

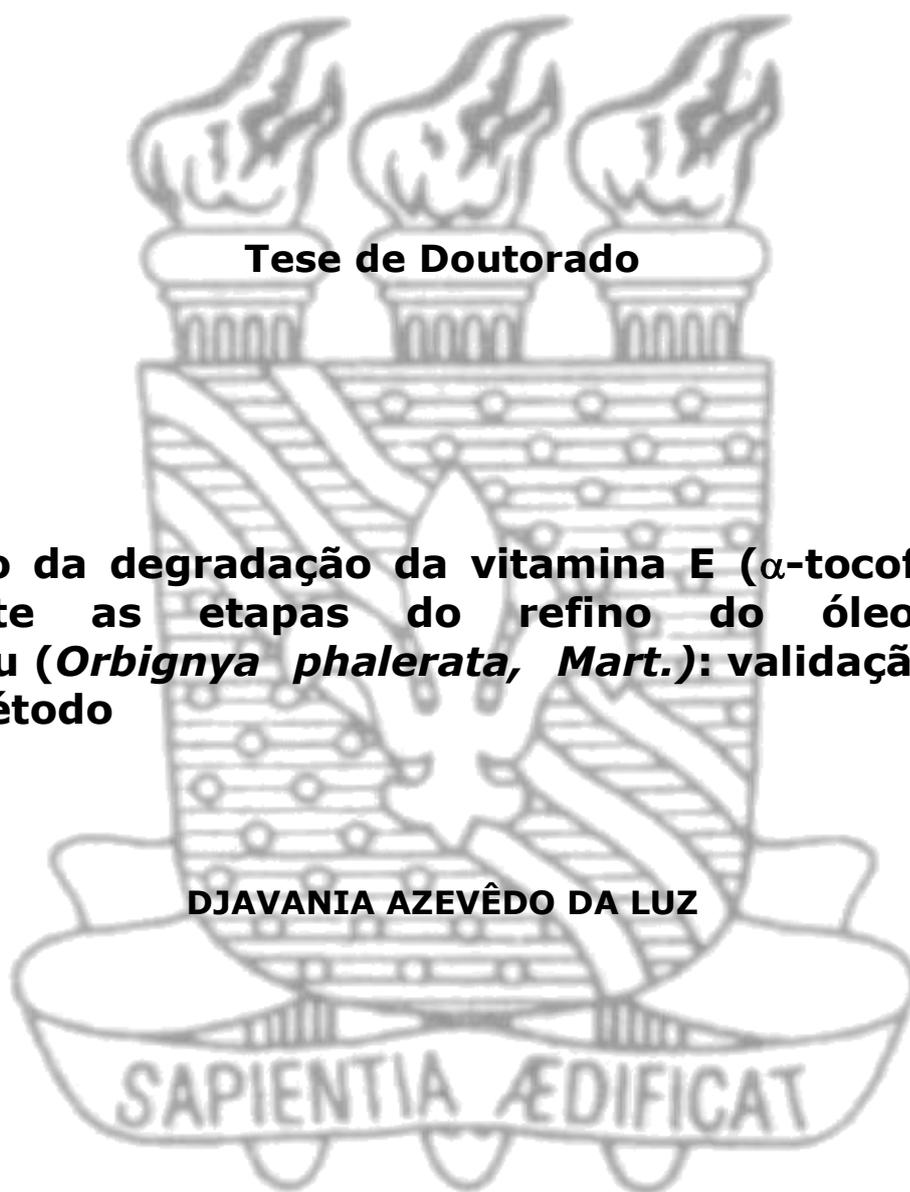


**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Tese de Doutorado**

**Estudo da degradação da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) durante as etapas do refino do óleo de babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart.): validação de um método**

**DJAVANIA AZEVÊDO DA LUZ**



**João Pessoa - PB - Brasil**

**2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Tese de Doutorado**

**Estudo da degradação da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) durante as etapas do refino do óleo de babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart.): validação de um método**

**Djavania Azevêdo da Luz**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Doutor em Química.

**Orientadores: Prof. Dr. Fernando Carvalho Silva**  
**Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza**

**João Pessoa - PB - Brasil**

**2011**

L979e Luz, Djavania Azevedo da.  
*Estudo da degradação da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) durante as etapas do refino do óleo de babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart.): validação de um método / Djavania Azevedo da Luz. - João Pessoa, 2011.  
94f. : il.  
Orientadores: Fernando Carvalho Silva e Antonio Gouveia de Souza  
Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN  
1. Química. 2. Óleos vegetais. 3. Babaçu. 4.  $\alpha$ -tocoferol.  
5. Óleo de babaçu – refino. 6. CLAE. 7. FTIR.*

UFPB/BC

CDU: 54(043)

**Estudo da Degradação da Vitamina E (a-tocoferol)  
Durante as Etapas do Refino do Óleo de Babaçú  
(Orbignya phalerata, Mart.): Validação de um Método.**

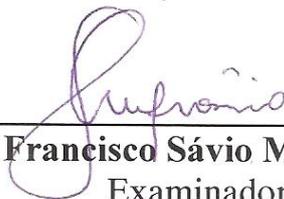
Aprovada pela banca examinadora:



**Prof. Dr. Fernando Carvalho Silva**  
Orientador/Presidente



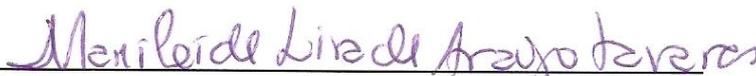
**Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza**  
2º. Orientador



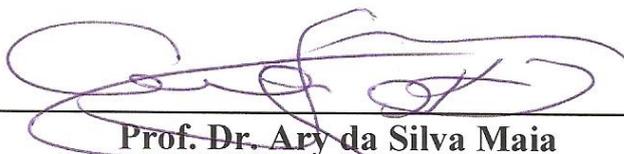
**Prof. Dr. Francisco Sávio Mendes Sinfrônio**  
Examinador



**Profa. Dra. Ilda Antonieta Salata Toscano**  
Examinadora



**Profa. Dra. Marileide Lira de Araújo Tavares**  
Examinadora



**Prof. Dr. Ary da Silva Maia**  
Examinador

*À Deus*

*Com grande amor,*

*Dedico.*

*Aos meus queridos pais António e Joana,  
meus verdadeiros amigos, companheiros e  
grandes orientadores da vida.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, nosso Senhor, dono de toda sabedoria, pelos livramentos dos perigos da vida, pela força que me tem dado diariamente para não desistir, pela sua constante presença em todos os momentos de minha vida, pois me fez acreditar e concretizar mais esta importante etapa da minha vida acadêmica. Obrigada Senhor, por TUDO!

Aos meus queridos pais, Antonio e Joana, pelo exemplo de dedicação e amor a família, os quais sempre me incentivaram a estudar e nunca desistir dos meus sonhos. Os agradeço também, pela sincera confiança que em mim depositaram desde os primeiros anos de escola, sempre colocando os meus e os estudos do meu irmão, em primeiro lugar nas suas vidas. Finalmente, os agradeço por ter me dado à oportunidade de ter concluído minha graduação, oportunidade esta, que agora se reflete na conclusão da pós-graduação. Amo vocês!

Ao meu irmão Ricardo, pelo apoio e incentivo para nunca desistir dos meus sonhos e objetivos;

A minha querida e amada sobrinha Sophia Fernanda, uma bênção em minha vida;

A todos meus familiares pelo apoio e amor dedicado durante este período e em todos os outros, e que firmam as bases para minha caminhada.

Ao prof. Dr. Fernando Carvalho Silva, por acreditar em mim e sempre oferecer oportunidades de novos conhecimentos na vida acadêmica. Obrigada por TUDO!

Ao prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza, pela oportunidade e pela iniciativa da parceria entre UFPB e UFMA. Obrigada!

Ao prof. Dr. Francisco Sávio Mendes Sinfrônio, “um anjo” que caiu em terras maranhenses... Muito Obrigada, por TUDO!

Aos professores Dr. Adeilton Pereira Maciel e ao Dr. Thomas Bonierbale pelas inúmeras contribuições;

À profa. Dra. Kátia Marques, pelo apoio e incentivo a pesquisa.

À profa. Dra. Teresa Cristina (Departamento de Tecnologia Química – UFMA) por ter cedido gentilmente o laboratório para as análises cromatográficas iniciais. Muito Obrigada!!

A minha amiga Moniquete, presença constante em minha vida, sempre me dando apoio e incentivo para nunca desanimar dos meus objetivos.

À Andrea Suame, pela ajuda ao entendimento de refino de óleos vegetais.

À Lúcia (técnica do LACOM), por ter ajudado nos ensaios de Termogravimetria.

Aos secretários da Pós-Graduação em Química da UFPB, Marcos Pequeno e Glória pela amizade, atenção e pelas informações sempre precisas;

Aos laboratórios LACOM/UFPB e Núcleo de Biodiesel (NuBIO-UFMA), por terem oferecido toda estrutura necessária para a realização desse trabalho.

A “grande família” NuBIO pelo companheirismo, para desenvolver um bom trabalho em equipe, e pelos momentos alegres e descontraídos que compartilhamos e em especial a minha miguxa **Renilma** que ajudou-me nos experimentos desta tese, sem medir esforços para o bom andamento dos ensaios. Valeuuu, garota! Muito Obrigada!

A todos os colegas do Programa de Pós-Graduação da UFPB e a todos que contribuíram para conclusão deste trabalho com suas orações e incentivos.

A OLEAMA S/A, por ter cedido todas as amostras de óleo bruto de babaçu, assim como, as etapas iniciais de refino para o desenvolvimento deste trabalho, em especial aos Químicos Alysson Alencar e Márcio Melo.

A FAPEMA / BNB pelo suporte financeiro durante a realização deste trabalho.

*“Senhor, ao iniciar esta nova jornada, peço a tua proteção.  
Volta teus olhos para o caminho que ora vou trilhar,  
estendendo a tua proteção sobre todos os meus passos.  
Ilumina a minha estrada, pois sempre que estás comigo,  
sou forte e capaz de suportar as lições a que me destinas.  
Orienta as decisões que deverei tomar.  
Acompanha-me e certifica-me de que estarei indo ao encontro  
das minhas melhores opções.  
Faz com que minha jornada tenha sucesso, Senhor.  
Livra-me dos perigos, dos acidentes e de qualquer situação que  
possa me impedir de construir a minha felicidade.  
Governa as minhas ações e comportamento daqueles que  
podem influenciar o meu destino.  
Dirige a tua luz divina para esta filha tua, que ora com fervor e  
é motivada pelo teu amor.  
Que assim seja, para sempre”*

*Para Chegar ao Coração do Senhor - Orações inspiradas nos Salmos de Davi  
Yara Beduschi Coelho*

*“Essa vitória custou-lhe momentos difíceis, noites de dúvidas,  
intermináveis dias de espera.  
Desde os tempos antigos, celebrar um triunfo faz parte do próprio ritual da  
vida: a comemoração é um rito de passagem.  
Celebrar hoje a sua vitória de ontem, para ter mais forças  
na batalha de amanhã”*

*Manual do Guerreiro da Luz  
Paulo Coelho*

**Título:** Estudo da degradação da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) durante as etapas de refino do óleo de babaçu (*Orbignya pharlerata*, Mart.): validação de um método

**Autora:** Djavania Azevêdo da Luz

**Orientadores:** Prof. Dr. Fernando Carvalho Silva

Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza

## RESUMO

O Maranhão apresenta um grande potencial agrícola para produção de óleos vegetais já que várias espécies oleaginosas são adaptadas ao seu clima e geografia. Dentre estas se encontra a palmeira de babaçu (*Orbignya pharlerata*, Mart.), de onde é extraído um óleo rico em triglicerídeos (95%) e tocoferóis. Em óleos vegetais, os tocoferóis atuam como agentes antioxidantes, inibindo a oxidação dos ácidos graxos insaturados. Neste sentido, diversas metodologias para quantificação deste antioxidante têm sido propostas, entretanto, tais procedimentos geralmente demandam elevados tempos de análises e pré-tratamento da amostra. Neste contexto, o presente trabalho propõe um método alternativo para quantificação de  $\alpha$ -tocoferol em amostras de óleo de babaçu. Também foi avaliado o grau de degradação desta espécie durante o processo de refino do óleo de babaçu, em escalas (industrial e laboratorial) por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Para tanto, as amostras não foram submetidas a qualquer tratamento prévio, sendo apenas diluídas em 2-propanol (CLAE) e clorofórmio (FTIR). Os dados espectroscópicos indicaram uma baixa resolução do método uma vez que não foi possível distinguir entre os vários tipos de tocoferóis e/ou tocotrienóis ( $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) existentes nas amostras. Por outro lado, o método cromatográfico desenvolvido apresentou uma excelente separação e resolução do composto em estudo, além de uma boa linearidade, precisão e exatidão, sendo este validado.

**Palavras chave:** babaçu,  $\alpha$ -tocoferol, refino, CLAE e FTIR

**Title:** Study of degradation of vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol) during the stages of refining oil from babassu (*Orbignya pharlerata* Mart.): Validation of a method

**Author:** Djavania Azevêdo da Luz

**Supervisor:** Prof. Dr. Fernando Carvalho Silva

Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza

## ABSTRACT

Due to its territorial location and the sort of oily plant adapted to its climate, Maranhão has a vast agricultural potential for producing vegetable oil and their bioderivates. Among them is the babassu palm (*Orbignya pharlerata*, Mart.), a vegetal rich in oil that is composed by 95% of triglycerides and traces of tocopherols. Such tocopherols act as antioxidative agents that prevent the degradation of unsaturated fatty acids of vegetal oils. Therefore, several methods have been proposed for quantifying these natural antioxidants in both oil and bioderivate products; however, they often require long time of analysis and a pretreatment of the sample. Thus, this paper aims to propose an alternative method for quantifying  $\alpha$ -tocopherol in babassu oil, as well as, evaluating its degradation during the oil refining (industrial and laboratorial scales) by means of high performance liquid chromatography (HPLC) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Hence, no previous sample treatments were performed, being the sample only diluted in 2-propanol (HPLC) or chloroform (FTIR) solvents. The use of the spectroscopy technique was rather limited, once it was incapable of distinguishing between the tocopherols and/or tocotrienols ( $\beta$ ,  $\gamma$  and  $\delta$ ) presented in the media. Conversely, the developed chromatographic method provided an efficient separation of such compounds, yielding in a significant sensibility and good linearity, precision and accuracy of the results.

**Keywords:** babassu,  $\alpha$ -tocopherol, refining, HPLC and FTIR

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xiii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xiv
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	xv
<b>LISTA DE EQUAÇÕES</b> .....	xvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	2
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	5
<b>2.1. Objetivo Geral</b> .....	5
<b>2.2. Objetivos Específicos</b> .....	5
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	7
<b>3.1. Contexto atual brasileiro de óleo vegetal</b> .....	7
<b>3.2. Babaçu</b> .....	7
<b>3.3. Processo de obtenção de óleos</b> .....	15
<b>3.4. Degradação dos óleos</b> .....	17
3.4.1. Rancificação hidrolítica .....	18
3.4.2. Rancificação oxidativa .....	18
3.4.3. Autoxidação .....	19
3.4.4. Fotoxidação .....	21
<b>3.5. Antioxidantes</b> .....	21
3.5.1. Antioxidantes naturais .....	22
3.5.2. Aplicação do $\alpha$ -tocoferol.....	24
3.5.3. Mecanismo de ação do $\alpha$ -tocoferol nas reações de oxirredução .....	24
3.5.4. Antioxidantes sintéticos .....	26
<b>3.6. Métodos para a determinação de <math>\alpha</math>-tocoferol em óleos</b> .....	28
<b>3.7. Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE</b> .....	29
<b>3.8. Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier – FTIR</b> .....	32
<b>3.9. Tratamento estatístico – Validação da metodologia</b> ....	34
3.9.1. Precisão .....	35
3.9.2. Limite de detecção e limite de quantificação .....	36
3.9.3. Exatidão .....	37
3.9.4. Repetitividade .....	38
3.9.5. Reprodutibilidade .....	38
3.9.6. Linearidade .....	38
<b>4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	40
<b>4.1. Equipamentos e acessórios</b> .....	41
4.1.1. Equipamentos .....	41
4.1.2. Acessórios .....	41
<b>4.2. Reagentes</b> .....	41
<b>4.3. Coleta e armazenagem de amostras</b> .....	42
<b>4.4. Cuidados ao manipular <math>\alpha</math>-tocoferol</b> .....	42
<b>4.5. Caracterização físico-química do óleo bruto de babaçu</b> .....	42
4.5.1. Índice de acidez (325/IV-IAL) .....	43
4.5.2. Índice de iodo (329/IV-IAL) .....	43
4.5.3. Índice de saponificação (328/IV-IAL) .....	44
4.5.4. Índice de peróxido (326/IV-IAL) .....	45
4.5.5. Umidade (334/IV-IAL) .....	46
4.5.6. Densidade (337/IV-IAL) .....	46
<b>4.6. Análise térmica</b> .....	47

4.6.1. Termogravimetria (TG) .....	47
4.6.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC) .....	47
<b>4.7. Etapas de refino do óleo bruto de babaçu .....</b>	<b>48</b>
4.7.1. Neutralização .....	48
4.7.2. Branqueamento (Clarificação) .....	48
4.7.3. Clarificação .....	49
<b>4.8. Análises de <math>\alpha</math>-tocoferol .....</b>	<b>49</b>
4.8.1. Identificação e quantificação de $\alpha$ -tocoferol por CLAE .....	49
4.8.1.1. Preparo da solução estoque de $\alpha$ -tocoferol (1000 mg. L <sup>-1</sup> ).....	49
4.8.1.2. Preparo da solução padrão de trabalho de $\alpha$ -tocoferol (100 mg. L <sup>-1</sup> ) .....	49
4.8.1.3. Preparação das amostras de óleo bruto de babaçu e das etapas de refino para as análises cromatográficas .....	50
4.8.2. Equipamentos e condições operacionais – CLAE .....	50
<b>4.9. Análises por infravermelho com transformada de Fourier – FTIR .....</b>	<b>51</b>
<b>4.10. Tratamento estatístico – Validação da metodologia....</b>	<b>52</b>
4.10.1. Precisão (Repetitividade) .....	52
4.10.2. Exatidão .....	52
4.10.3. Limite de detecção e limite de quantificação .....	52
4.10.4. Linearidade .....	53
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>54</b>
<b>5.1. Características físico-químicas do óleo bruto de babaçu</b>	<b>55</b>
<b>5.2. Estudo da degradação do óleo de babaçu – Análise térmica .....</b>	<b>56</b>
<b>5.3. Identificação e quantificação do <math>\alpha</math>-tocoferol nas amostras de óleo bruto e refinado de babaçu .....</b>	<b>58</b>
5.3.1. Construção da curva analítica – CLAE .....	60
<b>5.4. Análises das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE .....</b>	<b>63</b>
<b>5.5. Análises das amostras por espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier – FTIR .....</b>	<b>66</b>
<b>5.6. Tratamento estatístico – Validação da metodologia (CLAE) .....</b>	<b>73</b>
5.6.1. Precisão (Repetitividade) .....	73
5.6.2. Exatidão .....	74
5.6.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) ..	74
5.6.4. Linearidade .....	75
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 3.1.</b>	Produção de oleaginosas no Brasil .....	7
<b>Figura 3.2.</b>	Palmeira de babaçu .....	8
<b>Figura 3.3.</b>	Composição física do fruto de babaçu .....	9
<b>Figura 3.4.</b>	Produção nacional das amêndoas de babaçu .....	10
<b>Figura 3.5.</b>	Exportações do óleo bruto de babaçu .....	11
<b>Figura 3.6.</b>	Fluxograma simplificado do processo de refino de óleos vegetais .....	16
<b>Figura 3.7.</b>	Estruturas químicas naturais da vitamina E .....	23
<b>Figura 3.8.</b>	Mecanismo de ação do $\alpha$ -tocoferol nas reações de oxirredução .....	25
<b>Figura 3.9.</b>	Estruturas fenólicas dos antioxidantes sintéticos .....	27
<b>Figura 5.1.</b>	Curvas TG e DTG do óleo bruto de babaçu em atmosfera de ar sintético .....	57
<b>Figura 5.2.</b>	Cromatogramas da solução padrão de $\alpha$ -tocoferol (0,5 mg.L <sup>-1</sup> ) (A) e do óleo bruto de babaçu (B) .....	60
<b>Figura 5.3.</b>	Curva analítica para $\alpha$ -tocoferol – CLAE .....	61
<b>Figura 5.4.</b>	Cromatogramas dos óleos brutos, neutralizado e clarificado – industriais .....	63
<b>Figura 5.5.</b>	Cromatogramas dos óleos brutos, neutralizado e clarificado – bancada .....	64
<b>Figura 5.6.</b>	Espectros na região do infravermelho do padrão de $\alpha$ -tocoferol puro (a) e do óleo de babaçu (b) .....	67
<b>Figura 5.7.</b>	Espectros das amostras na região do infravermelho das etapas de refino do óleo de babaçu via industrial .....	68
<b>Figura 5.8.</b>	Espectros das amostras na região do infravermelho das etapas de refino do óleo de babaçu via bancada .....	69
<b>Figura 5.9.</b>	Curva analítica para o $\alpha$ -tocoferol – FTIR .....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1.</b>	Quantidades produzidas e participação relativa e acumulada de babaçu (amêndoa), dos 20 maiores municípios produtores e respectivas Unidades de Federação do Estado do Maranhão, em ordem crescente .....	12
<b>Tabela 3.2.</b>	Composição de ácidos graxos do óleo de babaçu .....	14
<b>Tabela 3.3.</b>	Características físico-químicas do óleo de babaçu .....	14
<b>Tabela 5.1.</b>	Características físico-químicas do óleo bruto de babaçu .....	55
<b>Tabela 5.2.</b>	Comparação das condições operacionais para determinação de $\alpha$ -tocoferol em óleo vegetal .....	59
<b>Tabela 5.3.</b>	Dados da curva analítica para $\alpha$ -tocoferol – CLAE .....	61
<b>Tabela 5.4.</b>	Análise de variância para os dados da curva analítica – CLAE .....	62
<b>Tabela 5.5.</b>	Concentrações de $\alpha$ -tocoferol a partir das etapas de refino do óleo de babaçu .....	65
<b>Tabela 5.6.</b>	Valores das frequências vibracionais na região do IV do padrão de $\alpha$ -tocoferol e da amostra de óleo de babaçu bruto .....	67
<b>Tabela 5.7.</b>	Análise de variância para os dados da curva analítica – FTIR .....	71
<b>Tabela 5.8.</b>	Concentrações de $\alpha$ -tocoferol a partir das etapas de refino do óleo de babaçu – CLAE e FTIR .....	72
<b>Tabela 5.9.</b>	Valores de concentração obtidos pela repetitividade para o $\alpha$ -tocoferol .....	73
<b>Tabela 5.10.</b>	Recuperação das amostras fortificadas com soluções padrões de $\alpha$ -tocoferol com concentrações de 1,5 e 10,0 mg.L <sup>-1</sup> .....	74

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BHA – Hidroxi-butil-anisol

BHT- t-butil-hidroxihidroquinona

CG – Cromatografia gasosa

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CV% - Coeficiente de variação

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

$F_{1,n-2}$  – Valor tabelado da distribuição do teste F a 95 % de incerteza com 1 e n-2 graus de liberdade.

