índice de refração para a determinação dos triacilgliceróis em azeites de oliva extra virgens. A aplicação de métodos quimiométricos (PCA e HCA) aos resultados das análises com adição de óleo de soja evidenciou as diferenças entre os tipos de triacilgliceróis presentes nestes óleos, em relação àqueles presentes nos azeites extra virgens.

Palavras-chave: Óleos vegetais; acilgliceróis; CLAE/DAC; PCA; HCA.

* Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Laboratório de Análise Fotoquímica, Avenida Carlos Chagas Filho 373, Edifício do Centro de Ciências da Saúde, Bloco H, Ilha do Fundão, CEP 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

ajorge@nppn.ufrj.br

DOI: [10.21577/1984-6835.20190105](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190105)

Análise de Acilgliceróis em Amostras de Azeites de Oliva Comerciais por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Aerossol Carregado (Corona DAC) e Métodos Quimiométricos

Hugo da Silva Bragueroli, Tairini Roberto da Silva, Daniel Luis Reis Simas, Antonio Jorge Ribeiro da Silva

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Laboratório de Análise Fotoquímica, Avenida Carlos Chagas Filho 373, Edifício do Centro de Ciências da Saúde, Bloco H, Ilha do Fundão, CEP 21941-902, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

* ajorge@nppn.ufrj.br

Recebido em 30 de setembro de 2019. Aceito para publicação em 30 de setembro de 2019

1. Introdução
2. Objetivo
3. Metodologia
 - 3.1. Amostras
 - 3.2. CLAE/DAC das amostras de azeites
 - 3.3. CLAE/EM das amostras de azeites
 - 3.4. Estatística multivariada dos resultados das análises
4. Resultados e Discussão
5. Conclusões

1. Introdução

De acordo com o International Olive Council (IOC, 2018), o azeite de oliva extra virgem (AOEV) deve ser obtido exclusivamente a partir de azeitonas, o fruto da oliveira, utilizando-se apenas meios mecânicos ou outros meios físicos, em condições sob as quais não haja alteração das propriedades do óleo.¹ O procedimento de obtenção do AOEV não deve incluir nenhum tratamento além de lavagem, decantação,

centrifugação e filtragem. Deste modo, ficam excluídos desta denominação óleos obtidos a partir da extração com solventes ou métodos de reesterificação além de azeites obtidos pela mistura com óleos de outras fontes. São dez as categorias definidas pelo IOC, que abrangem desde o AEOV e outros óleos de oliva produzidos segundo vários procedimentos.¹ Uma das propriedades do AOEV mais característica é sua acidez livre, expressa em teor de ácido oleico, que não deve ser superior a 0,8 gramas por 100 gramas (0,8 %). No entanto, segundo o IOC, as características de pureza e qualidade de AOEV

estão relacionadas a 30 especificações quanto à presença de constituintes químicos, cujo conteúdo permite determinar-se a diferença entre os azeites genuínos e adulterados em relação às suas designações, bem como propriedades químicas e organolépticas.²

Óleos vegetais como o AOEV são misturas complexas de lipídeos, entre os quais os triacilgliceróis (TAG) representam mais de 90 % do total. Outros componentes, presentes em menor proporção, são os mono e diacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídeos, tocoferóis e fitoesteróis. Os TAGs são triésteres de ácidos graxos (AG) e glicerol, diferindo no comprimento das cadeias dos AG bem como no número, posição e configuração *cis/trans* das ligações duplas. TAGs são, assim, componentes majoritários de óleos vegetais e componentes importantes da dieta humana por causa do seu valor nutricional e pelos seus efeitos sobre a saúde humana.³

Os dados analíticos obtidos com a determinação da natureza e os teores de TAGs em AOEV podem ser utilizados para a detecção de adulteração destes azeites com óleos vegetais de custo mais baixo. Os métodos oficiais para esta finalidade são baseados em separação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) mediante o uso de fase estacionária reversa, em condições isocráticas utilizando-se como fase móvel acetona/acetonitrila (1:1 v/v).² O detector utilizado nestas condições é o de índice de refração (IR).² A utilização de propionitrila como fase móvel tem sido recomendada em função da resolução cromatográfica obtida na região de TAGs com ECN42.² Na análise por cromatografia líquida de alta eficiência de substâncias que não possuem cromóforos ou quando os cromóforos presentes tem baixa absorvidade, como no caso de lipídeos como os TAGs, detectores de índice de refração (IR), de massas, de dispersão de luz (*ELSD*) e, mais recentemente, detectores baseados em aerossóis carregados (*DAC*) tem sido utilizados como alternativa a detectores de absorção no UV.⁴ O detector por espectrometria de massas é considerado específico e universal, e seu uso