$F_{\text{calculado}}$  – Razão entre a média quadrática devido ao modelo de regressão e a média quadrática residual  $MQ_{\text{reg}} / MQ_r$ .

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

LDM – Limite de detecção do método

LQM – Limite de quantificação do método

MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

$MQ_r$  – Média quadrática residual.

$MQ_{\text{reg}}$  – Média quadrática devido ao modelo de regressão

ODPVA – Octadecil polivinil álcool

PAD – Photodiode-array (Detector)

PFPS - Pentafluorofenil

PG – 3,4,5 ácido triidroxibenzóico

PVDF –Difluoreto de polivinilideno

r – Coeficiente de correlação da curva analítica.

R% - Índice de recuperação.

$R^2$  – Coeficiente de determinação é a razão entre a soma quadrática explicada pela regressão e a soma quadrática total  $SQ_{\text{reg}} / SQ_t$ .

s – Estimativa do desvio padrão.

$SQ_{reg}$  – Soma quadrática explicada pela regressão.

$SQ_t$  - Soma quadrática total.

$s_{x_0}$  – Desvio padrão do método

$s_y$  – Desvio padrão residual ou erro padrão

TBHT – t-butil-hidroquinona

TG - Termogravimetria

UV-Visível – Região de absorção na região do ultravioleta – visível.

$V_{x_0}$  – Coeficiente de variação do método

$\alpha$ -T – Alfa-tocoferol

$\alpha$ -THQ – Alfa - tocofenilhidroquinona

$\alpha$ -TQ – Alfa - tocofenilquinona

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1</b> .....	35
<b>Equação 2</b> .....	35
<b>Equação 3</b> .....	37
<b>Equação 4</b> .....	37
<b>Equação 5</b> .....	38
<b>Equação 6</b> .....	43
<b>Equação 7</b> .....	44
<b>Equação 8</b> .....	45
<b>Equação 9</b> .....	46
<b>Equação 10</b> .....	46
<b>Equação 11</b> .....	47

# **CAPÍTULO 1**

---

## **INTRODUÇÃO**

---

## 1. INTRODUÇÃO

O babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart) é uma palmeira nativa das regiões Norte, Nordeste e Centro Oeste do Brasil, sendo distribuídos nos Estados do Maranhão, Piauí, Tocantins, Goiás, Mato Grosso, Amazonas, Pará, Rondônia, Ceará, Bahia e Minas Gerais, ao longo de aproximadamente 279 municípios. (IBGE, 2009).

Mesmo presente em diversos Estados, o Maranhão ainda continua sendo o maior produtor de babaçu, envolvendo 149 municípios e representando 94,7% da produção nacional, concentrando 10 milhões de hectares. Junto com o Piauí, envolve 66 municípios e representa 4,4% da produção nacional, apresenta zonas de alta densidade, por apresentarem populações superiores a 200 palmeiras por hectare (IBGE, 2009).

Apesar da possibilidade de se utilizar esta palmeira de diversas formas e em diversos processos industriais, é na amêndoa, em função da produção do óleo, onde se encontra a sua maior importância econômica. Segundo dados do IBGE (2009), a produção nacional destas foi de aproximadamente 114.874 toneladas.

Os óleos vegetais brutos são constituídos por mais de 95% de triglicerídeos e por compostos minoritários tais como: fosfolipídios (fosfatídeos), carboidratos, ácidos graxos livres e produtos de degradação dos ácidos graxos. Logo, sua utilização direta como alimentação humana não é adequado, devendo este ser refinado (degomagem; neutralização; braqueamento ou clarificação e desodorização), para que o mesmo esteja em condições adequadas de consumo.

Os tocoferóis são antioxidantes naturais, capazes de inibir a oxidação de óleos e gorduras comestíveis, pois reduzem a oxidação dos seus ácidos graxos insaturados. A atividade antioxidante dos tocoferóis está relacionada a sua capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos

radicais livres lipídicos, interrompendo a propagação da cadeia (SILVA, 2008).

Infelizmente, devido as concentrações de tocoferóis em óleos vegetais serem baixas há necessidade de uma pré-concentração das amostras a serem analisadas.

A literatura recomenda dois métodos de pré-concentração de amostras oleosas: primeiro tem-se a injeção direta do óleo, que consiste da diluição deste em um solvente apropriado, antes das análises cromatográficas; já o segundo método, trata-se da análise da fração insaponificável, que consiste em saponificar a amostra para eliminar os lipídeos, liberando assim, os tocoferóis naturais das células e hidrolisar ésteres de tocoferóis a tocoferóis livres e a seguir injeção no cromatógrafo (LIMA e GONÇALVES, 1997).

Apesar da saponificação apresentar-se como uma técnica muito difundida quanto ao isolamento das vitaminas lipossolúveis encontradas na fração insaponificável dos alimentos, para a determinação de tocoferóis (vitamina E), normalmente abre-se mão desta, por ser muito demorada e ocasionar perdas significativas deste antioxidante, devido ao alto grau de manipulação da amostra (PAIXÃO e STAMFORD, 2004).

Desta maneira, com o objetivo de avaliar a degradação do  $\alpha$ -tocoferol que é um antioxidante natural presente na maioria dos óleos vegetais e nas etapas iniciais de refino é que o presente trabalho propõe uma metodologia alternativa por via direta de análise, voltado para o óleo de babaçu, utilizando como técnicas analíticas, a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector UV e a espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), avaliando as concentrações encontradas por estas técnicas, validando o melhor método de análise.

## **CAPÍTULO 2**

---

### **OBJETIVOS**

---

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Este trabalho tem como objetivo geral, propor um método para avaliar a estabilidade química do  $\alpha$ -tocoferol durante o processo de refino do óleo de babaçu.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Analisar o óleo bruto de babaçu, segundo parâmetros de índice de acidez, índice de peróxido, índice de saponificação, índice de iodo, densidade e umidade;
- Refinar o óleo bruto de babaçu por processos de neutralização e branqueamento (clarificação), em nível de bancada;
- Estabelecer um método para quantificação de  $\alpha$ -tocoferol por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE);
- Estabelecer um método para quantificação de  $\alpha$ -tocoferol por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- Avaliar estatisticamente o melhor método para a análise de  $\alpha$ -tocoferol, quanto à precisão (repetitividade), exatidão, limite de detecção e quantificação e linearidade;
- Aplicar as metodologias propostas e verificar o teor de  $\alpha$ -tocoferol.

## **CAPÍTULO 3**

---

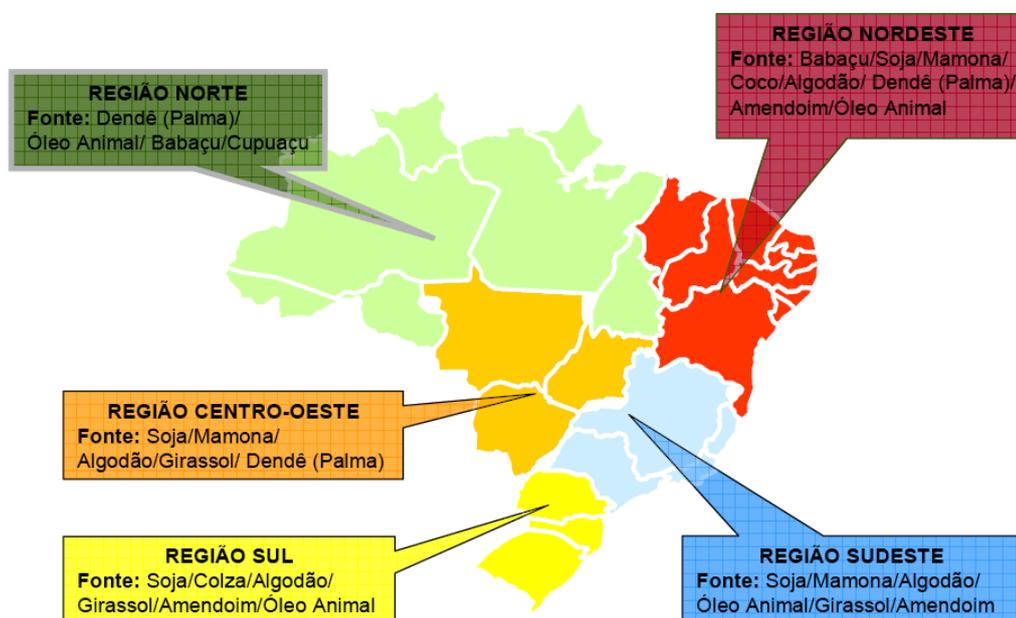
# **FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

---

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. Contexto atual brasileiro de óleo vegetal

O Brasil apresenta uma grande área territorial, estimada em 90 milhões de hectares, com climas adequados para o favorecimento de cultivo de várias sementes oleaginosas (Figura 3.1), caracterizando-se como um país com grande potencial para a exploração de biomassa para fins alimentícios e energéticos, dentre estas se destaca o babaçu.



**Figura 3.1.** Produção de Oleaginosas no Brasil

Fonte: SANTOS, 2008

#### 3.2. Babaçu

Segundo Zylbersztajn *et al.*, (2000), babaçu é o nome genérico dado às palmeiras oleaginosas pertencentes à família *Palmae* e integrantes dos gêneros *Orbignya* e *Attalea*. O primeiro gênero inclui espécies predominantemente nativas da região norte e nordeste do Brasil (Pará, Tocantins, Piauí e Maranhão), tais como: *Orbignya phalerata* Mart. (babaçu verdadeiro), *Orbignya eichleri* Drude (piaçava), *Orbignya*

*teixeirana* Bondar (perinão) e *Orbignya microcarpa* Martius. O segundo gênero abrange espécies encontradas principalmente nos estados de Goiás, Minas Gerais e Bahia, dentre as quais se destacam: *Attalea oleifera* Barb. Rodr. (catolé-de-pernambuco) e *Attalea pindobassu* Bondar (pindobaçu). A *Orbignya phalerata* é a espécie de maior distribuição, de maior variação morfológica e de maior importância econômica. Esta espécie ocupa regiões extensivas no Brasil, na Bolívia e no Suriname. (Figura 3.2). Com crescimento espontâneo nas matas da região amazônica. Cada Palmeira pode produzir anualmente 2.000 frutos (CHAVES *et al.*, 2006).

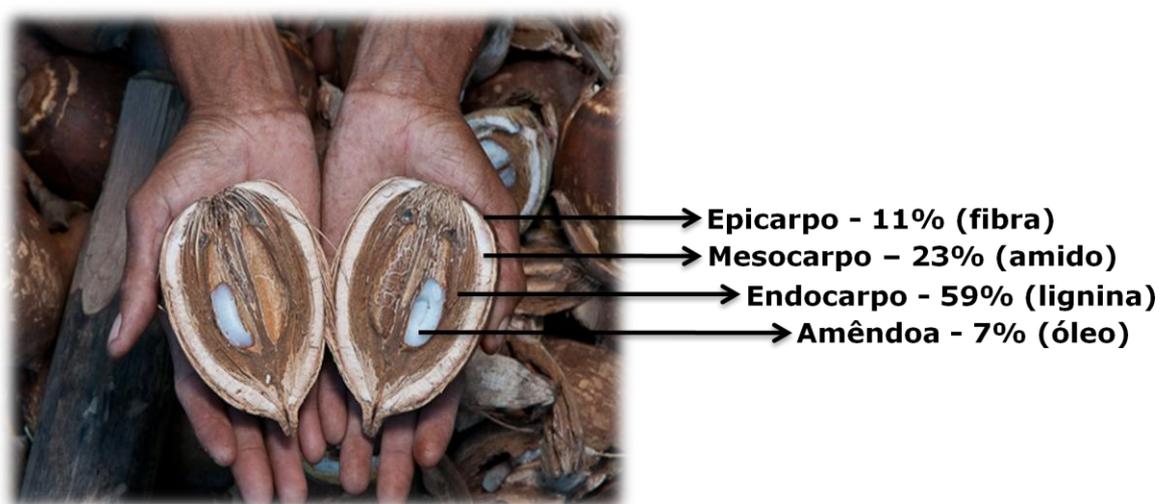


**Figura 3.2.** Palmeira de babaçu

**Fonte:** <<http://www.infoescola.com/plantas/babacu>>

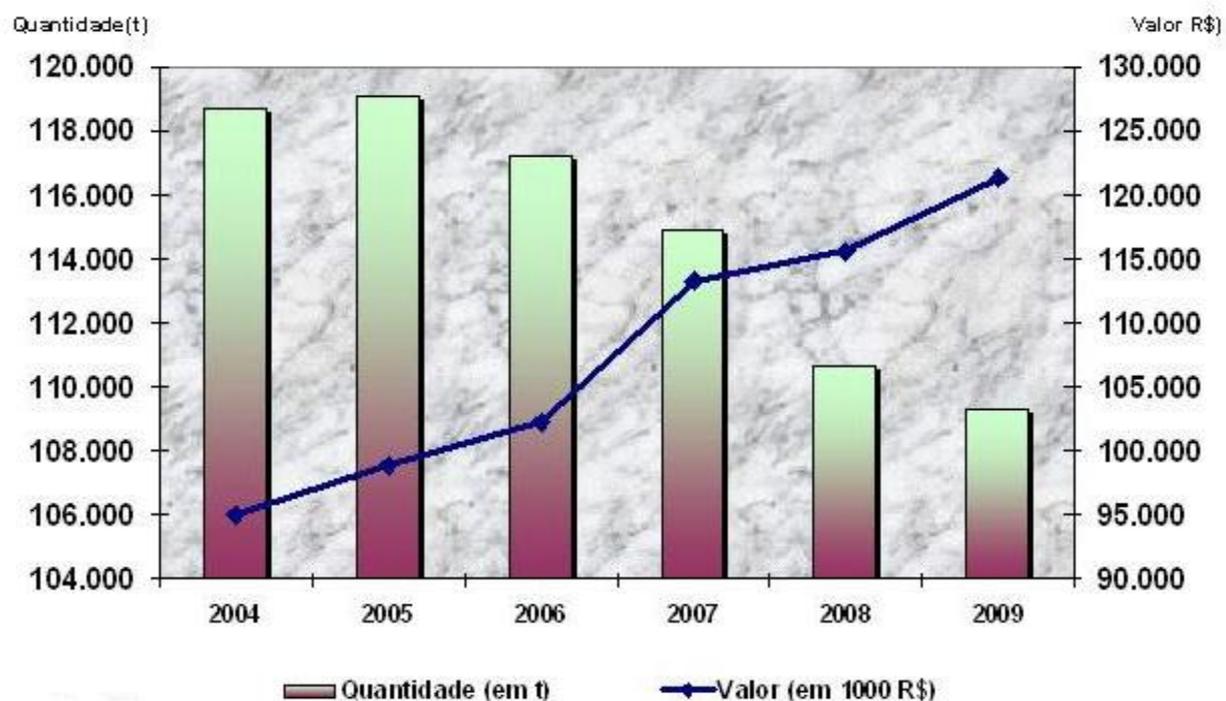
O principal produto do babaçu é o óleo da amêndoa, constituindo 65% do peso desta, e é subproduto para a fabricação de sabão, glicerina e óleo comestível, mais tarde transformado em margarina, e de uma torta utilizada na produção de ração animal e de óleo comestível (USP, 2006).

Teixeira (2008), relata que os frutos apresentam um formato elipsoidal, mais ou menos cilíndrico, pesando entre 90 a 280 g, apresentando de 3 a 5 amêndoas em cada fruto, onde apresenta uma camada externa denominada epicarpo, que envolve uma camada secundária rica em amido, denominada mesocarpo. O endocarpo é a camada mais rígida que contém as amêndoas de onde é extraído o óleo (Figura 3.3). Estas apresentam bastante aplicabilidade, daí a idéia do aproveitamento e de um rendimento de quase 100% de sua massa.



**Figura 3.3.** Composição física do fruto de babaçu

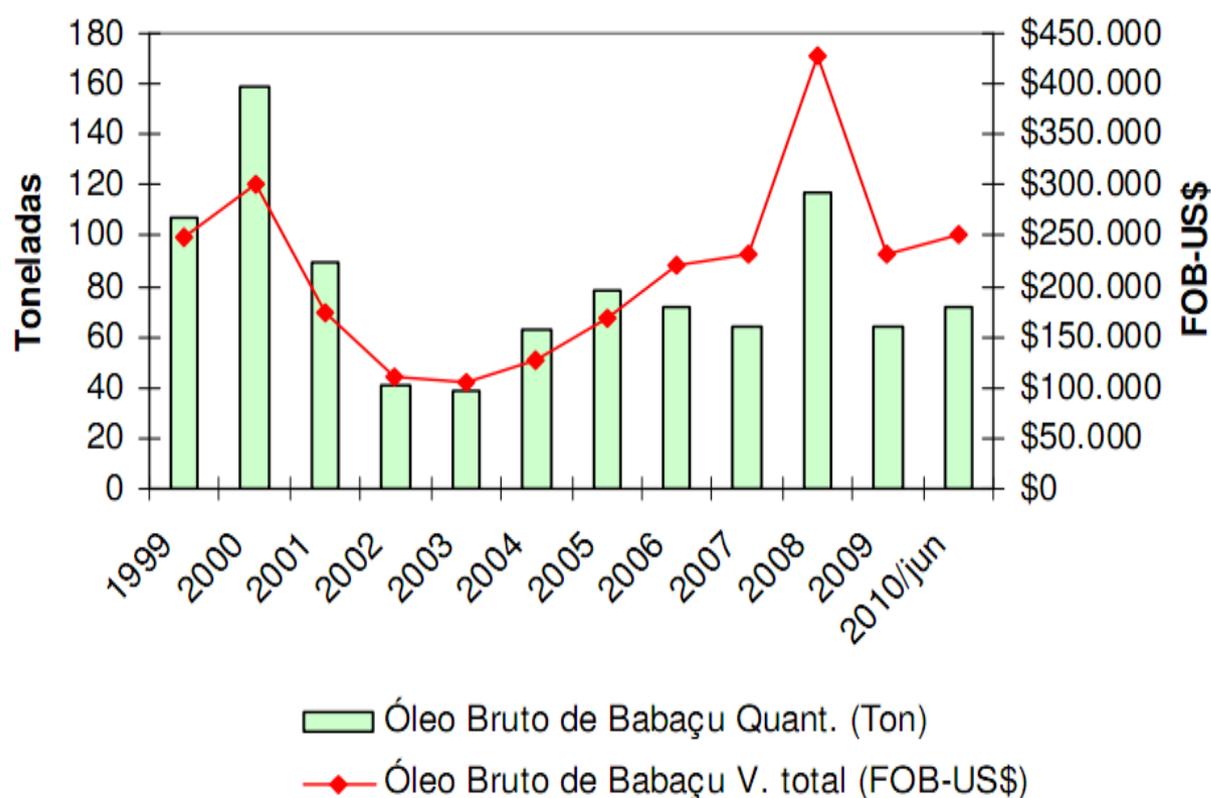
No ano de 2009, foram coletadas 109.299 toneladas de amêndoas de babaçu, gerando uma renda de R\$ 121.351,00, sendo que o principal produtor, o Estado do Maranhão, concentrou 94 % do total nacional. O segundo maior produtor é o Piauí, com 5.250 toneladas coletadas em 2009, vindo, em seguida, Tocantins (537 toneladas), Ceará (354 toneladas) e Bahia (335 toneladas). (IBGE, 2009). A Figura 3.4 demonstra a quantidade de amêndoas de babaçu produzidas nacionalmente entre 2004-2009.



**Figura 3.4.** Produção nacional das amêndoas de babaçu

**Fonte:** (IBGE, 2009)

Através da Figura 3.4 percebe-se a evolução da produção nacional nos anos de 2004 a 2009, onde apresenta uma ligeira queda na produção de 1,2%, e um aumento no valor das negociações na ordem de 4,8% (CONAB, 2011), indicando-o como um produto de grande valor comercial. A Figura 3.5. ilustra as exportações de óleo bruto de babaçu.



**Figura 3.5.** Exportações de óleo bruto de babaçu

**Fonte:** (CONAB, 2011)

Observa-se, por meio da Figura 3.5., que os valores auferidos com as exportações brasileiras de óleo de babaçu bruto têm se elevado significativamente, passando de U\$\$ 104.976 em 2003 para U\$\$ 232.189 em 2009. Atualmente, ampliou-se as exportações realizadas com apelo social e ambiental (comércio justo, solidário, etc.), pois há empresas importadoras localizadas na Europa e nos Estados Unidos, que se propõem a pagar um preço melhor para se diferenciar no mercado. (CONAB, 2011).

Na Tabela 3.1 estão agrupados os 20 maiores municípios produtores de babaçu amêndoa, vários dos quais são maranhenses, detendo 53,6% da produção nacional. O primeiro colocado é Vargem Grande, com uma produção de 5.862 toneladas, equivalente a 5,4% da produção nacional. (IBGE, 2009).

**Tabela 3.1.** Quantidade produzida e participação relativa e acumulada de babaçu (amêndoa), dos 20 maiores municípios produtores e respectivas Unidades de Federação do Estado do Maranhão, em ordem decrescente – 2009

Municípios produtores e respectivas Unidades Federativas do Estado do Maranhão	Babaçu (amêndoa)		
	Quantidade produzida (t)	Participações (%)	
		Relativa	Acumulada
<b>Brasil</b>	<b>109.299</b>	<b>100</b>	<b>-</b>
Vargem Grande – MA	5.863	5,4	5,4
Pedreiras – MA	5.700	5,2	10,6
Poção de Pedras – MA	4.723	4,3	14,9
Bacabal – MA	4.023	3,7	18,6
São Luis Gonzaga do Maranhão – MA	3.635	3,3	21,9
Bom Lugar – MA	3.550	3,2	25,2
Codó – MA	3.102	2,8	28
Chapadinha – MA	2.880	2,6	30,6
Lago da Pedra – MA	2.868	2,6	33,6
Cajari– MA	2.621	2,4	35,7
Coroatá – MA	2.428	2,2	37,9
Vitorino Freire – MA	2.325	2,1	40,0
Lago dos Rodrigues - MA	2.244	2,1	42,1
Penalva – MA	2.042	1,9	43,9
Paulo Ramos – MA	2.020	1,8	45,8
Joselândia– MA	2.011	1,8	47,6
Lago Verde – MA	1.832	1,7	49,3
Bernardo do Mearim - MA	1.651	1,5	50,8
Alto Alegre do Maranhão - MA	1.503	1,4	53,6

**Fonte:** (IBGE,2009)

Percebe-se através da Tabela 3.1, que a grande quantidade desta palmeira encontrar-se no Estado do Maranhão, o que motivou à instalação de várias empresas processadoras de óleo comestível e láurico obtido a partir da amêndoa do babaçu (LAGUNA *et. al.*, 2010).