possibilita a identificação e quantificação mesmo em situações de resolução cromatográfica parcial. Porém sua resposta depende do processo de ionização empregado e o alto custo do equipamento é um fator limitante para o seu uso em análises de rotina. Já os detectores por *ELSD* apresentam limitações significativas em termos precisão, sensibilidade, faixa dinâmica e natureza das curvas de calibração. Por esta razão, métodos recentes baseados no uso de detectores de aerossol carregados têm sido introduzidos como alternativa para sistemas de detecção de CLAE para analitos que não possuem cromóforos ou os tem, embora fracamente absorvíveis no UV. Segundo Vehovec e Obreza,⁵ as principais características positivas dos detectores de aerossol carregado são: detecção universal de analitos não voláteis, resposta menos dependente da estrutura química do que outros detectores, ampla faixa de resposta dinâmica com alta sensibilidade e operação simples e confiável. A cromatografia em fase gasosa (CG) pode ser utilizada após hidrólise dos TAG e metilação dos ácidos livres assim obtidos. A composição de TAG presentes pode ser determinada a partir das concentrações dos ácidos graxos com base na distribuição natural dos ácidos graxos esterificados em um triacilglicerol.⁷ Alternativamente, a cromatografia em fase gasosa de alta resolução em altas temperaturas (HTGC) pode ser utilizada na determinação direta dos TAG. Neste caso, são necessárias altas temperaturas, o que implica na escolha de fases estacionárias de alta estabilidade térmica. Adicionalmente, o uso de injeções “on column” é indicado resultando em alargamento de sinais e perda de resolução cromatográfica.²

As vantagens e desvantagens da associação de abordagens experimentais de quimiometria acopladas a técnicas analíticas como espectroscopia no UV/Vis, fluorescência, espectroscopia vibracional, espectroscopia de RMN e técnicas de separação como cromatografia aplicada à análise de AOEV foram revisadas, sendo que atualmente a quimiometria destaca-se como

uma ferramenta poderosa para a análise de óleos.⁶

2. Objetivo

Este trabalho teve como objetivo desenvolver metodologia para análise da composição de TAGs em azeites de oliva extra virgens comerciais usando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de aerossol carregado. Objetiva também a aplicação de métodos de análise multivariada para comparar os perfis cromatográficos obtidos com azeites de diferentes origens e composições visando a detecção da adição de outros óleos aos azeites.

3. Metodologia

3.1. Amostras

As amostras de azeite de oliva foram adquiridas em estabelecimentos comerciais na cidade do Rio de Janeiro. Foram tomadas 4 amostras, sendo 2 de origem portuguesa e 2 de origem chilena. Foram também adquiridas: uma amostra de óleo composto de soja (óleo de soja + 15 % de azeite de oliva segundo o rótulo) e uma amostra de óleo de soja, ambas de fabricação nacional.

3.2. CLAE/DAC das amostras de azeites

Os solventes utilizados nestas análises foram grau CLAE. As amostras foram diluídas em fase móvel a uma concentração de 1 mg/mL e analisadas por CLAE, utilizando uma coluna de RP18 (125 x 2 mm x 3 µm). Temperatura da coluna: 40 °C. Fase móvel: A - Acetona: Isopropanol (70:30), B - Acetonitrila. Condição de análise: Gradiente, 0-1,5 min: 65 %B, 10 min: 60 %B, 20 min: 50 % B, 30 min: 65 % B, 35 min: 65 %B. A vazão de fase móvel foi

de 0,5 mL/min e o volume de injeção de 20 µL. O detector Corona-DAC foi ajustado para uma corrente de 100 pA, sem filtro, nebulizador a 25 °C e gás *via* gerador de nitrogênio a 35 psi. A saída do sinal do detector foi conectada a um controlador de sistema Shimadzu CBM 20A e processada usando o software Shimadzu Lab Solution. As injeções foram feitas em triplicata.

3.3. CLAE/EM das amostras de azeites

As análises por CLAE/ESIMS foram feitas usando uma coluna "core shell" de RP18 (50 x 2,7 mm, 3,5 µm), em condição isocrática usando-se metanol dopado com acetato de sódio 50 mmolar a uma vazão de 0,3 mL/min. A detecção foi feita com um espectrômetro de massas Bruker MicrOTOF cujos parâmetros de operação foram configurados para o modo de íons positivos. Os espectros foram adquiridos em uma faixa de massas de 50-1000 m/z a uma resolução de 20.000. Os outros parâmetros foram: voltagem no capilar, 4500 V; temperatura do gás de secagem: 190 ° C; vazão do gás: 9,0 L/min.