O mercado para o óleo de babaçu é propriamente o nacional, o qual se dá principalmente por meio de corretoras. Apenas 0,19% da produção nacional de óleo vêm sendo exportada. Em 2008, segundo o MDIC (ALICEWEB, 2009), o Brasil só exportou 143 toneladas de óleo de babaçu.

Quimicamente, o óleo de babaçu possui uma ampla diversidade de ácidos graxos, com altas concentrações dos ácidos, láurico (40-55%) e mirístico (11-27%), que favorecem a sua utilização (CODEX ALIMENTARIUS, 2003; PORTO, 2004). Contêm ácidos insaturados em pequenas quantidades, o que faz com que os óleos pertencentes a esta família tenham um tempo de armazenamento muito grande (OLIVEIRA, 2007).

Para fins alimentícios a Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária regulamenta a identidade e qualidade dos óleos vegetais para o consumo humano, estabelecendo seguinte composição química para o óleo de babaçu (Tabela 3.2) e indicando as seguintes características físico-químicas (Tabela 3.3) (ANVISA, 2006).

**Tabela 3.2.** Composição de ácidos graxos do óleo de babaçu

<b>Ácidos Graxos</b>	<b>Valores de referência (%)</b>
Ácido Caprílico (C 8:0)	2,6 – 7,3
Ácido Cáprico (C 10:0)	1,2 – 7,6
Ácido Láurico (C 12:0)	40,0 – 55,0
Ácido Mirístico (C 14:0)	11,0 – 27,0
Ácido Palmítico (C 16:0)	5,2 – 11,0
Ácido Esteárico (C 18:0)	1,8 – 7,4
Ácido Oléico (C 18:1)	2,0 – 9,0
Ácido Linoléico (C 18:2)	1,4 – 6,6

**Fonte:** ANVISA, 2006.

De acordo com a ANVISA (2006), o óleo de babaçu bruto e refinado apresenta as seguintes características, conforme mostra a Tabela 3.3.

**Tabela 3.3.** Características físico-químicas do óleo de babaçu

<b>PROPRIEDADES</b>		<b>LIMITES</b>
Massa Específica, 40 °C/25 °C		0,911 - 0,914
Índice de refração (n D 40)		1,448 - 1,451
Índice de saponificação		245 – 256
Índice de iodo (Wijs)		10 – 18
Matéria insaponificável, g/100g		Máximo 1,2 %
Acidez (g de ácido oléico/100g)	Óleo de babaçu	Máximo 0,3 %
	Óleo de babaçu bruto	Máximo 5,0 %
Índice de peróxido, meq/kg		Máximo 10

**Fonte:** ANVISA, 2006.

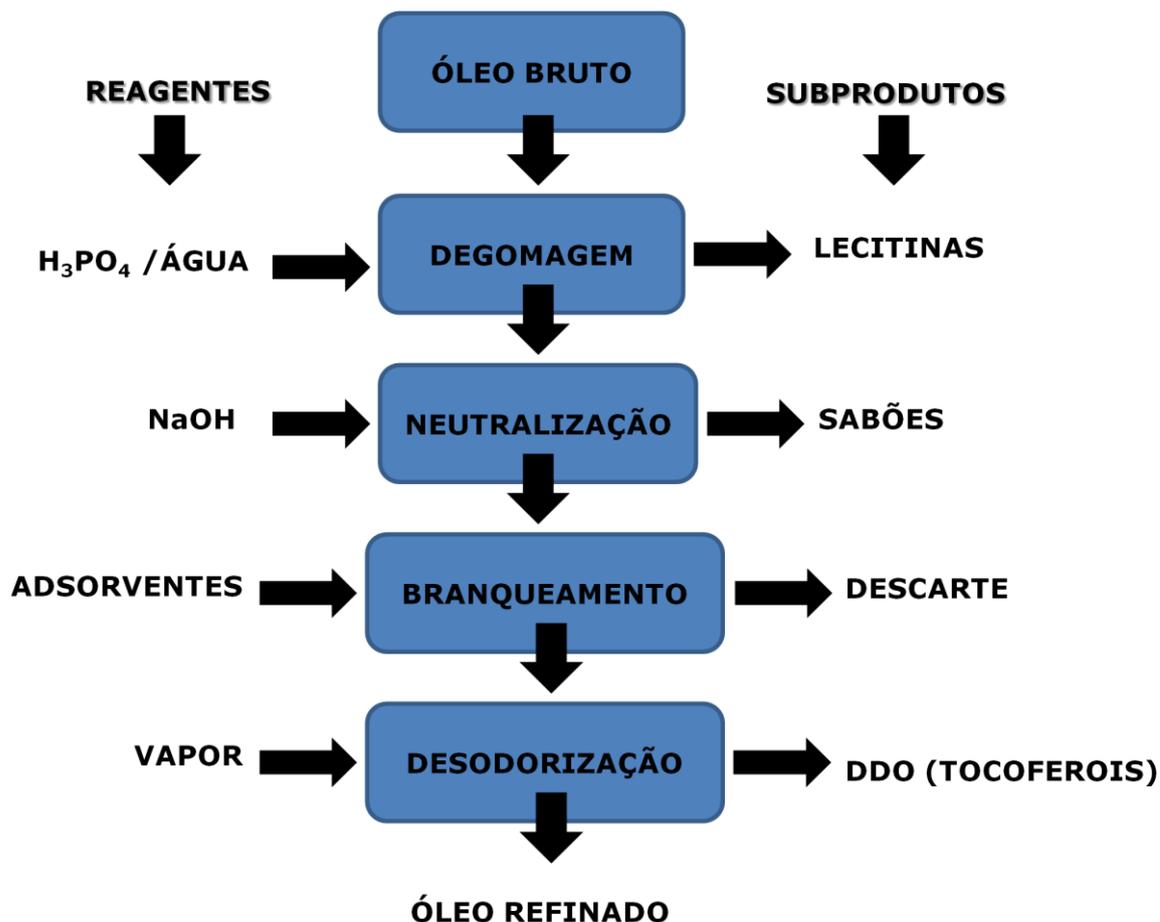
O conhecimento das características físico-químicas de óleos e gorduras é importante, pois permite o estabelecimento da identidade para

um determinado lipídeo através da análise do conjunto dos vários índices que lhe são específicos. Além disso, esse conhecimento também possibilita uma estimativa do tipo de ácidos graxos presentes (índice de saponificação) e o seu grau de insaturação (índice de iodo) (BENÍCIO *et al.*, 2010).

### **3.3. Processos de obtenção de óleo vegetal**

A extração do óleo bruto ocorre através de métodos tradicionais a partir das sementes das oleaginosas por meio de prensagem ou de utilização de solventes e até mesmo coma combinação das duas técnicas (MORETTO e FETT, 1998). Quanto ao uso de solventes, o óleo é extraído das sementes com solventes polares com ponto de ebulição até 70 °C, pois temperaturas superiores podem ocasionar a formação de ácidos graxos livres devido à quebra de ligação entre ácidos graxos e glicerol. O processo de extração por prensa mecânica realiza o esmagamento das sementes removendo parcialmente o óleo. Este procedimento pode ser precedido de um aquecimento controlado dos grãos, visando assim aumentar o rendimento de extração (MORAIS *et al.*, 2001).

Quanto ao processo de refino, este é compreendido pelas seguintes etapas: degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização. Dentre os tipos de refino existentes, o refino químico permite o processamento de óleo de qualquer natureza, mesmo apresentando níveis de fosfatídeos baixos ou altos (MORAIS *et al.*, 2001). As principais etapas do processo de refinação dos óleos vegetais são demonstradas na Figura 3.6.



**Figura 3.6.** Fluxograma simplificado do processo de refino de óleos vegetais.

O óleo entra na refinaria como óleo bruto agregado a componentes que devem ser removidos através de uma pré-limpeza, a qual tem como principal objetivo a retirada dos sólidos em suspensão. Os óleos vegetais brutos apresentam geralmente grandes quantidades de fosfatídeos, ceras, carotenóides e impurezas, daí a necessidade da etapa da degomagem que é realizada pela adição de ácido fosfórico para hidratar os fosfatídeos não hidratáveis (FREIRE, 2009).

A lixívia (soda cáustica dissolvida em água) é então adicionada para neutralizar os ácidos graxos livres. A soda cáustica combinada com os ácidos graxos livres presentes nos óleos forma sabões; os fosfatídeos e gomas absorvem a base e são coagulados por hidratação ou degradação; grande parte da coloração é degradada, absorvida pelas gomas ou

tornam-se solúveis em água e a parte insolúvel é combinada com o material coagulado (REIPERT, 2005). Em seguida o óleo entra no branqueador, onde são adicionadas ao óleo neutralizado substâncias adsorventes como argila ácida ativada, terra diatomácea, terras neutras e carvão ativo (MORAIS *et al.*, 2001).

O branqueamento tem como finalidade a remoção de pigmentos, produtos de oxidação, metais e outros. Após o tempo de adsorção é realizada uma filtração para a retenção dessa substância adsorvente e o óleo é retirado pela aplicação de água quente ou vapor antes da eliminação como um rejeito sólido. Logo a seguir, o vapor da desodorização decompõe os peróxidos restantes, removendo pigmentos como os carotenóides, constituintes responsáveis pelos odores e sabores e reduz os ácidos graxos livres (REIPERT, 2005).

Segundo Moretto e Fett (1998), durante o processo de refinação, há uma inevitável perda de até 6% do teor de tocoferóis totais, nas etapas de neutralização e de clarificação.

No entanto, para Masuchi *et al.*, (2008), a etapa de desodorização é considerada como etapa de maior perda de teor de tocoferol chegando a níveis de até 30% em relação a concentração inicial encontrada no óleo bruto. Esta perda depende das condições de temperatura e do vácuo empregados.

### **3.4. Degradação dos óleos**

A reação de oxidação é uma das principais causas de deterioração de óleos vegetais e possui como consequência, o desenvolvimento da rancidez oxidativa, caracterizada por modificações na cor, sabor e aroma do óleo (realizadas por análise sensorial). Em geral levam à rejeição do produto, além da diminuição da qualidade nutricional dos mesmos com consequências importantes para a saúde

(CARVALHO, 2007). A atividade antioxidante pode ser resultado de uma ligação específica com radicais livres reativos, com compostos contendo oxigênio ou uma ação complexante de metais. Essas substâncias encontram-se presentes naturalmente em óleos de origem vegetal e incluem os tocoferóis, proteínas, enzimas e uma série de pequenas moléculas.

Existem fatores que afetam esses processos, sendo os mais importantes a presença de insaturação nos ácidos graxos, luz, temperatura, enzimas, microrganismos e condições de armazenamento (LEUNG *et al.*, 2006 e KAPILAN *et al.*, 2009).

#### 3.4.1. Rancificação hidrolítica

Este tipo de oxidação, também conhecido por lipólise ou rancidez lipolítica (MORETO e ALVES, 1986), pode ocorrer por meio enzimático ou não-enzimático. O enzimático ocorre pela ação da lipase, que pode estar presente nas sementes das oleaginosas, ou pela atividade microbiana (processo de fermentação), que hidrolisam os óleos e gorduras produzindo ácidos graxos livres (MORETTO e FETT, 1998).

#### 3.4.2. Rancificação Oxidativa

Antes que ocorra a reação do ácido graxo insaturado com o oxigênio, um dos reagentes precisa ser ativado. Assim, ou a olefina é convertida em um radical alílico estabilizado por ressonância, ou o oxigênio é convertido a uma espécie mais reativa, como o oxigênio singlete. Estas duas reações ocorrem por meio de diferentes mecanismos, embora resultem em produtos semelhantes (GUSTONE, 1984).

Vale ressaltar que, o estado fundamental do oxigênio ( $^3\text{O}_2$ ) é um estado triplete com dois elétrons desemparelhados de mesmo *spin*, mas em orbitais diferentes. O oxigênio eletronicamente excitado corresponde a um estado singlete ( $^1\text{O}_2$ ) apresentando um par de elétrons na camada

eletrônica externa em um primeiro estado de excitação, ou apresentando um elétron em cada orbital com spins opostos, num segundo estado energético. A vida média deste segundo estado ( $10^{-11}$  s) é muito mais curta que a do primeiro que é  $10^{-6}$  s, sendo assim menos estável (LIMA e ABDALLA, 2001 e KAPILA, 2009).

Pelo exposto, a reação do oxigênio triplete com um ácido graxo insaturado é limitada. Essa restrição deixa de existir quando o oxigênio molecular está na forma de oxigênio singlete, ou parcialmente reduzido ou ativado, como por exemplo,  $H_2O_2$ ,  $O_2\bullet$ ,  $HO\bullet$ , complexos ferro-oxigênio (LIMA e ABDALLA, 2001). O oxigênio singlete pode ser formado por processos enzimáticos, químicos e fotoquímicos.

### 3.4.3. Autoxidação

Dentre os processos oxidativos, o de auto-oxidação é o mais comum. Este conforme mostrado na Figura 3.6, envolve uma reação em cadeia com as etapas de iniciação, propagação e terminação (RAMALHO e JORGE, 2006).

- Iniciação

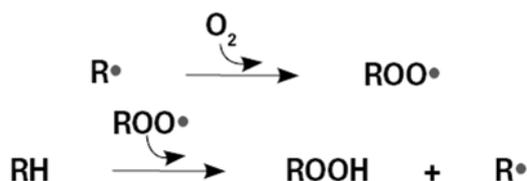
Esta etapa é caracterizada pela formação de radicais livres, em que os ácidos graxos poliinsaturados são atacados por uma espécie suficientemente reativa capaz de abstrair um átomo de hidrogênio a partir de um grupo metileno ( $-CH_2-$ ), formando um radical de carbono. Este radical é estabilizado por ressonância para formar um dieno conjugado (LIMA e ABDALLA, 2001).

O ácido graxo RH é então atacado e forma um radical livre R• muito ativo:



- Propagação

Na propagação, os radicais livres R•, reagem com moléculas de oxigênio, transformam-se em radicais peroxil ROO•. Os radicais peroxil são capazes de atacar outro ácido graxo RH, resultando em um peróxido ROOH e um novo radical livre que pode, por sua vez, atuar:



- Terminação

A quantidade de componentes altamente reativos aumenta de maneira constante até o momento em que começam a reagir entre eles. Então, ocorre a diminuição da concentração dos radicais peroxil (ROO•), com formação de peróxidos, originando produtos estáveis de degradação:



As razões para a auto-oxidação estão relacionadas à presença de ligações duplas nas cadeias carbônicas dos óleos e gorduras. A rapidez do processo auto-oxidativo depende principalmente do número e da posição das ligações duplas. Cadeias carbônicas poli-insaturadas como as que constituem alguns ácidos graxos de ocorrência natural, tais como o

linolêico (ligações duplas em C-9 e em C-12) e o linolênico (ligações duplas em C-9, C-12 e em C-15), são mais susceptíveis à oxidação. As posições CH<sub>2</sub>-alílicas e bis-alílicas em relação as duplas, presentes nas cadeias dos ácidos graxos são mais sujeitas a oxidação. Este fato deve-se a razões mecánísticas para a estabilização do radical livre formado durante o processo.

Para evitar a autooxidação de óleos e gorduras há a necessidade de diminuir a incidência de todos os fatores que a favorecem, mantendo ao mínimo os níveis de energia (temperatura e luz), responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação de radicais livres, evitando a presença de traços de metais no óleo, bem como o contato com oxigênio. É possível também bloquear a formação de radicais livres por meio de substâncias antioxidantes, as quais, em pequenas quantidades, atuam interferindo nos processos de oxidação de lipídeos (RODRIGUES FILHO, 2010).

#### 3.4.4. Fotoxidação

A fotoxidação é um processo de degradação muito mais rápido que a autooxidação, por envolver reações com o oxigênio em seu estado mais excitado ou singlete.

Tanto na fotoxidação quanto na autooxidação os produtos finais derivam da decomposição dos hidroperóxidos alílicos gerando aldeídos, ácidos e outros compostos oxigenados como produtos dos processos (CANDEIA, 2008).

### **3.5. Antioxidantes**

Devido à degradação de óleos que pode ocorrer de maneira rápida, as indústrias vêm tentando estabelecer um controle nas alterações

dos produtos oriundos de gorduras, óleos e alimentos gordurosos. Dentro deste contexto, os antioxidantes ocupam lugar de destaque, cuja efetividade como inibidor das reações autoxidativas durante armazenamento, processamento e utilização de gorduras é indiscutível e conduz sua autorização como aditivos usados em quantidades limitadas (LUZIA, 2008; RIOS e PENTEADO, 2003). Mesmo estes apresentando pouca estabilidade frente à exposição a altas temperaturas, nas indústrias de óleos, é importante a utilização de antioxidantes que sejam estáveis em temperaturas elevadas, com a finalidade de permitir a estabilidade e um prolongamento da vida útil dos óleos (LUZIA, 2008).

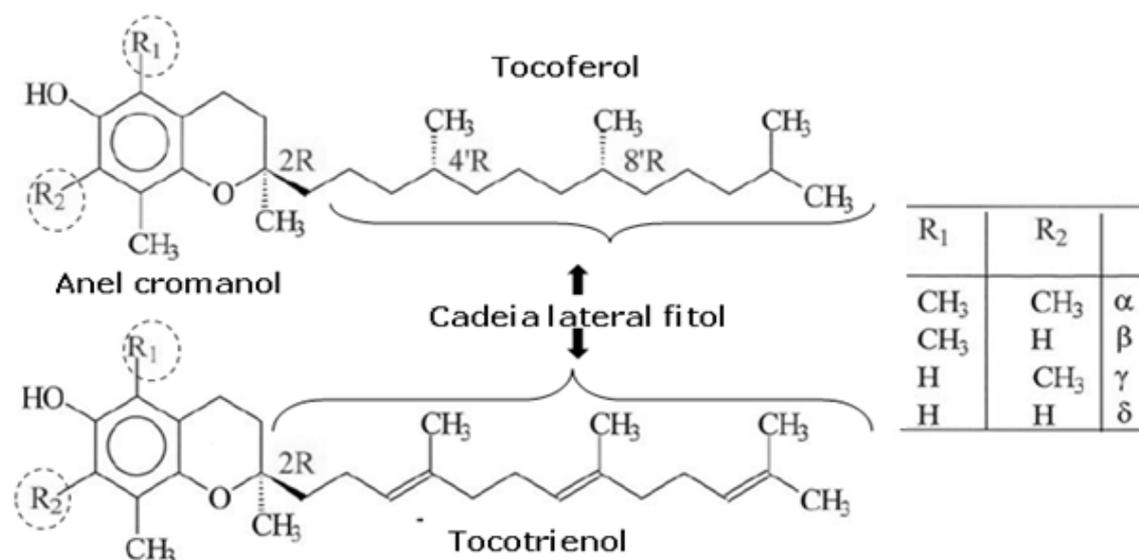
Os antioxidantes são classificados em dois grupos: os antioxidantes naturais, representados pelos tocoferóis, ácidos fenólicos e extratos de plantas como o alecrim e sálvia e os antioxidantes sintéticos, representados por Hidroxi-butil-anisol (BHA), t-Butil-hidroxiidroquinona (BHT) e t-Butil-hidroquinona (TBHQ) (NIMET, 2009).

### 3.5.1. Antioxidantes Naturais

Dentre os antioxidantes naturais mais pesquisados estão os tocoferóis (vitamina E) (GODIM, 2009). O termo genérico "vitamina E" é utilizado para designar oito diferentes compostos, nomeados  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis. O  $\alpha$ -tocoferol encontra-se presente na maioria dos óleos vegetais, gérmen de trigo, sementes oleaginosas, vegetais folhosos verde-escuros e alimentos de origem animal, principalmente gema de ovo e fígado. Sendo assim, os óleos vegetais comestíveis, além de possuírem altas concentrações de tocoferóis e alguns tocotrienóis, apresentam grande consumo em nível mundial, constituindo-se, portanto, nos alimentos de maior contribuição para a ingestão de vitamina E para a população (GUINAZI, 2009).

Segundo pesquisas, o óleo de girassol parece ser o mais rico em  $\alpha$ -tocoferol, seguido pelo algodão, palma, canola, amendoim, oliva, soja e coco. O  $\delta$ -tocoferol é o composto predominante em óleos de soja e de milho, enquanto que o óleo de palma é o que apresenta maior teor de tocotrienóis. (JORGE e RAMALHO, 2006).

Os tocoferóis (Figura 3.7) são compostos contendo grupamentos metil-substituintes e cadeia lateral saturada, enquanto que os tocotrienóis apresentam estrutura idêntica, exceto pela presença de três duplas ligações na cadeia carbônica (GUINAZI, 2004).



**Figura 3.7.** Estruturas químicas naturais da vitamina E

Chama-se de primeiro grupo, o tocoferol, que é derivado do tocol e apresenta uma cadeia lateral saturada contendo 16 átomos de carbono. Esse grupo inclui quatro dos oito compostos, sendo eles o  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol e o  $\delta$ -tocoferol. A diferença entre os tocoferóis e os tocotrienóis (segundo grupo) é o fato destes últimos possuírem uma cadeia lateral insaturada contendo 16 átomos de carbono. Outro fator que deve ser levado em consideração é entre os vários isômeros de posição,

residindo apenas ao fato das substituições de grupos metil serem feitas em locais diferentes do anel aromático pode determinar quais compostos serão ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$  tocoferóis e /ou tocotrienóis) (AZZI e STOCKER, 2000; CERQUEIRA *et al.*, 2007).

### 3.5.2. Aplicação do $\alpha$ -tocoferol

Pode-se ressaltar a utilização do  $\alpha$ -tocoferol na área de alimentos com a função de conservante (CARVALHO, 2007); como fármacos devido a sua função de captadores e liberadores de energia (PAIXÃO e STAMFORD, 2004); cosméticos através de tratamento contra o envelhecimento cutâneo (ALMEIDA, 2008); na inibição de doenças do coração – o  $\alpha$ -tocoferol exerce função importante como inibidor da oxidação dos radicais livres, reagindo com o oxigênio e impossibilitando a transformação dos ácidos graxos insaturados em aldeídos (FREITAS, 2007).