3.4. Estatística multivariada dos resultados das análises

Os dados brutos obtidos nas análises foram exportados mediante o uso do software (Lab Solution) no formato.txt. Apenas os dados entre os tempos de retenção entre 0 e 20 minutos foram utilizados. Os dados da tabela obtida foram suavizados (função *smooth*) pelo uso do *Gaussian Filter* (21 segmentos). Em seguida os dados tiveram suas linhas de base corrigidas e foram alinhados através do algoritmo COW (*Correlation Optimized Warping*). Por fim, os dados foram normalizados pela área. A Análise de Componentes Principais (*Principal Components Analysis* - PCA) foi realizada com 4 Componentes Principais (*Principal Components* - PC), peso 1 para todas as variáveis e amostras, validação cruzada com

uma amostra por segmento e sem rotação. A análise de Agrupamentos Hierárquicos (*Hierarchical Cluster Analysis* -HCA) foi realizada pelo método de Ward usando a distância euclidiana ao quadrado. O programa Unscrambler® X 10.2 (Camo, Noruega) foi utilizado para a realização das análises multivariadas e o programa Microsoft Excel foi utilizado para a geração dos gráficos.

4. Resultados e Discussão

A cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de aerossol carregado (DAC) oferece várias vantagens para a análise de triacilgliceróis de azeites em relação aos resultados obtidos por CLAE com outros detectores (IR, ELSD) tais como: (1) resposta uniforme aos analitos não voláteis independentemente da sua natureza; (2) consistência nos fatores de resposta e reprodutibilidade; (3) permite o uso de gradiente para melhor separação dos TAGs.

A Figura 1 reproduz cromatogramas obtidos na análise dos óleos de soja, composto e azeites de oliva. A superposição dos perfis cromatográficos permite clara distinção visual das diferenças de composição entre as amostras analisadas. No cromatograma do azeite de oliva estão assinaladas as regiões correspondentes aos ECN 42, 44, 46, 48 e 50. ECN (do inglês *Equivalent Carbon Number*) é definido como o número total de átomos de carbono (CN) em todas as cadeias acílicas menos duas vezes o número de ligações duplas ($ECN = CN - 2DB$). Os perfis cromatográficos da Figura 1 mostram o agrupamento dos TAGs segundo o seu valor de ECN (por exemplo: no grupo de $ECN = 48$ temos os TAGs OOO, SLO+POO e POL, sendo OOO: trioleína; SLO: glicerol acilado pelos ácidos esteárico (S), linolêico (L) e olêico; POO: glicerol acilado pelos ácidos palmítico e olêico e POL: glicerol acilado pelos ácidos palmítico, olêico e linolêico, por exemplo).⁷ Observar as diferenças de composição no grupo ECN42, importantes para avaliar a presença de adulteração em AOEV.⁷