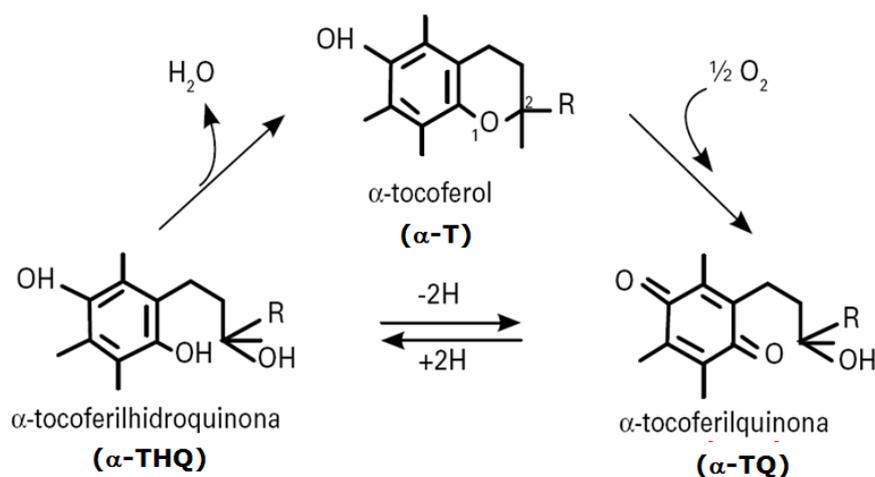
Pesquisas revelam que dietas a base de alimentos ricos em vitamina E, podem ajudar a combater o mal de Alzheimer (TAIPINA, 2009), na prevenção de danos fotooxidativos (ROPKE *et al.*, 2003), utilização em veículos cosméticos associados com filtros solares (SASSON, 2006), condimentos com função antioxidante em produtos cárneos (MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2007), atuando ainda na função cognitiva (GUIMARÃES e VIANNA, 2009) e avaliador de níveis séricos de animais (REIS *et al.*, 2007).

### 3.5.3. Mecanismo de ação do $\alpha$ -tocoferol nas reações de oxiredução

Os tocoferóis atuam como doadores de hidrogênio, interrompendo a cadeia de reações, pois o radical tocoferoxil formado não apresenta reatividade sobre a estrutura lipídica. Esse papel antioxidante é desempenhado de forma única, uma vez que interage com o ambiente

lipídico de maneira acentuada devido a sua característica lipofílica. Além disso, a estrutura da vitamina E está localizada entre os componentes da membrana celular e assim, é uma das responsáveis pela linha de defesa primária das células contra o ataque dos radicais livres. Possui ainda, a característica de ser o único antioxidante que tem habilidade de regenerar-se continuamente pela ação da vitamina C (GUINAZI, 2004).

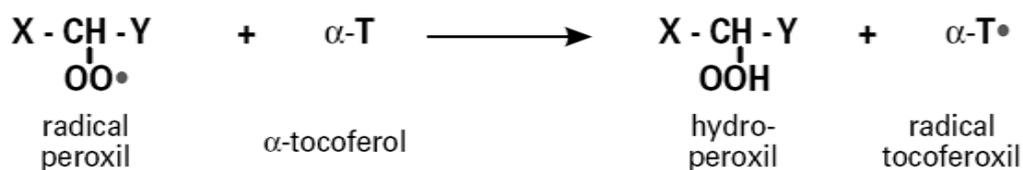
Durante as reações de oxiredução, o núcleo cromano do  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -T) se abre entre o oxigênio 1 e o carbono 2 para formar o  $\alpha$ -tocoferilquinona ( $\alpha$ -TQ). O  $\alpha$ -TQ pode ser reduzido a  $\alpha$ -tocoferilhidroquinona ( $\alpha$ -THQ) que pode por sua vez regenerar o  $\alpha$ -T por desidratação, de acordo com a Figura 3.8.



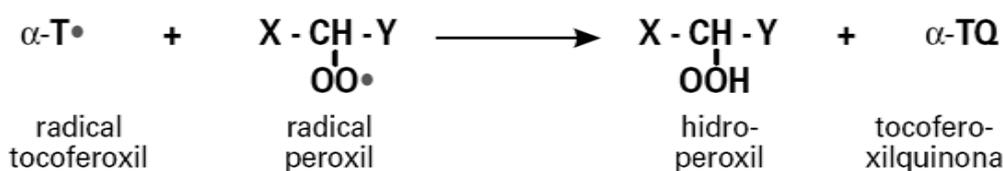
**Figura 3.8.** Mecanismo de ação do  $\alpha$ -tocoferol nas reações de oxiredução.

O principal mecanismo de ação da vitamina E resulta de suas propriedades antioxidantes.

O tocoferol reage com os radicais peroxil, impedindo a formação de novos radicais livres e interrompendo a reação em cadeia.



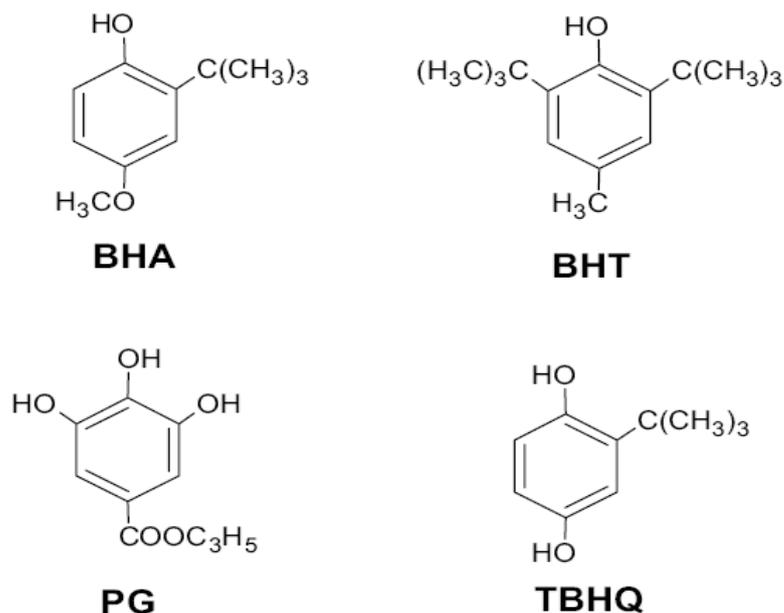
Na qual, o radical tocoferoxil formado ( $\alpha\text{-T}\bullet$ ) é muito instável e reage com um segundo radical peroxil.



#### 3.5.4. Antioxidantes Sintéticos

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria alimentícia são BHA, BHT, PG e TBHQ.

A ação fenólica destes compostos permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula de acilglicerol, e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Entretanto, estes radicais podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação (GODIM, 2009). As estruturas fenólicas dos antioxidantes sintéticos estão ilustradas na Figura 3.9.



**Figura 3.9.** Estruturas fenólicas dos antioxidantes sintéticos

BHT e BHA apresentam propriedades semelhantes, são antioxidantes mais efetivos na supressão da oxidação em gorduras animais que em óleos vegetais. Como a maior parte dos antioxidantes fenólicos, sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais e sementes. Apresentam pouca estabilidade frente a elevadas temperaturas, mas são particularmente efetivos no controle de ácidos graxos de cadeia curta, como aqueles contidos em óleo de coco e palma (GODIM, 2009).

O PG é um éster de 3,4,5 ácido triidroxibenzóico, que apresenta uma concentração ótima de atividade como antioxidante, e quando usado em níveis elevados pode atuar como pró-oxidante.

TBHQ apresenta-se na forma de um pó cristalino branco e brilhoso, moderadamente solúvel em óleo e gorduras, que não se complexa com íons de cobre e ferro, como o galato. É considerado em geral, mais eficaz em óleos vegetais que BHA ou BHT. Em relação a gordura animal, é tão efetivo quanto o BHA e mais efetivo que o BHT ou o PG. O TBHQ também é considerado o melhor antioxidante para óleos de

fritura, pois resiste ao calor e proporciona uma excelente estabilidade para os produtos acabados (RAMALHO *et al.*, 2006).

### **3.6. Métodos para a determinação de $\alpha$ -tocoferol em óleos**

Na tentativa de se encontrar métodos mais eficientes na identificação e quantificação de tocoferóis em matrizes alimentares, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas nas áreas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e da Espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) (SILVA, 2003; SOUSA, 2005; GUINAZI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; MAN *et al.*, 2005;)

Geralmente, as concentrações de tocoferóis são baixas fazendo com que haja a necessidade de pré-concentração das amostras. Uma alternativa para a análise de tocoferóis por cromatografia líquida de alta eficiência dar-se por via direta, que consiste em um método onde a amostra não necessita de uma pré-concentração (saponificação), isto é, somente com a diluição desta em um solvente inerte. Um dos problemas que pode ocorrer nesta técnica é a contaminação do injetor e/ou da coluna cromatográfica. Uma saída seria a limpeza profunda da coluna utilizada para a separação dos componentes estudados (LIMA e GONÇALVES, 1997; CARVALHO, 2007; RAMALHO *et al.*, 2006).

Segundo Paixão e Stamford (2004), a saponificação é um procedimento necessário para o isolamento das vitaminas lipossolúveis encontradas na fração insaponificável dos alimentos. Este processo envolve um rompimento das ligações ésteres na matriz lipoprotéica, com liberação de diversos compostos, tais como, os ácidos graxos na forma de sais; glicerol; fosfolipídios e de outras moléculas encontradas no alimento. Entre as frações insaponificáveis encontram-se os esteróides, carotenóides, colesterol e vitaminas lipossolúveis liberadas em proporções variáveis, dependendo das condições de saponificação e extração. Em

contrapartida, essas vitaminas podem ser destruídas por exposição contínua a algumas condições de saponificação, ou ainda, pela presença de impurezas nos solventes utilizados na extração. Através deste procedimento, as formas esterificadas das vitaminas A e E são convertidas exaustivamente em formas alcoólicas livres.

### **3.7. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE**

A CLAE é um importante membro de toda uma família de técnicas de separação, uma vez que se consegue separar misturas que contêm um grande número de compostos similares. Datam de 1968 os primeiros trabalhos publicados, os quais relataram resultados experimentais comprovando a possibilidade de se utilizar equipamentos, que favorecessem análises de substâncias com maior rapidez, operando com uma fase móvel líquida de alta pressão e obtendo-se resultados satisfatórios (COLLINS *et al.*, 2007).

É usada em casos em que a amostra a ser analisada está em solução, sendo os constituintes a serem separados chamados de solutos. A separação resulta em um equilíbrio de distribuição do soluto entre duas fases: uma fase fixa sólida (fase estacionária), empacotada no interior de uma coluna, e uma fase móvel, que atravessa a fase fixa contida na coluna. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (CIOLA, 1998).

Em geral, se baseia na determinação individual de todos os componentes presentes em uma amostra, através do tempo de retenção em relação à coluna, detector e fases móveis utilizadas. Dependendo da fase móvel usada o tempo de retenção será diferente, pois a interação de

$\alpha$ -tocoferol/ fase, muda de solvente para solvente (SALGADO *et al.*, 2008; RAMALHO *et al.*, 2006; FREITAS, 2007; GUINAZI, 2009; RIOS e PENTEADO, 2003; CARO, 2002; SILVA, 2003; MARTINS, 2006).

Possui inúmeras vantagens em relação aos outros métodos existentes: rapidez, precisão, reprodutibilidade, simplicidade, sensibilidade, menor exposição a agentes externos e separações eficientes (COLLINS *et al.*, 2007)

A CLAE tem superado a cromatografia gasosa (CG) em virtude da grande flexibilidade e aplicabilidade a diferentes matrizes de amostras como produtos farmacêuticos, alimentos, fluídos e tecidos biológicos e tabletes multi-vitamínicos. Isto acontece porque, na CG, requer a derivação da amostra a compostos voláteis como os ésteres trimetilsilil acetato, propionato e trifluoroacetato, fazendo com que estas passem por etapas pré-cromatográficas muito trabalhosas (SILVA, 2003). Por outro lado, a CLAE pode ser executada a temperatura ambiente e sem derivação das amostras (GIACOMINI, 2006).

Em relação à coluna cromatográfica, a fase reversa é preferida pela excelente reprodução do tempo de retenção, rápido equilíbrio e robustez da coluna, além de permitir melhores ajustes para a separação dos interferentes. Na fase reversa os tocotrienóis são eluídos como um grupo antes dos tocoferóis. Quanto aos tocoferóis, o  $\delta$ -tocoferol é eluído primeiro, sendo seguido pelos dimetil substituídos  $\beta$ - e  $\gamma$ -tocoferol que são muito difíceis de serem separados e por último o  $\alpha$ -tocoferol (SILVA, 2003). Tem sido reportado a separação dos homólogos  $\beta$ - e  $\gamma$ -tocoferol em coluna de fase reversa C30 (SCHIEBER *et al.*, 2002), pentafluorofenil (PFPS) e octadecil polivinil álcool (ODPVA) (ABIDI e MOUNTS, 1997; KAMAL-ELDIN *et al.*, 2000).

Para colunas de fase reversa a fase móvel mais empregada é basicamente metanol puro ou misturas de metanol-água contendo até 10% de água (SÁNCHEZ-PÉREZ *et al.*, 2000). Alguns analistas trabalham com misturas de água-acetonitrila-metanol, acetato de etila e clorofórmio, n-hexano e isopropanol, em várias proporções (RIOS e PENEDO, 2003; SOUSA, 2005; LIANG *et al.*, 2011; BOSCHIN e ARNOLD, 2011).

As colunas de fase normal são capazes de separar os isômeros  $\beta$ - e  $\gamma$ -tocoferol e tocotrienóis e apresentam como vantagens a habilidade de trabalharem com solventes orgânicos permitindo uma alta solubilidade de lipídeos, suportarem alta concentração de lipídeos, os quais são facilmente eliminados por solventes não polares, e habilidade de prover ampla faixa de seletividade com o uso de diferentes modificadores polares na fase móvel (SILVA, 2003).

Em coluna de fase normal usualmente são utilizados na separação de compostos tocol eluentes compostos por um alcano como hexano, heptano, iso-octano, com uma pequena quantidade de modificador polar que pode ser um álcool como etanol, metanol, butanol, ou um éter como tetrahidrofurano, metil, *t*-butil, isopropil, ou um clorohidrocarbono como diclorometano, clorofórmio (GUINAZI, 2009; GIMENO *et al.*, 2000; GOTOR *et al.*, 2007; CARO, 2002; SILVA, 2003; PYKA e SLIWIOK, 2001; CHUN *et al.*, 2006; CARVALHO, 2007).

O detector mais utilizado nas determinações de tocoferóis e tocotrienóis é o de fluorescência em virtude da sua maior especificidade (RIOS e PENTEADO, 2003; GOTOR, *et al.*, 2007; GUINAZI, 2009; BOSCHIN e ARNOLD, 2011), embora existam autores que utilizam o detector de UV para a detecção de vitamina E em produtos como óleos, leite e produtos lácteos, carnes, noz, ração, sementes e bebidas (PYKA e SLIWIOK, 2001; SILVA, 2003; SOUSA, 2005; CARVALHO, 2007; LIANG *et al.*, 2011), devido este apresentar-se como um detector multiuso, além de sua praticidade.

Normalmente, a quantificação é feita por padronização externa com uso de curvas de padronização, independente do tipo de coluna ou detector usado, em vários tipos de matrizes, desde alimentos processados ou não, óleos, sementes ou mesmo tecidos e fluídos biológicos (IWASE, 2000; GIMENO *et al.*, 2000; TURNER e MATHIASSEN, 2000; CARLUCCI *et al.*, 2001; BRUNI *et al.*, 2002; SCHIEBER *et al.*, 2002; ESCRIVÁ *et al.*, 2002; SILVA, 2003). Segundo Rupérez *et al.*, (2001) a quantificação também pode ser feita por padronização interna utilizando como padrão interno 5,7 dimetiltocol e o tocol (cromanol desmetilado obtido dos tocoferóis) ou o  $\alpha$ -tocoferol acetato em cromatografia em coluna de fase reversa e o o-hidroxibifenil em coluna de fase normal.

### **3.8. Espectroscopia por infravermelho com transformada de Fourier - FTIR**

A espectrometria é o processo analítico-instrumental baseado nas propriedades de absorção, emissão e reflexão de energia eletromagnética em região específica do espectro (SILVERSTEIN, 2007).

A espectroscopia de infravermelho (IV) compreende a região do espectro eletromagnético de comprimento de onda variando de 0,75 a 1000  $\mu\text{m}$ . A região do infravermelho entre 2,5 e 14,9  $\mu\text{m}$  ( $690\text{ cm}^{-1}$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ ) é a região que concentra o interesse da maioria das pesquisas químicas, embora as regiões do infravermelho próximo (0,75 a 2,5  $\mu\text{m}$ ) e do infravermelho distante (14,9 a 50  $\mu\text{m}$ ) venham ganhando destaque (MILMAN, 2006).

A frequência de cada ligação corresponde a um nível vibracional e depende da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico (SOARES *et al.*, 2006).

O uso de espectroscopia por infravermelho e transformada de Fourier (FTIR) para a quantificação de  $\alpha$ -tocoferol em matrizes alimentares utilizando diversos solventes (MEN *et al.*, 2005; SILVA, 2009; SOARES *et al.*, 2006).

A partir da década de 80 que a técnica de infravermelho vem evoluindo, destacando-se a substituição gradual de espectrômetros dispersivos, por espectrômetros com transformada de Fourier (FTIR) e o desenvolvimento de aplicações nas análises analíticas resultando em espectro com uma melhor resolução na região do infravermelho próximo e distante. Com isso, intensificaram-se os estudos em torno de técnicas mais acessíveis para estudo com substâncias viscosas, onde se inseri a vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) (SOARES *et al.*, 2006).

A criação de vários acessórios viabilizou a aplicação do IV a amostras sólidas, líquidas e gasosas. No entanto, o uso adequado deste equipamento, requer além da prensa hidráulica, a confecção de pastilhas de KBr (brometo de potássio) que pode ser realizada com utilização de molde evacuável, almofariz e pistilo (idealmente de ágata) além de outros acessórios úteis em rotinas de controle de qualidade, tais como, as células desmontáveis para líquidos e materiais viscosos, células seladas para líquidos, células para gases, cartões de amostras, kit para produção de filmes de polímeros, etc (SKOOG, 2002; SOARES *et al.*, 2006; SILVERSTEIN, 2007).

No entanto, existem algumas dificuldades quando se trabalha na análise FTIR com substâncias viscosas, tanto na confecção de pastilhas de KBr, quanto na utilização das pastilhas pré-prontas (pastilhas comerciais, que já estão prontas, apenas a espera da amostra), a ser descritas a seguir:

Geralmente, trabalha-se com duas vertentes: a adição da mistura da amostra a ser analisada diretamente quando se realiza a

maceração do KBr com o objetivo de manter o mais homogêneo possível; ou adicioná-la na pastilha pronta antes da análise, entretanto, existe a possibilidade de que a amostra não se espalhe uniformemente por toda a dimensão da pastilha, fazendo assim, com que análise seja efetuada de maneira errada, evidenciando uma concentração maior ou menor dependendo da localização da gota da amostra (SILVERSTEIN, 2007).

Soares *et.al.*, (2006), realizou um estudo com base na utilização de filme PVC comercial como suporte para substâncias viscosas. As análises foram feitas comparando-se os espectros de amostras de lanolina e vitamina E em filme de PVC e com pastilhas de KBr, bem como dados da literatura. Os resultados comprovaram que o uso de filme de PVC mostrou-se mais efetivo do que as pastilhas de KBr, devido a obtenção de um espalhamento em camadas delgadas das amostras facilitado.

Silva *et al.*, (2009), analisaram em 13 amostras de óleos comerciais (soja, milho e amendoim) e mistura destes em pastilhas de KBr, a presença do  $\alpha$ -tocoferol, utilizando a técnica da FTIR. Os resultados mostraram que o espectro obtido para  $\alpha$ -tocoferol exibiu absorção do esqueleto fenólico em  $1.450\text{ cm}^{-1}$ .

Ahmed *et al.*, (2005), também fizeram um estudo de tocoferóis utilizando a técnica de FTIR, onde puderam observar que a região (modos vibracionais) que melhor absorvia estes analitos era a de  $1500\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ .

### **3.9. Tratamento estatístico – Validação de Metodologia**

A avaliação estatística é um procedimento que determina se um método é cientificamente viável, capaz de fornecer resultados analíticos com precisão e exatidão. O processo de validação não pode ser separado do desenvolvimento de um método, pois o analista não sabe se as condições do mesmo são adequadas até que seja feito o processo de

validação, logo existe um processo iterativo, onde os resultados da validação podem indicar mudanças no procedimento analítico. Os parâmetros de desempenho utilizados na avaliação de um método estão vinculados às especificações requeridas para o mesmo. Entre esses parâmetros estão: a precisão, a exatidão, os limites de detecção e de quantificação do método e a linearidade (LEITE, 2008).

### 3.9.1. Precisão

A precisão de um método é avaliada através do desvio padrão absoluto ( $s$ ) que utiliza um número significativo de medições. Entretanto, na validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto ( $S$ ), dada pela Equação (1).

$$S = \sqrt{\frac{\sum(X - \bar{X})^2}{N - 1}} \quad (1)$$

na qual,  $\bar{X}$  é a média aritmética de um pequeno número de medições (média das determinações),  $X$  é o valor individual de uma medição e  $N$  é o número de medições.

Outra expressão da precisão é através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV) em termos percentuais como mostra a Equação (2).

$$\text{RSD ou CV} = \frac{S}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (2)$$

na qual,  $S$  é o desvio padrão e  $\bar{X}$  é a média das análises

Normalmente, métodos que quantificam compostos em macro quantidades requerem um RSD de 1 a 2%. Em métodos de análise de traços ou impurezas, são aceitos RSD de até 25%, dependendo da complexidade da amostra. Uma maneira simples de melhorar a precisão é aumentar o número de replicatas (MENDHAM *et al.*, 2000).

### 3.9.2. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

O limite de detecção (LD) corresponde à menor quantidade de um analito detectada. Na prática, é determinado como a menor concentração do analito a qual pode ser diferenciada do ruído do sistema, com segurança (SKOOG *et al.*, 2002).