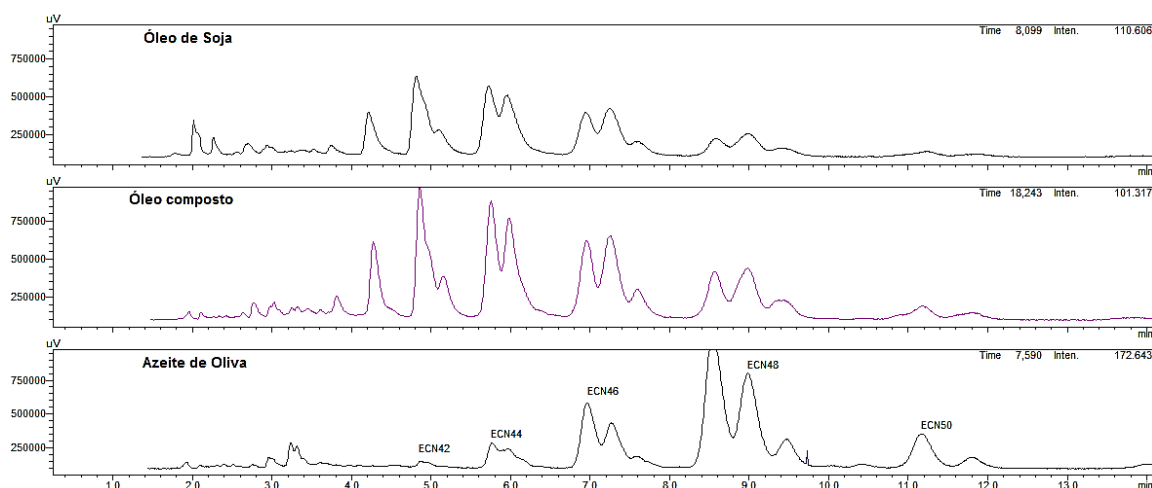


Figura 1. Cromatogramas dos óleos analisados. Fase estacionária: RP18 (125 x 2 mm x 3 µm). Fase móvel e demais condições: ver parte experimental. ECN = *Equivalent Carbon Number* (ver texto)

Os picos dos TAGs foram identificados usando tempos de retenção e pelas massas obtidas ($M+23$) utilizando-se espectrometria de massas com ionização por electrospray no modo positivo.⁸

A Análise de Aglomeração (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*) tem com o objetivo encontrar e separar objetos em grupos similares. O critério de variância mínima de Ward foi utilizado com o intuito de

reunir objetos que proporcionem o menor aumento da variância intragrupo. A Figura 2 apresenta o dendrograma obtido através da análise de HCA aplicada sobre a matriz correspondente aos dados editados das amostras analisadas através de CLAE-DAC. É possível observar uma clara separação entre dois grupos. O primeiro grupo corresponde ao óleo de soja e às amostras do óleo composto. Por outro lado, o segundo grupo classificado por esta análise é corresponde a um conjunto

maior contendo quatro fabricantes diferentes de azeite extra virgem. A separação, neste caso, pode ser considerada evidente devido ao baixo valor de linha de corte.

Em relação à variação intragrupo do conjunto de 4 marcas distintas (duas marcas de origem portuguesa e duas outras chilenas) não foi possível distinguir entre os diferentes locais de produção/envasamento dos azeites.

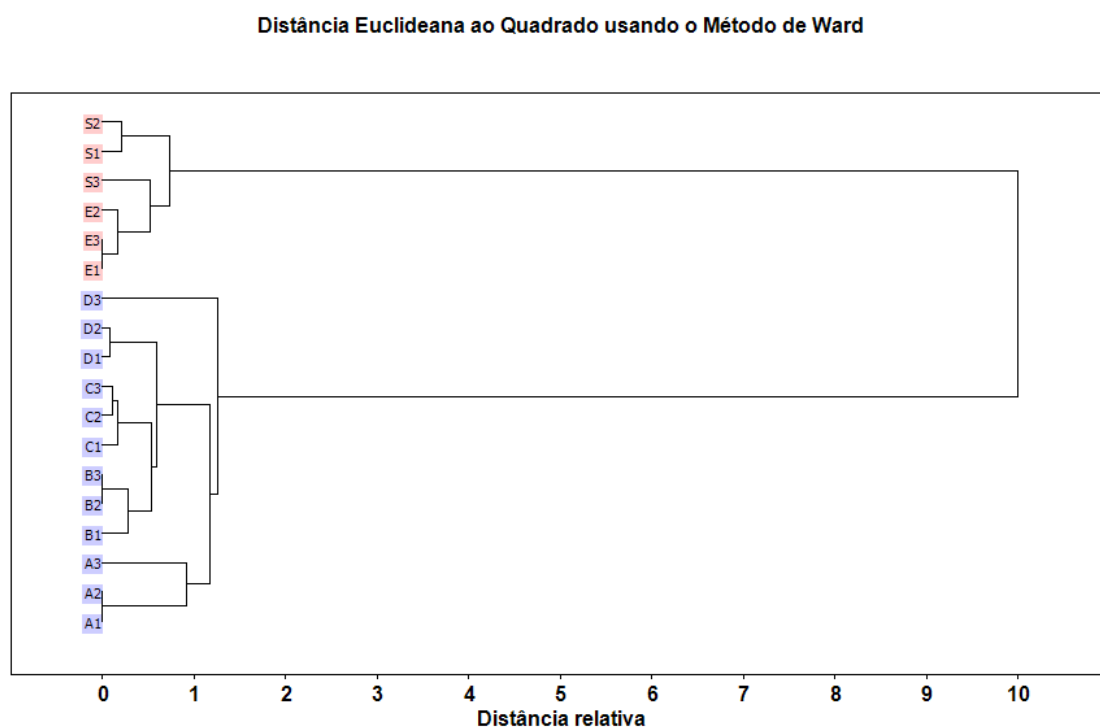


Figura 2. Dendrograma obtido por HCA resultante da análise dos dados dos cromatogramas das amostras de óleo de soja, óleo composto e azeites extra virgens. Amostras A e B: azeites extra virgens de produção em Portugal; Amostras C e D: azeites extra virgens de produção no Chile; Amostra E: óleo composto e amostra S: óleo de soja. Método de variância Ward