Segundo Ribani *et al.*, (2004), o LD pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica, que serão descritos a seguir:

- **Método visual** – É utilizado para determinar o limite de detecção utilizando a matriz com adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de tal modo que se possa distinguir entre ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração visível (detectável). Este procedimento também pode ser feito através do instrumento utilizando parâmetros de detecção no método de integração.
- **Método da relação sinal-ruído** – Este método pode ser aplicado somente em procedimentos analíticos que mostram o ruído da linha de base. Para determinar a relação sinal-ruído, é feita a comparação entre a medição dos sinais de amostras em baixas concentrações conhecidas do composto de interesse da matriz e um branco (matriz isenta do composto de interesse) destas amostras. Assim, é estabelecida uma concentração mínima na qual a substância pode ser facilmente

detectada. A relação sinal-ruído pode ser 3:1 ou 2:1, proporções geralmente aceitas como estimativas do limite de detecção.

- **Método baseado em parâmetros da curva analítica**– O limite de detecção (LD) pode ser expresso, segundo a Equação (3).

$$LD = 3,3 \cdot \frac{s}{S} \quad (3)$$

na qual,  $s$  é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação e  $S$  é a inclinação ("slope") ou coeficiente angular da curva analítica.

Já o limite de quantificação (LQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com confiabilidade determinada (MILLER e MILER, 1993). O limite de quantificação também pode ser baseado em parâmetros da curva analítica, através da Equação (4).

$$LQ = \frac{10 \cdot s}{b} \quad (4)$$

na qual,  $s$  é o desvio padrão das concentrações do padrão de  $\alpha$ -tocoferol e  $b$  o valor do coeficiente angular da curva analítica.

### 3.9.3. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. A exatidão pode ser calculada como porcentagem de recuperação de uma quantidade conhecida do analito adicionado à

amostra, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito (LEITE, 2008).

A exatidão que é expressa pelos ensaios de recuperação é a relação entre a concentração média determinada experimentalmente ( $C_{ME}$ ) e a concentração teórica experimental correspondente ( $C_T$ ), conforme a Equação (5).

$$\text{Exatidão} = \frac{C_{ME} \cdot 100}{C_T} \quad (5)$$

#### 3.9.4. Repetitividade

A repetitividade representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetitividade. Sendo mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local, repetições em curto intervalo de tempo.

#### 3.9.5. Reprodutibilidade

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuada sob condições variadas (mudança de operador, laboratório, equipamentos, etc.).

#### 3.9.6. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada faixa de aplicação (ARAGÃO *et al.*, 2009). A linearidade do método pode ser determinada a partir da relação

matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa da espécie de interesse, geralmente obtida por uma equação de reta  $y = ax + b$ , chamada de curva analítica. Os coeficientes  $a$  e  $b$  da curva analítica podem ser estimados a partir de um conjunto de medições experimentais usando o método matemático conhecido como regressão linear. Além destes, calcula-se o coeficiente de correlação  $r$  ou o coeficiente de determinação  $R^2$ , que são parâmetros que permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90.

# **CAPÍTULO 4**

---

**PROCEDIMIENTO**

**EXPERIMENTAL**

---

## **4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **4.1. Equipamentos e acessórios**

#### 4.1.1. Equipamentos

- Balança analítica (Shimadzu);
- Agitador magnético (FANEM);
- Manta aquecedora (FANEM);
- Analisador térmico modelo SDT 2960, marca TA Instruments;
- Analisador térmico DSC 2920, marca TA Instruments;
- Cromatografo Líquido – modelo (Shimadzu), com detector (UV-SPD 20A - Shimadzu), com software LC Solution;
- Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) - (Shimadzu), modelo IRPrestige, com software IRSolution IR.

#### 4.1.2. Acessórios

- Coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (5 $\mu$ m x 4,6 mm x 150 mm) com fase estacionária octadecil e uma coluna de guarda CLC-GODS com fase estacionária de superfície octadecil - Shimadzu;
- Membranas filtrantes de difluoreto de polivinileno (PVDF – Millipore), com 13 mm de diâmetro com 0,45  $\mu$ m de tamanho de poro;

### **4.2. Reagentes**

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e / ou grau cromatográfico, sendo estes:

Álcool Etílico Absoluto (Quimex); Fenolftaleína; Tetracloreto de carbono (Vetec); Solução de Wijis (Vetec); Ácido acético glacial (Vetec); Iodeto de Potássio (Vetec); Tiosulfato de sódio (Vetec); Hidróxido de potássio

(Vetec); Ácido clorídrico (Quimex); Carvão ativado (CHEMCO) com granulometria de 325 mesh; Padrão de  $\alpha$ -tocoferol ( $\geq 96\%$  HPLC – Sigma Aldrich); Metanol grau HPLC (Carlo Erba Reagenti); Acetonitrila grau HPLC (Carlo Erba Reagenti); N-propanol grau HPLC (Carlo Erba Reagenti); Clorofórmio grau HPLC (Merck); Hexano grau HPLC (Carlo Erba Reagenti); Heptano grau HPLC (Carlo Erba Reagenti);

### **4.3. Coleta e armazenagem de amostras**

As amostras do óleo bruto de babaçu, assim como, as etapas de refino (neutralização e clarificação) foram cedidas pela empresa Oleaginosas do Maranhão (OLEAMA), sendo armazenadas sob refrigeração ( $\approx 4^{\circ}\text{C}$ ) por um período de até 25 dias, no Laboratório Núcleo de Biodiesel (NuBIO-UFMA), para posterior análise.

### **4.4. Cuidados ao manipular $\alpha$ -tocoferol**

Devido à alta sensibilidade do  $\alpha$ -tocoferol à luz e à oxidação, foram tomadas algumas medidas operacionais de precaução: todas as atividades operacionais foram realizadas sob condições reduzidas de exposição à luz, utilizando vidrarias protegidas por papel alumínio, evitando exposição prolongada ao ar, sendo as soluções padrões preparadas e injetadas no mesmo dia das análises por CLAE e / ou FTIR.

### **4.5. Caracterização físico-química do óleo bruto de babaçu**

Com o objetivo de se avaliar a qualidade do óleo bruto de babaçu, fez-se necessário caracterizá-lo físico-quimicamente, para que se pudesse dar início ao processo do refino em bancada.

Para as análises físico-químicas realizadas neste trabalho adotaram-se os métodos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 1985).

#### 4.5.1. Índice de acidez (325/IV-IAL)

Na determinação do índice de acidez, foram pesados 2,0 g da amostra e adicionou-se 25,0 mL de solução de éter-álcool (2:1), neutra. A seguir, adicionou-se 2,0 gotas do indicador fenolftaleína. Titulou-se com solução de hidróxido de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> até coloração rósea. Fez-se um branco.

O cálculo do índice de acidez foi feito pela Equação (6):

$$Ia = \frac{V \cdot f \cdot N \cdot PM}{10 \cdot p} \quad (6)$$

na qual, **Ia** é o índice de acidez; **V** é o volume (mL) de solução de hidróxido de potássio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> gasto na titulação da amostra pela diferença do gasto na titulação com o branco; **N** é a concentração da solução de KOH usada na titulação; **f** é o fator da solução de hidróxido de potássio; **PM** é o peso molecular do ácido graxo em maior proporção (no óleo de babaçu é o ácido láurico = 200); **P** é a massa(gramas) da amostra.

#### 4.5.2. Índice de iodo (329/IV-IAL)

Na determinação do índice de iodo, pesou-se 0,25g da amostra, adicionou-se 10,0mL de tetracloreto de carbono. A seguir acrescentou-se 20,0 mL da solução de Wijs (que consiste de uma solução de cloreto de iodo (ICl) em ácido acético glacial, com concentração de 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, podendo ser obtida através da dissolução de aproximadamente 13,0 g de iodo (I<sub>2</sub>) em 1,0 litro de ácido acético glacial, seguida da inserção de gás

cloro seco ( $\text{Cl}_2$ ), na solução (ASTMD 5554-95(06)), ou pela solubilização direta de aproximadamente 8,0 g de tricloreto de iodo e 9,0 g de iodo ( $\text{I}_2$ ) em um 1,0 litro de ácido acético glacial (DIN 53241-1)), sendo cuidadosamente agitado por rotação mecânica. Deixou-se em repouso por 30 minutos ao abrigo da luz e à temperatura de aproximadamente 25° C. Adicionou-se 10,0 mL da solução de iodeto de potássio a 15 % e 100,0 mL de água. Titulou-se esta solução com tiosulfato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, adicionando-o lentamente (gota a gota) e, com agitação constante, até uma fraca coloração amarela. Adicionou-se então 1,0 a 2,0 mL da solução de amido (indicador) e continuou-se a titulação até que cor azul desaparecesse. Preparou-se uma determinação em branco, para cada grupo de amostras.

O cálculo do índice de iodo foi feito pela Equação (7):

$$Ii = \frac{(B - A) \cdot f \cdot 1,27}{p} \quad (7)$$

na qual, **Ii** é o índice de iodo; **A** é o volume (mL) de solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, gasto na titulação do branco; **B** é o volume (mL) de solução de tiosulfato de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> gasto na titulação da amostra; **f** é o fator da solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e **P** é a massa (gramas) da amostra.

#### 4.5.3. Índice de saponificação (328/IV-IAL)

Na determinação do índice de saponificação pesou-se 2,0 g da amostra e adicionou-se, 20,0 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio (4%) em sistema de refluxo. Aqueceu-se até ebulição branda, durante 30 minutos, reduziu-se a temperatura e adicionou-se 2,0 gotas de indicador fenolftaleína. Titulou-se com ácido clorídrico 0,5 mol.L<sup>-1</sup> até que a coloração rósea desaparecesse. Foi feito uma prova em branco,

transferindo um volume de 20,0 mL da solução alcoólica de hidróxido de potássio (4%). Adaptou-se, ao frasco, um sistema de refluxo e aqueceu-se até ebulição durante 30 minutos. Resfriou-se a temperatura ambiente e adicionou-se 2,0 gotas de indicador fenolftaleína e titulou-se com ácido clorídrico 0,5 mol.L<sup>-1</sup>. A diferença entre os volumes (mL) do ácido clorídrico gastos nas duas titulações é equivalente à quantidade de hidróxido de potássio gasto na saponificação.

O cálculo do índice de saponificação foi feito pela Equação (8):

$$I_s = \frac{V \cdot f \cdot 28}{p} \quad (8)$$

na qual, **I<sub>s</sub>** é o índice de saponificação; **V** é a diferença entre os volume sem mL de ácido clorídrico 0,5 mol.L<sup>-1</sup> gastos; **f** é o fator da solução de ácido clorídrico 0,5 mol.L<sup>-1</sup> e **P** é amassa(gramas) da amostra.

#### 4.5.4. Índice de peróxido (326/IV-IAL)

Na determinação do índice de peróxido pesou-se 5,0 g da amostra e adicionou-se 25,0 mL da solução, ácido acético-clorofórmio (3:2), e agitou-se até a dissolução da amostra. Em seguida acrescentou-se 1,0 mL da solução saturada de Iodeto de Potássio (KI). Fechou-se o erlenmeyer e agitou-se, sendo então deixado em repouso por 5 minutos, em ambiente não iluminado. Juntou-se a seguir 75,0 mL de água destilada recentemente fervida e resfriada. Agitou-se com cuidado (no início foi agitando lentamente e ao mesmo tempo levantou-se um pouco a tampa para evitar a pressão no interior do erlenmeyer). Juntou-se 2,0 mL de solução indicadora de amido 1%, homogeneizou-se e titulou-se com a solução de tiosulfato de sódio 0,01 mol.L<sup>-1</sup>, com constante agitação. Continuou-se a titulação até que a coloração azul tenha desaparecido.

O cálculo do índice de peróxido foi feito pela Equação (9):

$$IP = \frac{(A - B) \cdot N \cdot f \cdot 1000}{p} \quad (9)$$

na qual, **IP** é o índice de peróxido; **B** é o volume (mL) de solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, gasto na titulação do branco; **A** é o volume (mL) de solução de tiosulfato de 0,1 mol.L<sup>-1</sup> gasto na titulação da amostra; **N** é a normalidade da solução de tiosulfato de sódio; **f** é o fator da solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol.L<sup>-1</sup> e **P** é amassa(gramas) da amostra.

#### 4.5.5. Umidade (334/IV-IAL)

Para a determinação da umidade, pesou-se 5,0 g de cada amostra em cápsulas de porcelana de 50,0 mL previamente aquecida em estufa a 105° C, por 1 hora, resfriada em dessecador até a temperatura ambiente e devidamente pesada. Essas operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas até que se obteve peso constante.

O cálculo da umidade foi feito pela Equação (10):

$$\text{Umidade a } 105 \text{ }^\circ\text{C por cento } p / p = \frac{100 \cdot N}{P} \quad (10)$$

na qual, **N** é a massa (gramas) de umidade e **P** é a massa(gramas) de amostra.

#### 4.5.6. Densidade (337/IV-IAL)

Na determinação da densidade, inicialmente pesou-se o picnômetro devidamente seco e vazio, anotando-se o valor. A seguir, adicionou-se a

amostra cuidadosamente pelas paredes deste para que se pudesse prevenir a formação de bolhas de ar enchendo-o até a borda, colocando-se a tampa, limpou-se o excesso da amostra que transbordou pelas paredes com papel toalha. Pesou-se com a amostra. Repetiu-se este procedimento para todas as amostras.

O cálculo da densidade foi feito pela Equação (11):

$$D = \frac{A - B}{C} \quad (11)$$

na qual, **D** é a Densidade; **A** é a massa (gramas) do recipiente contendo óleo; **B** é a massa (gramas) do recipiente vazio e **C** é a massa (gramas) da água à temperatura de 25°C.

## **4.6. Análise Térmica**

### 4.6.1. Termogravimetria (TG)

As curvas termogravimétricas TG/DTG dinâmicas foram obtidas em um analisador térmico modelo SDT 2960, marca TA Instruments, com o objetivo de se determinar o perfil de decomposição térmica do óleo bruto de babaçu.

Para tanto, utilizou-se aproximadamente 10,0mg de amostra, com razão de aquecimento de 10 °C.min<sup>-1</sup> sob intervalo de temperatura de 25 – 600°C, em atmosferas de ar sintético e nitrogênio com fluxo de gás de 100,0 mL.min<sup>-1</sup> para o óleo bruto de babaçu.

### 4.6.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC foram obtidas em condições não isotérmicas em um analisador térmico DSC 2920, marca TA Instruments, para avaliar as

transições entálpicas. Para tanto, utilizou-se aproximadamente 10,0 mg de amostra, no intervalo de 25–600°C sob atmosfera de ar sintético com fluxo de gás de 100,0 mL.min<sup>-1</sup>.

#### **4.7. Etapas do refino do óleo bruto de babaçu**

##### 4.7.1. Neutralização

Pesou-se 100,0 g do óleo bruto de babaçu em um becker, adicionou-se com auxílio de uma bureta a solução de 15 % de NaOH, gota a gota, com agitação vigorosa por 30 minutos à temperatura ambiente, para facilitar o contato entre as duas fases. A seguir, cessou-se a agitação e aumentou-se a temperatura numa chapa de aquecimento para 65°C para quebrar a emulsão, deixou-se esfriar em repouso por algumas horas, até que se observasse a separação do sabão formado, ou usualmente denominado de “borra”. Logo após, filtrou-se com um auxílio de funil de vidro e papel de filtro o óleo e suas borras espessas, para um Becker limpo e higienizado. Após todo óleo neutralizado ser filtrado, realizou-se um novo teste de acidez, para se verificar o decaimento do mesmo. Para o caso em estudo, a neutralização por si só fez a acidez baixar, não sendo necessário realizar as lavagens (3 a 4 vezes) com proporções de água fervente, deixando a carga em repouso para cada lavagem por cerca de 30 minutos.

##### 4.7.2. Branqueamento e / ou Clarificação

O processo de branqueamento do óleo se deu com a adição de carvão ativado, marca CHEMCO e com granulometria 325 mesh. Para tanto, este foi seco em estufa por 48 horas à 130°C. Sendo aplicado ao óleo numa proporção de 10:1, por um tempo de 20 minutos, sob agitação mecânica constante.

#### 4.7.3. Filtração

A filtração do óleo branqueado (clarificado) foi realizada através de dois papéis de filtros, por aproximadamente 2 horas.

Vale pontuar que, a última etapa do refino, a desodorização, não foi realizada, devido esta ser submetida a altas temperaturas e pressões reduzidas, o que já contribuiria para a degradação total do  $\alpha$ -tocoferol no óleo.

### **4.8. Análises de $\alpha$ -tocoferol**

#### 4.8.1. Identificação e Quantificação do $\alpha$ -tocoferol por CLAE

Após a caracterização preliminar do óleo bruto, seguindo as normas do Instituto Adolfo Lutz (IAL), das análises térmicas e das etapas de refino em bancada, este foi submetido às análises cromatográficas.

##### 4.8.1.1. Preparo da solução estoque de $\alpha$ -tocoferol ( $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ )

Foram adotadas as recomendações do Jornal Oficial da União Européia (2006), específica para análises de tocoferóis (Vitamina E). Assim, pesou-se 0,1041 g do padrão de  $\alpha$ -tocoferol ( $\geq 96\%$  HPLC – Sigma Aldrich), e dissolveu-se em 79,0 g de etanol (99 % P.A-Vetec; densidade  $0,789 \text{ g cm}^{-3}$ ) em um balão volumétrico de 100,0mL.

##### 4.8.1.2. Preparo da solução padrão de trabalho de $\alpha$ -tocoferol( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ )

Retirou-se uma alíquota de 5,0 mL da solução estoque de  $\alpha$ -tocoferol e transferiu-se para um balão de 50,0 mL, sendo esta dissolvida em metanol grau HPLC (Carlo Erba).

Soluções padrões com concentrações de  $\alpha$ -tocoferol de 0,1; 0,5; 1,5; 2,5; 5,0 e 10 mg.L<sup>-1</sup> foram preparadas para construção da curva analítica, utilizada para quantificação deste, partindo-se de uma solução de trabalho de 100 mg.L<sup>-1</sup>.

#### 4.8.1.3. Preparação das amostras do óleo bruto e das etapas de refino para as análises cromatográficas

Pesou-se 0,1 g do óleo de babaçu bruto e das demais etapas do refino, e diluiu-se em 2,0 mL de 2-propanol grau HPLC (Carlo Erba), filtrou-se (com unidades filtrantes de difluoreto de polivinilideno (PVDF) – 13 mm de diâmetro e com 0,45  $\mu$ m de tamanho de poro (Milipore)). O cromatograma foi integrado para fornecer a área de cada pico presente, e o valor da área foi interpolado na curva analítica, fornecendo desta maneira um valor de concentração.

#### 4.8.2. Equipamentos e condições operacionais – CLAE

As análises de  $\alpha$ -tocoferol foram realizadas através do software LC-Solution. Para as separações utilizou-se uma coluna de fase reversa RP-18 CLC-ODS (150 mm X 4,6 mm, 5 $\mu$ m) com fase estacionária octadecil e uma coluna-guarda CLC-GODS com fase estacionária de superfície octadecil, à temperatura ambiente, tendo como fase móvel uma mistura de metanol e acetonitrila (1:1) caracterizando uma cromatografia de fase reversa.

A detecção do  $\alpha$ -tocoferol foi realizada num comprimento de onda 292 nm. As injeções foram realizadas em um loop de 20 $\mu$ L e o fluxo da fase móvel foi de 1,5 mL.min<sup>-1</sup>.

Todos os solventes utilizados como fase móvel, foram devidamente filtrados com membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) com 0,45  $\mu$ m (Milipore), assim como as soluções padrões e

amostras em unidades filtrantes do mesmo composto com 13 mm de diâmetro e com 0,45  $\mu\text{m}$  (Milipore).

#### **4.9. Análises por Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR**

Objetivando comparar os resultados dos dados experimentais para a quantificação do  $\alpha$ -tocoferol no óleo bruto de babaçu e nos processos de refino por CLAE, optou-se pelas análises das mesmas amostras por FTIR.

Para estas análises, foi utilizada uma cela para líquidos de caminho óptico de 0,1 mm com janela de KBr. A faixa de frequência da radiação eletromagnética empregada foi de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ , sendo aplicados: números de scans: 25; resolução: 8.0  $\text{cm}^{-1}$ ; apodização: *bessel* e solvente: clorofórmio (grau HPLC). É importante mencionar que dentre as várias maneiras de apodização explorada, esta foi a que se mostrou para este estudo com melhor resolução.

Para a construção da curva de calibração por FTIR, preparou-se uma solução estoque, pesando-se 0,0104 g do padrão de  $\alpha$ -tocoferol, diluindo-o em 148,0 g de clorofórmio (grau HPLC; densidade igual a 1,480  $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) e transferindo-se esta solução para um balão volumétrico de 100,0 mL. Com base nessa solução, realizaram-se as diluições com concentrações: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 e 4,5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para obtenção da curva analítica.

As amostras de cada etapa do refino foram preparadas, diluindo-se 5,0  $\mu\text{L}$  do óleo e/ ou amostras de refino em 10,0 mL de clorofórmio, fortificadas com o padrão de  $\alpha$ -tocoferol, para garantir a presença da banda correspondente ao anel fenólico, conforme descreve Men *et al.*, (2005).

#### 4.10. Tratamento estatístico– Validação da Metodologia

Após verificar-se qual dos métodos aqui propostos ofereceu os melhores resultados, o mesmo foi validado, através da precisão (repetitividade), exatidão, limite de detecção e quantificação, linearidade.

##### 4.10.1. Precisão (Repetitividade)

Neste trabalho o estudo da precisão do método se deu através da repetitividade através da análise cromatográfica de uma amostra do óleo fortificada com concentrações de  $\alpha$ -tocoferol (0,1; 1,5 e 10 mg.L<sup>-1</sup> correspondente a menor, média e maior concentração utilizada para a construção da curva analítica), onde cada análise foi realizada em triplicata. Sendo avaliada através da estimativa do desvio padrão (s) e do coeficiente de variação (CV %).

##### 4.10.2. Exatidão

A exatidão do método foi calculada através do índice de recuperação (**R**) do  $\alpha$ -tocoferol. Para calcular este valor, utilizou-se amostras fortificadas com soluções padrões nas concentrações de 1,5 mg.L<sup>-1</sup> e 10,0 mg.L<sup>-1</sup> referentes a média e a maior concentração utilizadas na curva analítica.

##### 4.10.3. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação do método foram calculados empregando-se o método baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2004). Neste método, o limite de detecção (LD) foi calculado utilizando-se a equação (3).

Os mesmos critérios de LD podem ser adotados para o LQ, utilizando a relação 10:1, ou seja, o LQ pode ser calculado a partir da Equação (4).

No entanto, para calcular este parâmetro, obteve-se uma curva analítica com soluções de trabalho, na faixa de concentração de 0,1 – 10,0 mg.L<sup>-1</sup>(n = 6 pontos) para  $\alpha$ -tocoferol (descrito no item: 4.8.1.2.), que também serviu de parâmetro para a obtenção da linearidade.

#### 4.10.4. Linearidade

A avaliação da linearidade foi obtida através da curva analítica de soluções de trabalho, conforme descrito no item 4.8.1.2.

# **CAPÍTULO 5**

---

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Características físico-químicas do óleo bruto de babaçu

Encontram-se na Tabela 5.1, os resultados das características físico-químicas do óleo bruto de babaçu coletado na Empresa Oleaginosa Maranhense S/A (OLEAMA), analisado no Laboratório de Biodiesel (NuBio-UFMA), sendo comparado com dados da literatura.

**Tabela 5.1.** Caracterizações físico-químicas do óleo bruto de babaçu

Características físico-químicas	Óleo bruto de babaçu	CODEX STAND 210 1999	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2007
Índice de acidez (mgKOH/g)	3,75 ± 0,05	Max. 5%	3,31 – 3,38
Índice de Peróxido (meq O <sub>2</sub> /kg)	0,40 ± 0,03	-	0,0
Umidade (%)	0,17 ± 0,05	-	-
Índice de Iodo (Wijs)	17,03 ± 0,05	10-18	-
Índice de Saponificação (mgKOH/g)	189,8 ± 0,01	245-246	164 – 252
Densidade relativa a 25° C (g/mL)	0,914 ± 0,03	0,914-0,917	0,918-0,924

É de fundamental importância o conhecimento das características físico-químicas da matriz a ser estudada para que se possa avaliar seu estado de conservação. O índice de acidez e o índice de peróxido são descritos como parâmetros referenciais para determinar esta qualidade em óleos e gorduras (FERREIRA, 2006), uma vez que indicam a presença da rancidez hidrolítica e oxidativa respectivamente (FERREIRA, 2008). O índice de saponificação e densidade relativa estão relacionados apenas com as características específicas de cada óleo vegetal, como comprimento de cadeias e números de insaturações (MORETTO e FETT, 1998).

Para o índice de acidez, índice de iodo e a densidade relativa os resultados encontrados estão dentro dos intervalos reportados na literatura, com exceção do índice de saponificação que ficou abaixo do esperado (CODEX, 1999), entretanto, Oliveira *et. al.* (2007), também

encontraram valores abaixo do estabelecido pelo CODEX (1999). Estes pesquisadores atribuíram este resultado ser uma característica própria de cada óleo a ser estudado, o que se costuma chamar de “efeito matriz” (regionalidade e sazonalidade da matéria-prima), pois, geralmente este índice nos óleos vegetais pode ser influenciado por fatores referentes a origem e a forma de cultivo da oleaginosa, tais como: tipo de solo, clima e período de frutificação que poderiam ser determinantes em diferenças e constituição dos frutos, além do tempo que o óleo é submetido ao processo de saponificação (OLIVEIRA, 2007).

Para o índice de peróxido e umidade, não foi encontrada nenhuma citação nas literaturas pesquisadas, para o óleo bruto de babaçu, apenas para o refinado, supondo-se ser este valor característico para o óleo em estudo.

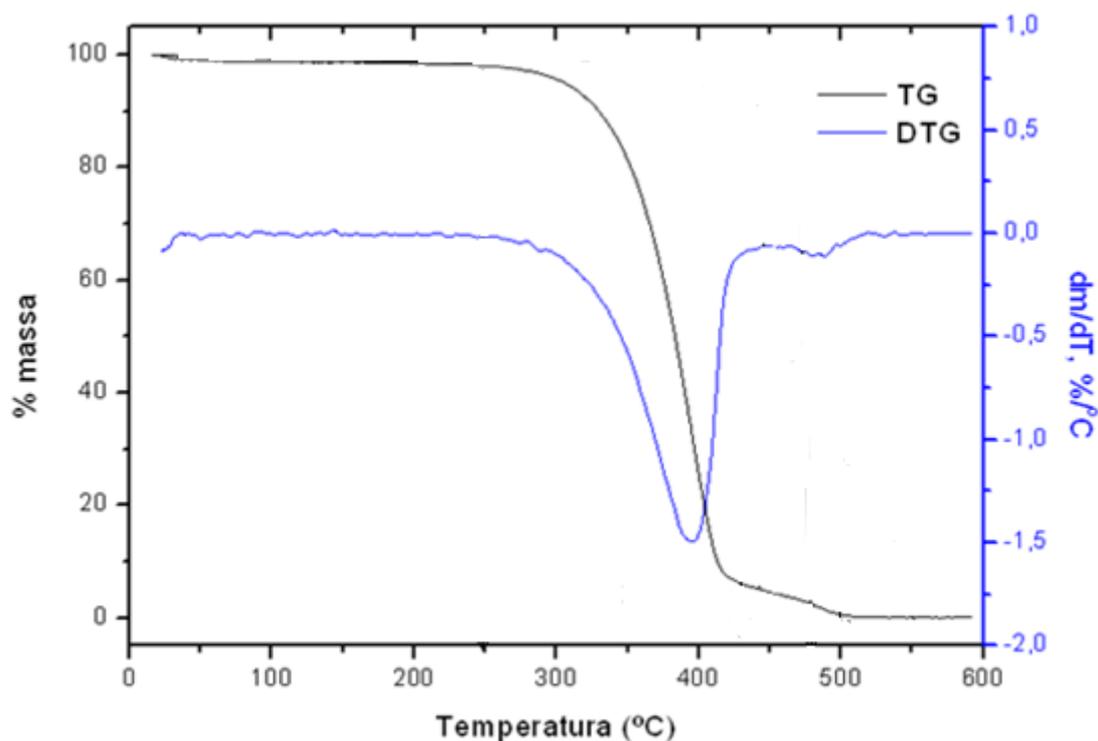
## **5.2. Estudo da degradação do óleo de babaçu – Análise Térmica**

Com o objetivo de avaliar a estabilidade termoxidativa do óleo de babaçu, foi utilizada a técnica de termogravimetria.

A termogravimetria (TG) é uma técnica amplamente utilizada para verificar a estabilidade térmica de um material e sua pré-disposição à oxidação. Sendo, portanto o resultado de uma transformação física (sublimação, evaporação e condensação) ou química (degradação em função do tempo e da temperatura), pois ao sofrer um aquecimento contínuo e sob atmosfera controlada, perde massa, sob forma de produtos voláteis que é ilustrada pela curva de decomposição térmica (LUCAS *et al.*, 2001).

Já a termogravimetria derivada (DTG) é a derivada da variação da massa em relação ao tempo ou temperatura da curva de TG. Esta técnica auxilia na visualização e esclarecimentos de eventos que ocorrem

na curva de TG. É proporcional ao total de massa perdida pela amostra, além de possibilitar a determinação da temperatura do pico, e a temperatura inicial e final do processo (SILVEIRA *et al.*, 2005). Os resultados estão demonstrados na Figura 5.1.



**Figura 5.1.** Curvas TG e DTG do óleo bruto de babaçu

As curvas TG/DTG, indicam que o óleo bruto de babaçu é termicamente estável até 250 °C encontra-se na média das temperaturas de decomposição dos outros óleos (por exemplo: soja, girassol, coco) (FARIA, 2002). Sua decomposição ocorre em duas etapas distintas, na qual a primeira perda de massa (94,2%) ocorre entre 250 e 490 °C, sendo atribuída a decomposição e a carbonização dos triglicerídeos no óleo. Por outro lado, a segunda etapa de decomposição ocorre entre 400 e 500 °C, com perda de massa de 5,3%, alusivo ao processo de carbonização dos produtos de decomposição anteriormente gerados. (SANTOS, 2009). A estabilidade térmica dos óleos depende de sua estrutura química: óleos com ácidos graxos saturados são mais estáveis do que os insaturados.

É importante ressaltar que a utilização de ar sintético ao experimento foi para reproduzir as condições industriais.

Após as análises físico-químicas e análises térmicas do óleo bruto de babaçu para que se pudessem avaliar suas características com relação ao seu estado de conservação, este foi submetido às primeiras etapas de refino (neutralização e clarificação), para que se pudesse avaliar por CLAE e por FTIR a redução do teor de  $\alpha$ -tocoferol nessas amostras.

### **5.3. Identificação e quantificação do $\alpha$ -tocoferol nas amostras de óleo bruto e refinado de babaçu**

#### 5.3.1. Método proposto por CLAE

Como as amostras de óleo exibem alta viscosidade, estas não podem ser diretamente injetadas no equipamento cromatográfico para serem analisadas. Assim, as mesmas tiveram que ser diluídas em 2-propanol. Segundo Swiglo e Sikorska (2004), o 2-propanol funciona como um solvente inerte, pois não interfere nas análises, isto porque o óleo apresenta boa solubilidade neste, além de ser miscível com praticamente todos os solventes utilizados em cromatografia líquida. Desta maneira, não houve a necessidade das amostras receberem um tratamento prévio antes das análises cromatográficas, haja vista que na saponificação o tempo de análise é muito maior, o que acaba contribuindo para perdas significativas de tocoferóis, especificamente do  $\alpha$ -tocoferol.

Utilizou-se as condições cromatográficas do estudo de Swiglo e Sikorska (2004), com algumas modificações. A Tabela 5.2 demonstra estes parâmetros.

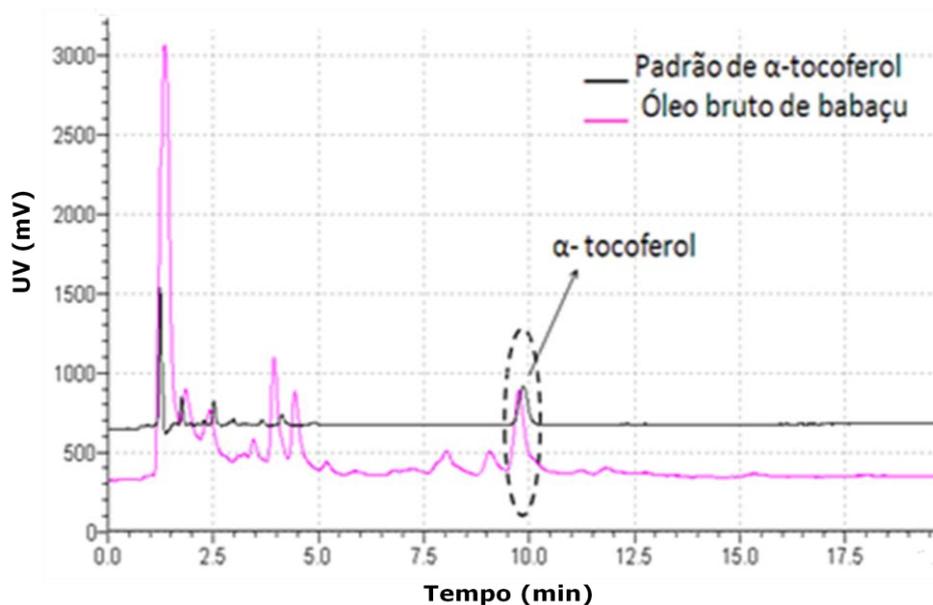
**Tabela 5.2.** Comparação das condições operacionais para determinação de  $\alpha$ -tocoferol em óleo vegetal.

<b>Método proposto por SWIGLO e SIKORSKA (2004)</b>	<b>Método proposto por este trabalho</b>
<b>Coluna analítica:</b> C <sub>18</sub> (150 mm X 3,9 mm, 5 $\mu$ )	<b>Coluna analítica:</b> C <sub>18</sub> (150 mm X 4,6 mm, 5 $\mu$ )
<b>Temperatura da coluna:</b> n.d*	<b>Temperatura da coluna:</b> ambiente
<b>Fase móvel:</b> Acetonitrila / Metanol (1:1)	<b>Fase móvel:</b> Acetonitrila / Metanol (1:1)
<b>Detector:</b> Fluorescência	<b>Detector:</b> UV / Vis
<b>Comprimento de onda:</b> emissão 325 nm com excitação em 295 nm	<b>Comprimento de onda:</b> 292 nm
<b>Fluxo:</b> 1,0 mL / min	<b>Fluxo:</b> 1,5 mL / min
<b>Volume de Injeção:</b> 20 $\mu$ L	<b>Volume de Injeção:</b> 20 $\mu$ L
<b>Solvente utilizado no preparo de amostras:</b> 2-propanol	<b>Solvente utilizado no preparo de amostras:</b> 2-propanol
<b>Modo:</b> Isocrático	<b>Modo:</b> Isocrático

\* n.d. – não divulgado pelos pesquisadores

Após o estabelecimento das condições operacionais, deu-se início as análises cromatográficas.

Inicialmente, para que se pudesse verificar o comportamento dos tempos de retenção da solução padrão de  $\alpha$ -tocoferol (0,5 mg.L<sup>-1</sup>) frente a amostra de óleo bruto de babaçu, pela análise cromatográfica, realizou-se um teste, fazendo a sobreposição dos cromatogramas de óleo bruto de babaçu e da solução padrão para identificara presença de  $\alpha$ -tocoferol (Figura 5.2).



**Figura 5.2.** Cromatogramas sobrepostos da solução do padrão de  $\alpha$ -tocoferol ( $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ ) e do óleo bruto de babaçu.

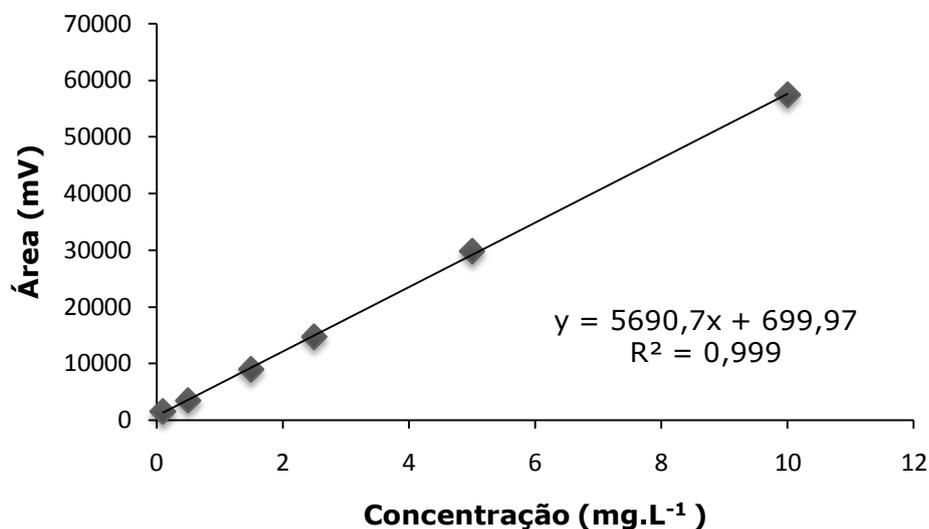
Observa-se no cromatograma referente à sobreposição da solução padrão e do óleo bruto de babaçu (Figura 5.2), uma boa resolução dos picos do analito de interesse, estando em acordo com os resultados encontrados por LINS (2008), em seus estudos para determinação de tocoferóis.

### 5.3.2 Construção da curva de calibração - CLAE

Após verificar-se a boa resolução das análises anteriores, partiu-se para a construção da curva de calibração do  $\alpha$ -tocoferol.

Para a quantificação de  $\alpha$ -tocoferol utilizou-se da curva analítica. A construção desta foi feita através da injeção, em triplicata, de concentrações crescentes de soluções padrão (entre  $0,1$  a  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ , totalizando 6 pontos). Desse modo, foi feita uma correlação linear entre as áreas dos picos e as concentrações injetadas (Figura 5.3). A equação da regressão linear obtida foi utilizada para quantificar o conteúdo de  $\alpha$ -

tocoferol nas amostras de óleo de babaçu. E na Tabela 5.3, encontram-se os dados da curva analítica.



**Figura 5.3.** Curva analítica para  $\alpha$ -tocoferol - CLAE

**Tabela 5.3.** Dados da curva analítica de  $\alpha$ -tocoferol - CLAE

Concentração (mg.L <sup>-1</sup> )	Média das Áreas* (mV)	Desvio Padrão (s)	Coefficiente de Variação (CV %)
0,1	1487,60 ± 0,203	0,100	0,006722
0,5	3439,70 ± 0,404	0,100	0,002907
1,5	8948,63 ± 0,620	0,305	0,003414
2,5	14688,63 ± 0,310	0,057	0,000393
5,0	29767,33 ± 2,343	2,309	0,007758
10,0	57406,00 ± 4,058	3,000	0,005226

\*Média de três injeções

O modelo de regressão linear para  $\alpha$ -tocoferol pelo método cromatográfico proposto pode ser expresso por:  $y = 5690,7x + 699,97$ .

Utilizou-se a análise da variância (ANOVA) para averiguar se o modelo de regressão linear estava realmente ajustado, através dos cálculos da razão das médias quadráticas. As regressões são consideradas estatisticamente significativas, quando a razão entre a média quadrática da regressão e média quadrática residual ( $MQ_{reg}/MQ_r$ ) for bem maior que

o valor da distribuição  $F_{v_{reg},v_r}$  no nível de confiança desejado e os erros padrões forem relativamente pequenos. O coeficiente de correlação ( $R^2$ ) é a razão entre a soma quadrática explicada pela regressão e a soma quadrática total ( $SQ_{reg} / SQ_T \cdot 100$ ) e estima a percentagem de variação explicada pela regressão. Ele é utilizado com frequência para avaliar o ajuste de um modelo. Quanto mais próximo da unidade for o seu valor, mais ajustado está o modelo e maior é a explicação da variação das repostas do analito em torno de suas médias pela equação da regressão (BRUNS, *et. al.*, 1995).

Na Tabela 5.4 encontra-se o resultado da análise de variância, onde os mesmos indicam que a equação de regressão linear é estatisticamente significativa, pois o valor de  $MQ_{reg} / MQ_r$  foi mais do que dez vezes o valor tabelado de  $F_{1,n-2}$  no nível de 95 % de confiança, ( $F_{1,4} = 7,71$  com  $n = 6$ ) (referência). O coeficiente de determinação ou de correlação múltipla ( $R^2$ ) do  $\alpha$ -tocoferol foi de 0,999727 assinalando que o modelo consegue explicar quase a totalidade da variação em torno da média.

**Tabela 5.4.** Análise de variância para os dados da curva analítica - CLAE

Efeitos $\alpha$ -tocoferol	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Teste F Calculado	Teste F Tabelado
Regressão	$2,26 \times 10^9$	1	2258262477	1903,753	7,71
Resíduo	615416,9	4	153854,229		
Total	$2,26 \times 10^9$	5			
$R^2$	0,999727				
R	0,999659				
Equação	$y = 5690,7x + 669,97$				

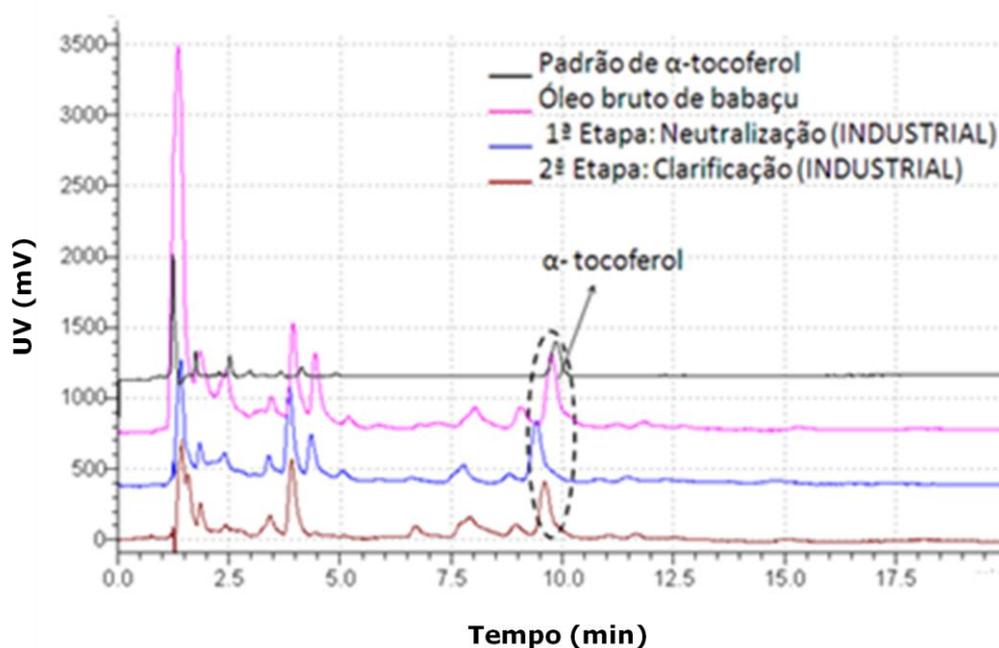
A indicação de existência de relação linear entre as variáveis dependente y e independente x foi altamente significativa e confirmada com o  $F_{cal}$  que foi superior ao  $F_{tab}$ , para o  $\alpha$ -tocoferol. Além deste parâmetro, Green (1996), Bruce *et al.*, (1998) e INMETRO (2003), estabelecem ainda valores aceitáveis de "r" para a avaliação da

linearidade de 0,999; 0,995 e 0,90 respectivamente. Os valores obtidos de  $R^2$  e  $r$  demonstraram a eficiência da regressão.

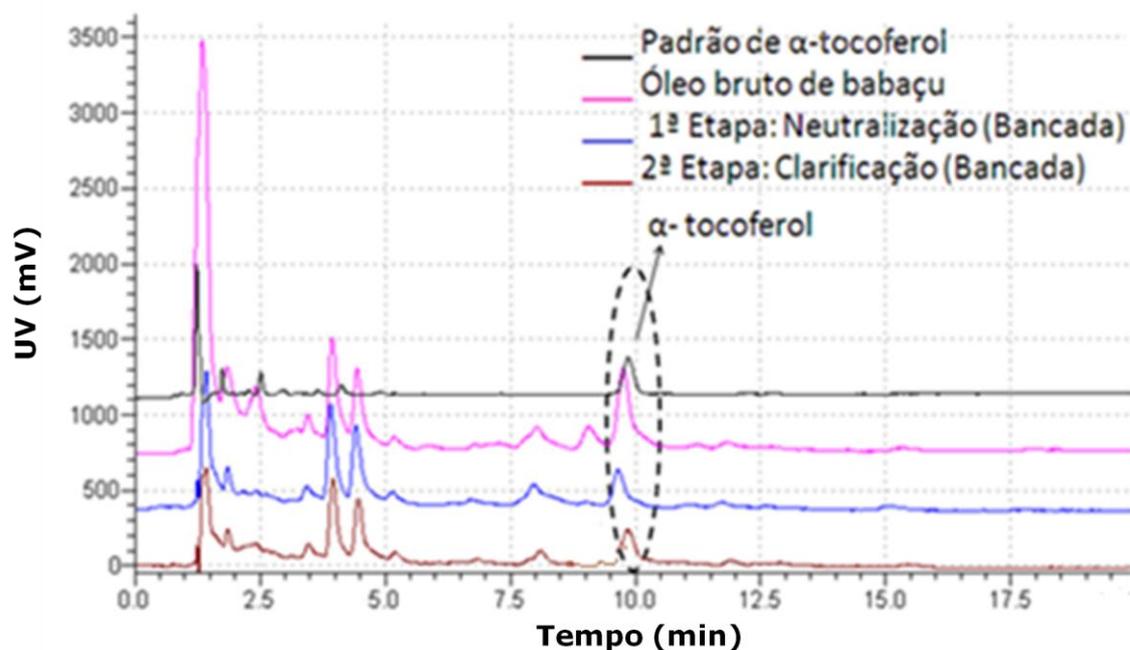
#### 5.4. Análises das amostras por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

Após a obtenção da curva de calibração por CLAE, partiu-se para as análises das amostras das etapas iniciais de refino (Industrial / Laboratorial), para a verificação do teor de  $\alpha$ -tocoferol.