Seguindo com as análises exploratórias dos dados, foi aplicada também a análise de componentes principais (PCA) sobre a matriz correspondente aos dados editados das amostras analisadas através de CLAE-DAC. O gráfico de *scores* é mostrado na Figura 3 e o gráfico de *loadings* (pesos ou carregamentos) é mostrado na Figura 4. A PCA aplicada explicou 99,19 % da variância total dos dados, dos quais 97,33 % foram explicados pela PC-1, 95,68 % pela PC-2, 1,64 %. A PC-1 separou o

conjunto de quinze amostras em dois grupos distintos (elipses azul e rosa na Figura 3). No quadrante positivo foram agrupadas as amostras relacionadas ao conjunto contendo quatro fabricantes diferentes de azeite extra virgem de origens portuguesa e chilena, enquanto que no quadrante negativo foram posicionadas as amostras de óleo de soja e de óleo de soja contendo 15 % de azeite de oliva (declarado pelo fabricante). Através dos valores de porcentagem da variância

explicada pode-se inferir que a PC-1 é a variável de relevância na explicação dos dados.

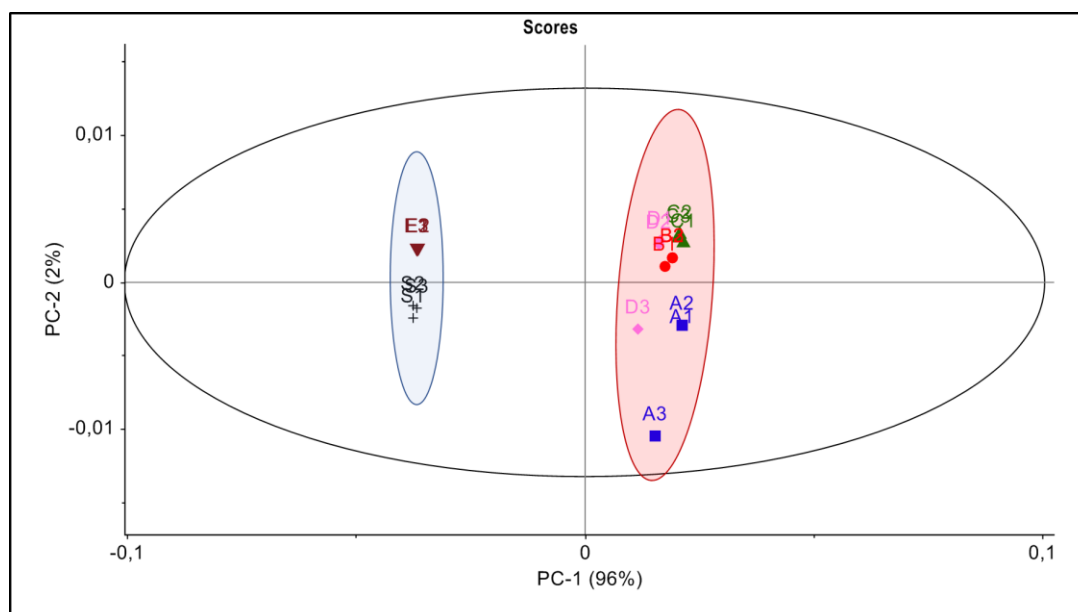


Figura 3. Gráfico de *scores* da PCA sobre os cromatogramas das amostras de azeites extra virgem, óleo composto e óleo de soja. Amostras A e B: azeites extra virgens de produção em Portugal; Amostras C e D: azeites extra virgens de produção no Chile; Amostra E: óleo composto e amostra S: óleo de soja

A projeção da parcela da variância total que é explicada pela PC-1 é dada na Figura 4. As substâncias com tempos de retenção de 8,9; 9,5 e 6,9 minutos foram relacionadas com as amostras agrupadas no quadrante positivo.

Já as substâncias com tempos de retenção de 3,4; 4,3 e 4,6 minutos foram as mais relacionadas com as amostras agrupadas no quadrante negativo da PC-1. Ao observar os resultados da PC-2 não é possível perceber uma clara separação entre grupos dos azeites de oliva portugueses e chilenos.