Nas Figuras 5.4 e 5.5 encontram-se os cromatogramas obtidos a partir das análises cromatográficas do óleo nas etapas do processo de refino industrial e o realizado em nível de bancada.



**Figura 5.4.** Cromatogramas sobrepostos dos óleos bruto, neutralizado e clarificado – Industrial



**Figura 5.5.** Cromatogramas sobrepostos dos óleos bruto, neutralizado e clarificado – Bancada.

Observando-se os cromatogramas obtidos nas Figuras 5.4 e 5.5, percebe-se que de acordo com as etapas do processo de refino do óleo a quantidade de  $\alpha$ -tocoferol diminui gradativamente, tanto para as amostras da indústria, quanto para as refinadas em bancada, já que durante praticamente todo o processo, o óleo é submetido a uma elevação de temperatura. Começando desde a neutralização do óleo, que é submetido a uma temperatura de 65 °C para auxílio da separação do óleo e borra formada com a adição de NaOH. O que torna a concentração de  $\alpha$ -tocoferol ao final do refino insignificante, fazendo com que haja a necessidade da adição de oxidantes sintéticos ou naturais ao óleo que será comercializado.

A Tabela 5.5 apresenta as concentrações de  $\alpha$ -tocoferol encontradas em cada etapa de refino (Industrial e / ou Bancada) do óleo de babaçu por CLAE.

**Tabela 5.5.** Concentrações de  $\alpha$ -tocoferol a partir das etapas de refino do óleo de babaçu

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Concentração <math>\alpha</math>-tocoferol (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Variação (%)</b>
Óleo Bruto de babaçu	1,470	-
Óleo Neutralizado de babaçu - Industrial	1,177	19,94
Óleo Branqueamento de babaçu - Industrial	1,052	10,62
Óleo Neutralizado de babaçu - Bancada	0,550	62,58
Óleo Branqueamento de babaçu - Bancada	0,363	34,00

Comparando-se as concentrações de  $\alpha$ -tocoferol presente em cada etapa de refino do óleo de babaçu (Tabela 5.10), comprova-se a degradação deste antioxidante durante as etapas iniciais do refino deste óleo. Este fato também foi observado por Rodrigues *et al.*, (2006), onde estes pesquisadores afirmam em seus estudos que a etapa de neutralização química é a responsável pela maior perda de tocoferóis durante a etapa de refino do óleo. Sendo justamente o que se observou neste trabalho, cuja diferença de concentração ocorre entre o óleo bruto e o óleo neutralizado em ambos os processos para o refino do óleo de babaçu. Alpaslan *et al.*, (2001), também relatam em seus estudos que a quantidade de tocoferóis decrescia, a cada nova etapa de refino do óleo de girassol. Afirmam inclusive que aproximadamente 22% de  $\alpha$ -tocoferol foram perdidos durante o refino químico. Outros pesquisadores que também fizeram este tipo de detecção foram El-Mallah *et al.*, (2011), ao observar o decaimento de tocoferóis a cada nova etapa de refino do óleo de algodão. Isto ocorreu porque na etapa de neutralização, utilizou-se hidróxido de sódio aquoso (este reage com ácidos graxos livres presentes no óleo e forma a borra / sabão), que a princípio deve solubilizar e arrastar consigo parte desse antioxidante (PESTANA *et al.*, 2009).

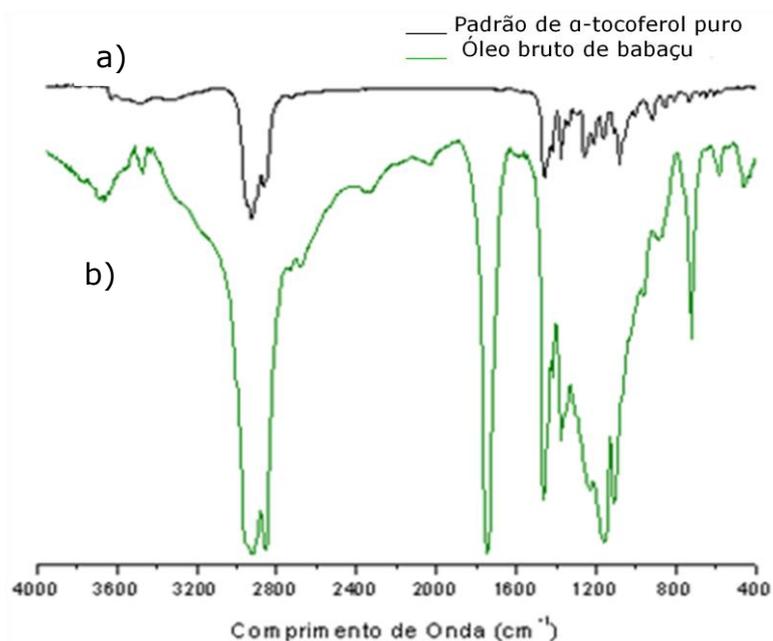
Outro fato a ser observado é o valor da variação de  $\alpha$ -tocoferol em percentagem de uma etapa a outra (ver Tabela 5.5), onde também se

percebeu o decaimento em ambos os processos. Segundo Davies *et al.*, (1979), que realizou o estudo do efeito do refino químico na composição de óleos vegetais (soja, algodão e canola), observou-se que houve perdas no teor tocoferóis durante a etapa de neutralização e branqueamento, encontrando valores de 6,4 e de 13,4%, respectivamente. Para este estudo com o óleo de babaçu, onde não há registros na literatura, observou-se o contrário para ambos os processos (19,94 % neutralizado e 10,62% branqueamento para o refino industrial; e de 62,50% neutralizado e de 34,00% branqueamento para o refino de bancada). Este fato pode ser explicado pelo “efeito matriz” que pode ter contribuído para este contraste, além do tipo de processo de refino a que foram submetidos estes óleos estudados por estes pesquisadores.

### **5.5. Análises das amostras por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier – FTIR**

A espectrometria é o processo analítico-instrumental baseado nas propriedades de absorção, emissão e reflexão de energia eletromagnética em região específica do espectro (PAVIA, 1996; SILVERSTEIN, 2000).

Na Figura 5.6 encontram-se os espectros do padrão de  $\alpha$ -tocoferol e do óleo de babaçu utilizados para este trabalho e na Tabela 5.6, encontram-se os valores das frequências vibracionais das amostras do padrão de  $\alpha$ -tocoferol e do óleo bruto de babaçu.



**Figura 5.6.** Espectro na região do Infravermelho do padrão de  $\alpha$ -tocoferol puro (a) e do óleo bruto de babaçu (b).

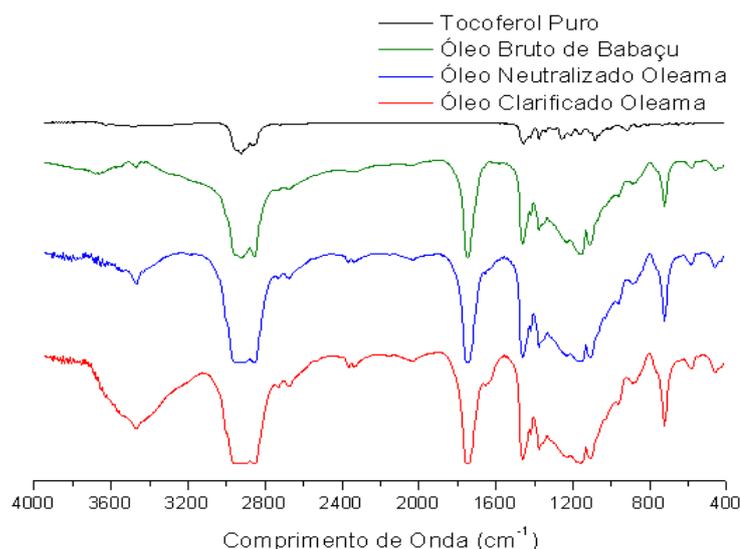
**Tabela 5.6.** Valores das freqüências de vibração na região do IV do padrão de  $\alpha$ -tocoferol e da amostra de óleo bruto de babaçu.

Número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ )		Intensidade	Atribuição
Padrão $\alpha$ -tocoferol	Óleo bruto Babaçu		
-	3358	Fraca	O-H
2923	2947	Muito forte	$\text{CH}_2$ , $\text{CH}_3$
2737	2814	Muito forte	$\text{CH}_2$ , $\text{CH}_3$
-	1788	Muito forte	C = O
1425	1445	Média	Anel fenólico
1148	1179	Fraca	C-O
721	723	Muito Fraca	C-O

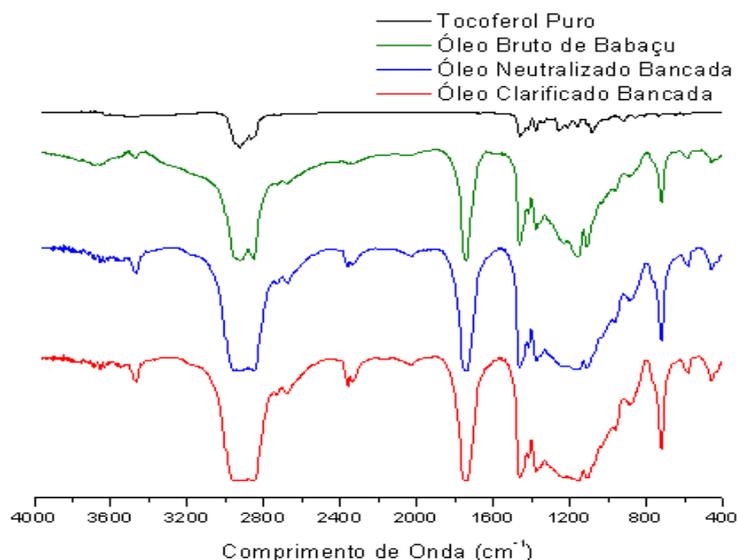
Na Figura 5.7, pode-se comparar o espectro do infravermelho do  $\alpha$ -tocoferol com o óleo de babaçu bruto, onde ambos apresentaram bandas semelhantes (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). Os modos vibracionais próximos a  $3358 \text{ cm}^{-1}$  referem-se à vibração do estiramento da ligação O-H. O alargamento dessas bandas deve-se ao fato do grupo hidroxila não

estar totalmente livre e participando das ligações de hidrogênio intermoleculares. As absorções em torno da região entre  $2923\text{ cm}^{-1}$  a  $2814\text{ cm}^{-1}$  com intensidade forte referem-se às vibrações de estiramentos assimétricos do grupo  $\text{CH}_2$  e simétricos do  $\text{CH}_3$ . Na região de absorção de  $1788\text{ cm}^{-1}$  aparece uma banda com forte intensidade devido à deformação axial do grupo carbonila  $\text{C}=\text{O}$ . A banda de absorção com intensidade média entre  $1425$  e  $1445\text{ cm}^{-1}$  envolvem a deformação axial das ligações carbono-carbono do anel aromático, onde as bandas de esqueleto aparecem frequentemente como dubletes, dependendo da natureza dos substituintes do anel, (MAN *et. al.*, 2005; SILVERSTEIN *et al.*, 2007). A banda na região entre  $721$  e  $723\text{ cm}^{-1}$  com fraca intensidade foi atribuída à deformação angular assimétrica no plano  $\text{CH}_2$  onde todos os grupos metilenos se deformam nesta região.

Nas Figuras 5.7 e 5.8, encontram-se os espectros na região do infravermelho sobrepostos relacionados aos estudos feitos com as amostras de óleo bruto de babaçu, e as primeiras etapas de refino realizado em bancada e as amostras coletadas na indústria.



**Figura 5.7.** Espectros das amostras na região do infravermelho das etapas de refino do óleo de babaçu via industrial



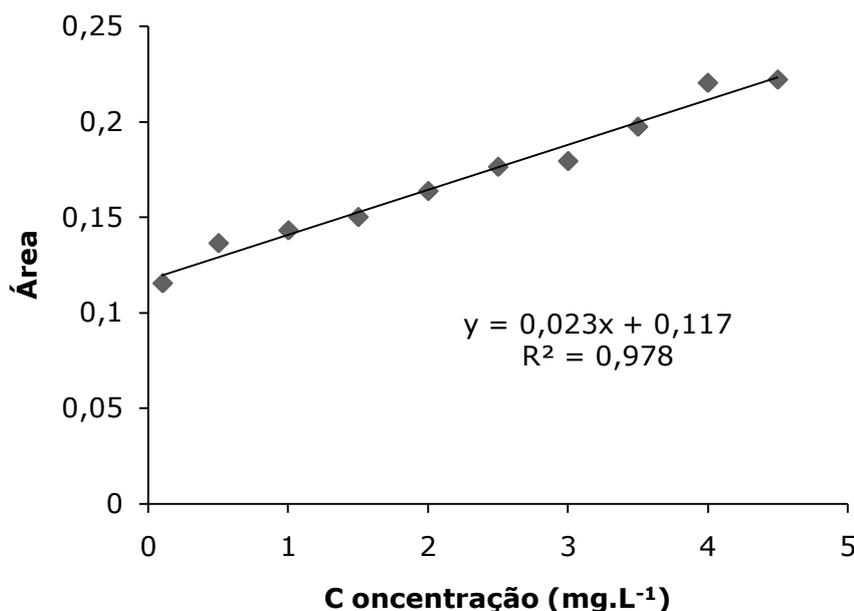
**Figura 5.9.** Espectros das amostras na região do infravermelho das etapas de refino do óleo de babaçu via bancada

Nos espectros de FTIR ilustrados nas Figuras 5.8 e 5.9, pode-se identificar a presença do  $\alpha$ -tocoferol de acordo com Man *et al.*, (2005), pela presença das bandas de absorção características da estrutura do esqueleto fenólico ( $1461\text{cm}^{-1}$  -  $1450\text{cm}^{-1}$ ), do estiramento assimétrico de metil ( $1460\text{cm}^{-1}$ ), do estiramento simétrico de metil ( $1378\text{cm}^{-1}$ ), do estiramento em  $1262\text{cm}^{-1}$  para ( $-\text{CH}_2$ ),  $1086\text{cm}^{-1}$  é a deformação do fenil e  $919\text{cm}^{-1}$  para estiramento trans ( $=\text{CH}_2$ ). Ahmed *et, al.*, (2005), também observou em seus estudos em diversos óleos vegetais que a maioria dos espectros obtidos na região do infravermelho, continham forte absorção entre  $1500\text{-}1000\text{cm}^{-1}$  para o estudo de tocoferóis.

A Figura 5.10, mostra a curva de calibração proposta para as análises de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).

Nota-se que tanto o refino realizado na indústria quanto a nível laboratorial, à medida que a amostra inicial de óleo foi sendo submetida

ao processo de refino, as intensidades dos modos vibracionais referentes ao anel fenólico diminuem, devido a suposta degradação do  $\alpha$ -tocoferol da matriz de origem. Comprovação observada quando se fez o estudo analítico através da construção de uma curva para a quantificação de  $\alpha$ -tocoferol por esta técnica.



**Figura 5.10.** Curva analítica para  $\alpha$ -tocoferol - FTIR

Segundo Reto *et al.*, (2008), ainda que uma análise inicial possa ser feita com base na inspeção visual do gráfico ( $y = ax + b$ ) e na determinação do valor do coeficiente de determinação, uma análise completa requer uma análise de variância. Isto é, antes de se utilizar o modelo linear para a função de calibração desejada, é preciso confirmar a linearidade, procedendo-se à comparação de variâncias. O teste foi realizado através do cálculo da razão das médias quadráticas (Tabela 5.7), obtidos pelo software Microsoft Excel 2007.

**Tabela 5.7.** Análise de variância para os dados da curva analítica – FTIR

Efeitos	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	Teste F	
				Calculado	Tabelado
<b><math>\alpha</math>-tocoferol</b>					
Regressão	0,01118377	1	0,01118377	72,6925	5,32
Resíduo	0,00023135	8	$2,891 \times 10^{-5}$		
Total	0,01141519	9			
R <sup>2</sup>	0,9787				
R	0,9772				
Equação	$y = 0,0235x + 0,1172$				

Percebe-se que a indicação de existência de relação linear entre as variáveis dependente y e independente x foi altamente significativa e confirmada com o  $F_{cal}$  que foi superior ao  $F_{tab}$ . O valor obtido de  $R^2$  demonstra a eficiência da regressão.

Desta maneira, ao interpolar-se os valores encontrados das áreas selecionadas de 1465,900 a 1446,621  $cm^{-1}$ , região escolhida devido aos estudos já realizados para  $\alpha$ -tocoferol (SILVA *et al.*, 2009) onde se encontra a região do anel fenólico, característico deste, obteve-se então, a quantificação deste composto.

Vale ressaltar que devido à baixa resolução apresentada por esta técnica para a quantificação de  $\alpha$ -tocoferol, não se pôde validá-la.

Na Tabela 5.13, encontram-se as concentrações do  $\alpha$ -tocoferol com a aplicação das duas técnicas.

**Tabela 5.8.** Concentrações de  $\alpha$ -tocoferol a partir das etapas de refino do óleo de babaçu (CLAE e FTIR)

<b>Tipo de amostra</b>	<b>Concentração <math>\alpha</math>-tocoferol (mg.L<sup>-1</sup>) CLAE</b>	<b>Concentração <math>\alpha</math>-tocoferol (mg.L<sup>-1</sup>) FTIR</b>
Óleo bruto de babaçu	1,470	13,220
Óleo neutralizado de babaçu - Industrial	1,177	11,520
Óleo clarificado de babaçu - Industrial	1,052	5,560
Óleo neutralizado de babaçu - Bancada	0,550	1,040
Óleo clarificado de babaçu - Bancada	0,363	0,430

Observa-se nitidamente que cada técnica aqui aplicada, apresenta suas particularidades. De um lado tem-se a CLAE, onde se pode identificar e separar com precisão os compostos de interesse. Do outro o FTIR, que também é uma técnica muito difundida no meio científico, mas que apresenta certas limitações, tais como sobreposições dos modos vibracionais, por haver coincidência de absorção destas. E é exatamente o que os dados desta tabela estão demonstrando. Para que se obtivesse uma diferença tão significativa das concentrações encontradas pelas duas técnicas aqui aplicadas. Comprovado assim, que há uma redução da concentração inicial de  $\alpha$ -tocoferol partindo-se do óleo bruto de babaçu para cada etapa de refino.

Evidencia-se, desta maneira, a necessidade da adição de antioxidante, seja natural ou sintético ao término de refino de óleos em geral, já que a quantidade presente naturalmente no óleo é degradada mediante as etapas do processo de refino.

## 5.6. Tratamento estatístico – Validação da Metodologia (CLAE)

### 5.6.1. Precisão – Repetitividade

Os resultados encontrados para a precisão estão expressos em percentagem de coeficiente de variação estão demonstrados na Tabela 5.9.

**Tabela 5.9.** Valores de concentração obtidos na repetitividade para o  $\alpha$ -tocoferol

<b>Repetição (0,1 mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração <math>\alpha</math>-tocoferol (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
1	0,098
2	0,097
3	0,098
.	.
.	.
.	.
10	0,098
Média (M)	0,098
Desvio Padrão (DP)	$7 \cdot 10^{-4}$
Coeficiente de variação (CV %)	0,72
<b>Repetição (1,5 mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração <math>\alpha</math>-tocoferol (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
1	1,46
2	1,48
3	1,47
.	.
.	.
.	.
10	1,47
Média (M)	1,47
Desvio Padrão (DP)	$10^{-2}$
Coeficiente de variação (CV %)	0,68
<b>Repetição (10,0 mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração <math>\alpha</math>-tocoferol (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
1	9,98
2	9,97
3	9,97
.	.
.	.
.	.
10	9,97
Média (M)	9,97
Desvio Padrão (DP)	$7 \cdot 10^{-3}$
Coeficiente de variação (CV %)	0,070

Conforme HARRIS (2008), quanto menor for o coeficiente de variação mais preciso será o conjunto de medidas, sendo, portanto, os resultados encontrados para a repetitividade do método satisfatório.

### 5.6.2. Exatidão

A exatidão do método foi calculada através do índice de recuperação (**R**) do  $\alpha$ -tocoferol. Os valores dos índices de recuperação estão indicados na Tabela 5.10.

**Tabela 5.10.** Recuperação das amostras fortificadas com soluções padrões de  $\alpha$ -tocoferol com concentrações de 1,5 e 10 ( $\text{mg.L}^{-1}$ )

Concentração Teórica ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	Médias	Desvio Padrão (s)	Coeficiente de Variação (CV%)	Concentração Determinada ( $\text{mg.L}^{-1}$ )	R (%)
1,5	8946,0	23,0314	0,2574	1,449 $\pm$ 0,051	96,60
10	57087,8	55,7371	0,0976	9,908 $\pm$ 0,092	99,08

\*Média de três injeções

Os valores de recuperação se encontram dentro do intervalo de variação aceitável na faixa de concentração recomendada. De acordo com os pesquisadores Brito *et al.*, (2003) esses valores são estimados considerando-se que análises de elementos majoritários costumam apresentar erros sistemáticos relativos muito inferiores aqueles obtidos para analitos em concentrações muito pequenas. Tais valores são sugeridos pelo manual da *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC).

### 5.6.3. Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Para este estudo os resultados encontrados para o limite de detecção e para o limite de quantificação do método foram respectivamente: 0,089 e 0,311  $\text{mg.L}^{-1}$ .

#### 5.6.4. Linearidade

Para o estudo da linearidade, este já foi descrito no item 5.3.2.

#### 5.6.5. Reprodutibilidade

Para este estudo não foi possível realização da reprodutibilidade, devido não haver disponibilidade de outros laboratórios e de outros equipamentos para a realização das análises.

# **CAPÍTULO 6**

---

## **CONCLUSÃO**

---

## 6. CONCLUSÃO

- O método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) comprovou que ocorreu uma redução do teor de  $\alpha$ -tocoferol no óleo bruto e durante as etapas iniciais do refino do óleo de babaçu, tanto a nível industrial quanto em bancada.
- O método por espectrofotometria na região de infravermelho usando transformada de Fourier (FTIR) apresentou algumas limitações (sobreposições dos modos vibracionais) na quantificação do  $\alpha$ -tocoferol no óleo bruto e durante as etapas iniciais do refino do óleo de babaçu, tanto a nível industrial quanto em bancada.
- Ao se comparar os valores encontrados por ambos os métodos analíticos aqui apresentados CLAE e FTIR, observou-se que no FTIR as concentrações de  $\alpha$ -tocoferol são superiores em relação às obtidas no método por CLAE, supondo-se que ocorreu a sobreposição dos modos vibracionais de todos os tocoferóis e/ ou tocotrienóis existente nas amostras de óleo bruto de babaçu, quanto nas etapas de refino (industrial e bancada);
- É importante ressaltar que ambas as técnicas mostraram a comprovação da redução do teor de  $\alpha$ -tocoferol no decorrer das etapas de refino.
- Devido o método analítico proposto por CLAE ter apresentado os melhores resultados para o estudo da degradação do  $\alpha$ -tocoferol no óleo de babaçu e das etapas iniciais de refino, este foi validado através da análise de variância (ANOVA), que comprovou que o mesmo encontra-se ajustado ao modelo linear. Fazendo-o um método alternativo de análise direta, utilizando para este fim a

detecção por UV, temperatura ambiente e por injeção direta da amostra, o que a torna um diferencial.

- Os resultados da validação do método estabelecido por CLAE mostram que esta técnica analítica pode ser empregada na determinação do teor de  $\alpha$ -tocoferol no óleo bruto e durante as etapas iniciais do refino do óleo de babaçu, tanto a nível industrial quanto em bancada.

---

# REFERÊNCIAS

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABOISSA REPRESENTAÇÕES-ÓLEOS VEGETAIS, São Paulo-SP. Disponível em: <<http://www.aboissa.com.br/>>. Acessado em: 03 maio 2010.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº482, de 23 de setembro de 1999. Aprova o Regulamento Técnico: "Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais". Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acessado em: 22 fevereiro 2010.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Resolução RE nº 899*, de 29/05/2003.

AHMED, M. K.; DAUN, J. K.; PRZYBYLSKI, R., FT-IR based methodology for quantitation of total tocopherols, tocotrienols and plastochromanol-8 in vegetable oils, *Journal of Food Composition and Analysis*, **18: 359, 2005**.

ALBUQUERQUE, M. L. S.; GUEDES, I.; ALCANTARA JR, P.; MOREIRA, S. G. C. Infrared absorption spectra of Buriti (*Mauritia flexuosa L.*) oil, *Vibrational Spectroscopy*, **33: 127, 2003**.

ALMEIDA, M. M. *Determinação e quantificação das vitaminas C e D associadas em produtos cosméticos*. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamento, USP, 2008. Dissertação de Mestrado, 83p.

ALPASLAN, M.; TEPE, S.; SIMSEK, O., Effect of refining processes on the total and individual tocopherol content in sunflower oil, *International Journal of Food Science and Technology*, **36: 737, 2001**.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. ASTM D 5554-95 (06): Standard test method for determination of iodine value of fat and oils, 2006. 3p.

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*, **32 (9): 2476, 2009.**

BOSCHIN, G.; ARNOLDI, A. Legumes are valuable sources of tocopherols, *Food Chemistry*, **127: 1199, 2011.**

BRITO, N. M.; AMARANTE JUNIOR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão, *Pesticidas: R. Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, **13: 129, 2003.**

BRUCE, B; MINKKINEN, P; RIEKKOLA, M.L. Practical method validation: validation sufficient for analysis method, *Mikrochimica Acta*, **128: 93, 1998.**

BRUNI, R.; MEDICI, A.; GUERRINI, A.; SCALIA, S.; POLI, F.; ROMAGNOLI, C.; MUZZOLI, M.; SACCHETTI, G. Tocopherol, fatty acids and sterol distributions in wild Ecuadorian *Theobroma subincanum* (Sterculiaceae) seeds, *Food Chemistry*, **77: 337, 2002.**

BRUNS, E. R.; SCARMÍNIO, S. I.; NETO, B.B. *Planejamento e otimização de experimentos*. Ed. UNICAMP, Campinas, SP, 1995.

CANDEIA, R. A. *Biodiesel de Soja: Síntese, Degradação e Misturas Binárias*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Paraíba, UFPB, 2008. Tese de Doutorado.

CARLUCCI, G.; MAZZEO. P.; Del GOVERNATORE, S.; Di GIACOMO,G.; Del RE, G. Liquid chromatographic method for the analysis of tocopherols in malt sprouts with supercritical fluid extraction, *Journal of Chromatography A.*, **935(1-2): 87, 2001.**

CARO, A. S. B. *Determinação e padronização da vitamina E e seus isômeros: comparação entre o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o método espectrofotométrico por redução de íons cúpricos.* Campinas, Programa de Pós-Graduação em Química, UNICAMP, 2002. Dissertação de Mestrado.

CARVALHO. S. M. *Efeito da adição de tocoferóis sobre a qualidade de óleo de soja embalado em PET.* Santa Catarina, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos, UFSC, 2007. Dissertação de Mestrado, 103p.

CASS, Q. B.; DEGANI, A. L., *Desenvolvimento de métodos por HPLC – Fundamentos, estratégias e validação.* Universidade Federal de São Carlos, EdUFSCAR, São Carlos-SP, 2001.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O.; Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas, *Química Nova*, **30 (2): 441, 2007.**

CIOLA, R. *Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho.* 1.ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda. 2000.

CODEX ALIMENTARIUS. Codex Standard for Named Vegetable Oils.CODEX STAN 210 (Amended 2005).Codex Alimentarius, Roma: FAO/WHO. 2005.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P. S., *Fundamentos de cromatografia.* Campinas – SP. Unicamp, 2007.

CHUN, J.; LEE, J.; YE, L.; EXLER-EITENMILLER, R.R. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet, *Journal of Food Composition and Analysis*, **19: 196,2006.**

DAVIES, M. G.; BIOL, M. T.; JAWAD, I. M.; WEIR, G.S.D., The effect of refining on the composition of oil vegetable, *Scientific and Technological Surveys*, **112: 1, 1979.**

DEUTSCHE NORM.DIN 53241-1: Determination of iodine value by methods using Wijs solution, 5, 1981.

DETERMINAÇÃO DA VITAMINA E, *Jornal Oficial da União Européia* (L54/66 26.2.2009). Disponível em: < <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:054:0001:0130:PT:PDF>>. Acessado em: 24 novembro 2009.

DOMINGOS, A. K. *Otimização da etanolise de óleo de raphanussativus l. E avaliação de sua estabilidade à oxidação.* Paraná, 2005, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPR. Dissertação de Mestrado, 113p.

ESCRIVÁ, A.; ESTEVE, M.J.; FARRÉ, R.; FRÍGOLA, A Determination of liposoluble vitamins in cooked meals, milk and milk products by liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **947: 313, 2002.**

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

FERREIRA, E. S.; SILVEIRA, C. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S., Caracterização físico-química da amêndoa, torta e composição dos ácidos

graxos majoritários do óleo bruto da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* HBK), *Alimentos e Nutrição*, **17: 203, 2006.**

FERREIRA, E. S.; SILVEIRA, C. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S., Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de tucumã (*Astrocaryum vulgare* mart.), *Alimentos e Nutrição*, **19: 427, 2008.**

FREIRE, L. M. S. *Otimização da síntese etanólica do biodiesel de pinhão manso (Jatropha curcas L.) e determinação de seus parâmetros fluidodinâmicos.* João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2009. Dissertação de Mestrado.

FREITAS, L. S. *Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos.* Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Química, UFRGS, 2007. Tese de Doutorado, 227p.

GEEN, J. M. A practical guide to analytical method validation, *Analytical Chemistry*, **68: 305A, 1996.**

GIMENO, E.; CASTELLOTE, A.I.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.; TORRE, M.C.; LÓPEZ-SABATER, M.C. Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **881: 251, 2000.**

GOTOR, A. A.; FARKAS, E.; BERGER, M.; LABALETTE, F.; CENTIS, S.; DAYDÉ, J.; CALMON, A. Determination of tocopherols and phytosterols in sunflower seeds by NIR spectrometry, *Europe Journal Lipids Science Technology*, **109: 525, 2007.**

GRUPO CHEIROS DA TERRA. Referência bibliográfica de documento eletrônico. Disponível em: <<http://www.cheirosdaterra.e1.com.br>>. Acessado em: 16 fevereiro 2010.

GUIMARÃES, M. R. M; VIANNA, L. M. A. Vitamina E e função cognitiva: Uma revisão de literatura, *Revista Neurociências*, **18(2): 249,2010**.

GUINAZI, M. *Tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças, ovos e óleos vegetais utilizados em restaurante comerciais*. Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Ciência da Nutrição, UFV, 2004. Tese de Doutorado, 108p.

GUINAZI, M.; MILAGRES, R. C. R. M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; CHAVES, J. B. P. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos, *Química Nova*, **32 (8): 2098, 2009**.

GUSTONE, F. D. *The chemistry of and* Blackwell Publishing Ltd. Boca Raton, USA, 2004.

HARRIS, D. C. *Análise Química Quantitativa*. 3 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, Produção da extração vegetal e silvicultura, Rio de Janeiro, 2009, V.24.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1.: Métodos Químicos e Físicos para Análise de Alimentos, 3.ed. São Paulo: IMESP, 1985.

INTERNATIONAL STANDARD, Animal and vegetable fats and oils – Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography, ISSO 9936, 2006.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) DOQ – CGCRE – 008. Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003. 35p.

ISSO (9936:2006) – International Standard – Animal and vegetable fats and oils – Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high – performance liquid chromatography.

IWASE, H., Determination of tocopherol acetate in emulsified nutritional supplements by solidphase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, **881 (1-2): 243, 2000.**

KAPILAN, N.; BABU, T. P. A.; REDDY, R.P. Technical aspects of biodiesel and its oxidation stability, *Journal of Chemistry Techonoly Research*, **1 (2), 278, 2009.**

KICÇAK, B.; AKAY, S., Quantitative determination of  $\alpha$ -tocopherol in *Pistacialentiscis*, *Pistacialentisciusvarchia* and *Pistaciaterebinthus* by TLC-densitometry and colorimetric, *Fisoterapia*, **76: 62,2005.**

KNOTHE, G.; VAN GERPEN, J.; KRAHL, J. *The biodiesel handbook*. AOAC PRESS, Champaign, USA, 2005.

LAGUNA, L. E; MAIA, G.A; TELLES, F. J; JUNIOR, J. C. G; ORIÁ, H. F; GUIMARÃES, A. C. L. Utilização do óleo de babaçu refinado na composição do leite fluido de consumo. *Revista Ciência Agronômica*. Disponível em: <[http://ccarevista.cnpat.embrapa.br/site/artigos\\_lista.php?sel=1989&sel2=1&sel3=20](http://ccarevista.cnpat.embrapa.br/site/artigos_lista.php?sel=1989&sel2=1&sel3=20)>. Acessado em: 03 maio 2010.

LANÇAS, F. M. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos: RiMA, 2004.

LEITE, F. *Validação em análise química*. Campinas: Átomo, 2008.

LEUNG, D.Y.C.; KOO, B.C.P.; GUO, Y. Degradation of biodiesel under different storage conditions, *Bioresource Technology*, **97: 250, 2006**.

LIANG, L.; HÉRBERT-TREMBLAY, V.; SUBIRADE, M., Characterization of the  $\beta$ -lactoglobulin /  $\alpha$ -tocopherol complex and its impact on the  $\alpha$ -tocopherol stability, *Food Chemistry*, **128: 821, 2011**.

LIMA, G.R; GONÇALVES, L. A. Quantificação de tocoferóis em óleos de milho, soja, castanha-do-pará e castanha de caju por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, *Alimentos e Nutrição*, **8: 65, 1997**.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **37 (3): 2001**.

LINS, R. T. *Determinação de tocoferóis e carotenóides em frutas amazônicas: Implantação de uma metodologia*. Belém, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, UFPA, 2006. Dissertação de Mestrado. 80p.

LUZIA, D. M. M. *Estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extrato de sementes de limão (Citruslimon)*. São José do Rio Preto, Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos, UNESP, 2008. Dissertação de Mestrado.

MAN, Y.B.; AMMAWATH, W.; MIRGHANI, M.E.S. Determination  $\alpha$ -tocopherol in refined bleached and deodorized palm by Fourier transform infrared Spectroscopy , *Food Chemistry*, **90: 323, 2005**.

MANAN, F. Tocopherol contents of paristani seed oils studies by normal phase HPLC, *Journal of Islamic Academic of Sciences*, **07: 34, 1994.**

MARTINS, P. F. *Estudos e experimentos para a concentração de tocoferóis e fitoesteróis por meio da destilação molecular*. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UNICAMP, 2006. Tese de Doutorado.

MASUCHI, M. H.; CELEGHINI, R. M. S.; GONÇALVES, L. A. G.; GRIMALDI, R. Quantificação de TBHQ (Terc-Butil-Hidroquinona) e avaliação da estabilidade oxidativa em óleos de girassol comerciais, *Química Nova*, **31. (5): 1053, 2008.**

MAURIUTTI, L. R. B; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes Naturais da família *Lamiacea I*. Aplicação em produtos alimentício, *Brazilian Journal Food Technology*, **10 (2): 96, 2007.**

MILLER, J. C; MILER J. N; *Estatística para química analítica – 2a Ed* Addison – Wesley Ibero-americano, 1993.

MORAIS, M. M.; PINTO, L. A.; ORTIZ, S. C. A., CREXI, V. T.; SILVA, R. L; SILVA, J. D. Estudo do processo de refino do óleo de pescado, *Revista Instituto Adolfo Lutz*, **60: 23, 2001.**

MORETTO, E; FETT, R. *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos*. São Paulo: Varela, 1998.

MORETO, E.; ALVES, R. F. *Óleos e Gorduras Vegetais: Processamento e Análises*. Florianópolis, Ed UFSC, 1986.

NIMET, G. *Avaliação dos solventes: dióxido de carbono supercrítico e propano subcrítico na extração do óleo de girassol*. Paraná, Programa de

Pós-Graduação em Engenharia Química, UNIOESTE, 2009, Dissertação de Mestrado. 119p.

OLIVEIRA, C. G. *Proposta de Modelagem Transiente para a Clarificação de Óleos Vegetais - Experimentos Cinéticos e Simulação do Processo Industrial*. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFSC, 2001. Dissertação de Mestrado, 143 p.

OLIVEIRA, D. O; SANTOS, J. C. O. Estudo da estabilidade térmica e oxidativado óleo de mamona. I Congresso Norte-Nordeste de Química, Natal – RN, 2007.

OLIVEIRA, L. R; SILVA, M. J. M; CARVALHO, L. F. M; GOMES, M. S. Caracterização físico-química do óleo bruto de coco de babaçu (*orbignya phalerata Mart.*) comercializado na zona rural de José Freitas – PI, II Congresso de Pesquisa e Inovação de Rede Norte e Nordeste de Educação Tecnológica, João Pessoa – PB, 2007.

PAIXÃO, J. A.; STAMFORD, T. L . M. Vitaminas Lipossolúveis em alimentos - Uma abordagem analítica, *Química Nova*, **27 (1): 96, 2004.**

PESTANA, V. R.; ZAMBIAZI, R. C.; BRUSCATTO, M. H ; ANTÔNIO, G. A. Oxidação induzida do óleo de arroz bruto, degomado, neutro/branqueado. In: XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-graduação da UFPel, 2006, Pelotas. XV Congresso de Iniciação Científica VIII Encontro de Pós-graduação da UFPel, 2006.

PYKA, A; SLIWIOK. Separation of tocopherols, *Journal of Chromatography A*, **935: 71, 2001.**

Portaria Ministerial nº 812, Ministro da Agricultura. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acessado em: 19 setembro 2009.

PORTO, M. J. F. *Estudo Preliminar de Dispositivo de Quebra e Caracterização dos Parâmetros Físicos do Coco Babaçu*. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, UNICAMP, 2004. Dissertação de Mestrado. 75p.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos, *Química Nova*, **29 (4): 755, 2006**.

RAMALHO, V. C.; SILVA, M. G.; JORGE, N. Influência do extrato de alecrim sobre a estabilidade do  $\alpha$ -tocoferol em óleo de soja submetido à termoxidação, *Alimentos e Nutrição*, **07 (2): 197, 2006**.

REIPERT, E. C. D. *Desacidificação de óleos de babaçu e de algodão por extração líquido-líquido*. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2005. Dissertação de Mestrado.

REIS, M. C.; COSTA, J. N.; PEIXOTO, A. P. C. Efeito da idade suplementação oral com o acetato de DL- $\alpha$ -tocoferol sobre os níveis séricos de vitamina E e sobre o proteinograma do acetato, *Revista Brasileira Saúde Produtos Naturais*, **08 (3): 151, 2007**.

RETO, M.; FIGUEIRA, M. E.; FILIPE, H. M. e ALMEIDA, C. M. M. Teor de fluoretos em infusões de chá verde (*Camellia sinensis*), *Química Nova*, **31(2): 317, 2008**.

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*, **27 (5): 771, 2004**.

RIOS, M. D; PENTEADO, M. V. C. Determinação de  $\alpha$ -Tocoferol em Alho Irradiado Utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), *Química Nova*, **26 (1): 10, 2003**.

RODRIGUES, C.E.C; ONOYAMA, M.M; MEIRELLES, A. J. A. Optimization of the Rice bran oil deacidification process by liquid-liquid extraction, *Journal of Food Engineering*, **73: 370, 2006.**

RODRIGUES FILHO, M. G., *Cardanol e eugenol modificados – Uso como antioxidante no controle do processo oxidativo do biodiesel de algodão*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2010. Tese de Doutorado.

ROPKE, C. D; OSTROSKY, E. A; KANEKO, T. M; CAMILO, C. M; SAWADA, T. C. H; BARROS, S. B. M. Validação de metodologias analíticas para determinação e quantificação de  $\alpha$ -tocoferol e 4-neurodilcaterol, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **39 (2): 2003.**

RUPÉREZ, F.J.; MARTÍN, D.; HERRERA, E.; BARBAS, C. Chromatographic analysis of  $\alpha$ -tocopherol and related compounds in various matrices, *Journal of Chromatography A*, **935 (1-2): 45, 2001.**

SALGADO, J. M; DANIELI, F; REGISTANO-D'ARCE, M. A. B; FRIAS, A; MANSI, D. N. O óleo de abacate (*Persea americana Mil*), como matéria-prima para a indústria alimentícia, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **28: 20, 2008.**

SANTOS, J. R. de J. *Biodiesel de Babaçu: Avaliação Térmica, Oxidativa e Misturas Binárias*. João Pessoa, Programa de Pós-Graduação em Química, UFPB, 2008. Tese de Doutorado, 117p.

SASSON, C. S. *Influência dos veículos cosméticos na permeação cutânea da associação de filtros solares e acetato de tocoferol*. Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFPR, 2006. Dissertação de Mestrado.

SCHIEBER, A.; MARX, M.; CARLE, R. Simultaneous determination of carotenes and tocopherols in ATBC drinks by high-performance liquid chromatography, *Food Chemistry*, **76: 357, 2002.**

SILVA, M. G. *Macadâmia Nacional: Tocoferóis e caracterização Físico-Química*. Campinas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2003. Dissertação de Mestrado.

SILVA, S.D; ROSA, N.F; FERREIRA, A.E; BOAS, L.V; BRONZE, M.R. Rapid Determination of  $\alpha$ -Tocopherol in Vegetable Oils by Fourier Transform Infrared Spectroscopy, *Food Analysis Methods*, **2: 120, 2009.**

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. *Métodos para Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante*, *Química Nova*, **22(1): 1999.**

SILVERSTEIN, R. M; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J., NIEMAN, T. A. *Princípios de Análise Instrumental*, 5a ed, Porto Alegre: Bookman, 2002.

SOARES, L. A; GIL, E. S; REZENDE, K. R. Análises preliminares de substâncias viscosas em espectrômetro de infravermelho utilizando suporte alternativo, *Revista Eletrônica de Farmácia*, **03: 63, 2006.**

SOUSA, M. B. *Extração e quantificação de  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno e  $\alpha$ -tocoferol em macroalgas marinhas utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa*. Fortaleza, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca, UFC, 2005. Dissertação de Mestrado.

SOUZA, M. G.; VIEIRA, E. C.; OLIVEIRA, P. V. Determinação de As, Cd e Pb em amêndoas e mesocarpo de babaçu, sapucaia, xixá e castanha-do-pará por espectroscopia de absorção atômica, *Química Nova*, **32 (6): 1442, 2009.**

SOLOMONS, T. W. G. *Química Orgânica*. 1. Ed, LTC. 6ed, 1996.

SWIGLO, G. A.; SIKORSKA, E. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oil, *Journal of Chromatography A*, **8 (195): 1048, 2004.**

TAIPINA, M. S. *Efeito da radiação gama sobre o conteúdo de Tocoferóis em produtos naturais e industrializados e avaliação sensorial*. São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Nuclear, USP, 2009. Tese de Doutorado.

TURNER, C. & MATHIASSEN, L. Determination of vitamin A and E in milk powder using supercritical fluid extraction for sample clean-up, *Journal of Chromatography A*, **874: 275, 2000.**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Babaçu. Disponível em: <<http://www.bibvirt.futuro.usp.br>>. Acessado em: 20 maio 2010.

VALENTE, A.L.P.; COLLINS, C.H.; MANFREDI, J.E. Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência, *Química Nova*, **103: 1983.**

ZYLBERSZTAJN, D.; MARQUES, C. A. S.; NASSAR, A. M.; PINHEIRO, C. M.; MARTINELLI, D. P.; ADEODATO S. NETO, J.; MARINO, M. K.; NUNES, R. Reorganização do agronegócio do babaçu no estado do Maranhão. Relatório técnico. Grupo Pensa - USP, São Paulo. 120p. 2000.

WOOD, R. How to validate analytical methods, *Trends in analytical chemistry*, **18: 624, 1999.**