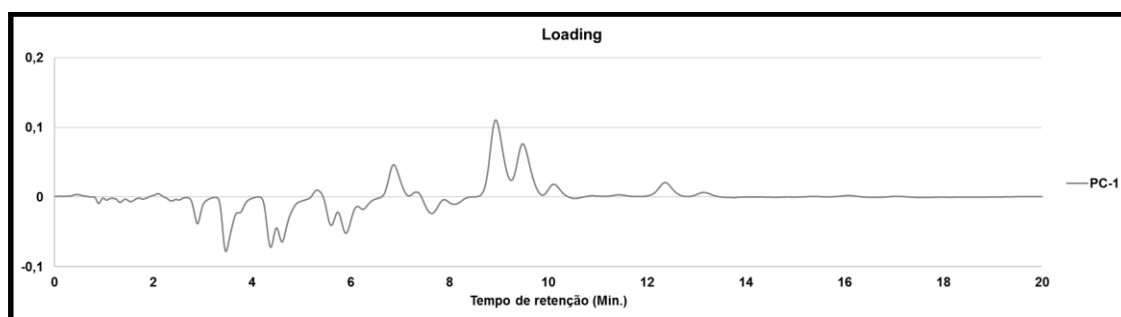


Figura 4: gráfico de *loadings* (pesos ou carregamentos)

Assim como ocorreu na análise de HCA, não foi possível se distinguir entre os

diferentes locais de produção e envasamento dos azeites extra virgens.

5. Conclusões

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa com detector de aerossol carregado (CLAE-DAC) foi utilizada no presente trabalho para a avaliação do perfil de composição dos triacilgliceróis presentes em amostras de azeites de oliva extra virgens de origem portuguesa e chilena, comercializados no mercado nacional. Em combinação com análise multivariada (PCA, Análise de Componentes Principais e Análise de Aglomeração, HCA), foi também utilizada para destacar a presença de óleos de outra origem na composição das amostras. O método desenvolvido é de simples execução e apresenta vantagens quanto ao tempo de análise, reprodutibilidade e resolução cromatográfica, em comparação com os métodos baseados na detecção com detector de índice de refração para a determinação dos triacilgliceróis em azeites de oliva extra virgens. A aplicação de métodos quimiométricos (PCA e HCA) aos resultados das análises de azeites com adição de óleo de soja evidenciou as diferenças entre os tipos de triacilgliceróis presentes nestes óleos, em relação àqueles presentes nos azeites extra virgens.

Referências Bibliográficas

- ¹ *International Olive Council* (IOC). Designations and definitions of olive oils. [[Link](#)]
- ² Aparicio, R.; Morales, M. T.; Aparicio-Ruiz, R.; Tena, N.; Garcia-Gonzales, D. L. Authenticity of olive oil: Mapping and comparing official methods and Promising alternatives. *Food Research International* **2013**, *54*, 2025. [[CrossRef](#)]
- ³ Gunstone, F. D.; *The Chemistry of Oils and Fats*, Blackwell Publishing Ltd: Oxford, 2004.
- ⁴ Luccia, P.; Moreta, S.; Buchinia, F.; Fertlatb, G.; Conte, L. Improved analysis of olive oils triacylglycerols by UHPLC-charged aerosol detection. *Journal of Food Composition and Analysis* **2018**, *66*, 230. [[CrossRef](#)]
- ⁵ Vehovec, T.; Obreza, A. Review of operating principle and applications of the charged aerosol detector. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217*, 1549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶ Gomez-Caravaca, A. M.; Maggio, R. M.; Cerretani, L. Chemometric applications to assess quality and critical parameters of virgin and extra-virgin olive oil. A review. *Analytica Chimica Acta* **2016**, *913*, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷ Aued-Pimentel, S.; Takemoto, E.; Kumagai, E. E.; Cano, C. B. Determinação da Diferença Entre o Valor Real e o Teórico do Triglicerídeo ECN 42 para a Detecção de Adulteração em Azeites de Oliva Comercializados no Brasil. *Química Nova* **2008**, *31*, 31. [[CrossRef](#)]
- ⁸ Degano, I.; La Nasa, J.; Ghelardi, E.; Modugno, F.; Colombini, M. P. Core shell stationary phases for a novel separation of triglycerides in plant oils by high performance liquid chromatography with electrospray-quadrupole-time of flight mass spectrometer. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1308*, 114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]