

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
A ANÁLISE DE ÓLEO DE ARROZ

Mestranda: Vanessa Aguiar Santestevan

Orientadora: Prof. Dra. Elina Bastos Caramão (IQ/UFRGS)

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Regina Alves Rodrigues (DQO/IQG-UFPEL)

Porto Alegre, Abril de 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

VANESSA AGUIAR SANTESTEVAN

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA
A ANÁLISE DE ÓLEO DE ARROZ**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a
obtenção do grau de Mestre em Química

Profa. Dra. Elina Bastos Caramão
Orientadora

Profa. Dra. Maria Regina Alves Rodrigues
Coorientadora

Porto Alegre, Abril/2011.

A presente dissertação foi realizada inteiramente pelo autor, exceto as colaborações as quais serão devidamente citadas nos agradecimentos, no período entre (Março/2009) e (Março/2011), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Elina Bastos Caramão e Coorientação da Professora Doutora Maria Regina Alves Rodrigues. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Dr. Jailson Bittencourt de Andrade

Dra. Claudia Alcaraz Zini

Dra. Rosângela Assis Jacques

Dra. Ana Cristina Borba da Cunha

Dra. Elina Bastos Caramão
(Orientadora)

Dra. Maria Regina Alves Rodrigues
(Coorientadora)

Vanessa A. Santestevan

DEDICATÓRIA

*Vitor e Luiza,
a combinação perfeita de pais.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elina Bastos Caramão, por todo apoio profissional e pessoal, pelos ensinamentos, confiança e pela orientação desse trabalho;

À Profa. Dra. Maria Regina Alves Rodrigues, pela amizade, carinho e entusiasmo de todos os dias, pela atenção, ajuda, por tanta dedicação e orientação. Obrigada por fazer a química parecer mais interessante e divertida;

À Dra. Valéria Flores, pela amizade, ensinamentos, dedicação, comprometimento e colaboração no desenvolvimento e correção deste trabalho;

Aos professores e funcionários do Instituto de Química por passarem seus conhecimentos e pela convivência;

À UFRGS pela infra-estrutura e ao CNPq pela bolsa de estudo;

Aos colegas e amigos do LAAO, pela convivência e constante aprendizado, pela ajuda e as boas risadas. Em especial, à Márcia Brasil, Bruna, Márcia Manique, Liliane, Michele, Janaína e Fernando;

Às amigas químicas, Camila, Talita, Tanara, Melissa, pela amizade, carinho, pelos momentos de alegrias, pelo apoio nos momentos difíceis durante essa jornada. Também aos amigos não químicos, por compreenderem a ausência em alguns momentos;

Um agradecimento mais que especial, aos meus pais, que sempre se privaram e se dedicaram para me proporcionar tudo de melhor, por todo incentivo, pelos conselhos nos momentos de dúvida, por toda força e exemplo de vida de vocês, enfim, por todo amor. Muito obrigada é pouco!!!

À minha irmã, pelo carinho, compreensão e companheirismo;

Ao Roberto, por todo amor, incentivo, apoio, por estar sempre disposto a ouvir e/ou ajudar, por ser companheiro de estudo, mesmo nos finais de semana.

TRABALHOS GERADOS POR ESTA DISSERTAÇÃO

Trabalhos apresentados em congressos sob as formas de resumo e pôster

Vanessa A. Santestevan, Gabriela H. Hörnke, Elina B. Caramão e Maria Regina A. Rodrigues. **Determinação simultânea dos tocoferóis e γ -orizanol no óleo de arroz integral, usando MS/MS.** In: 15^o Encontro Nacional Química Analítica-ENQA e 3^o Congresso Iberoamericano de Química Analítica-CIAQA, 2009, Salvador, Ba. (Apresentação oral)

Vanessa A. Santestevan, Gabriela H. Hörnke, Elina B. Caramão e Maria Regina A. Rodrigues. **Mass spectrometry (ESI-MS) analysis of the tocopherols, γ -oryzanol and free fatty acids in rice oil.** In: Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas -BrMass, 2009, Campinas, SP.

Maria Regina Alves Rodrigues, Vanessa Aguiar Santestevan, Valéria Flores Perez, Gilberto Arcanjo, Elina Bastos Caramão. **Direct injection of rice oil in LC-PDA-ESI-MS/MS for identification of γ -oryzanol and FFA constituents.** In: 34^o International Symposium on Capillary Chromatography- ISCC, 2010, Riva Del Garda, Itália.

Vanessa A. Santestevan, Valéria F. Péres, Elina Bastos Caramão, Maria Regina A. Rodrigues. **Determinação do gama-orizanol, ácidos graxos livres e tocóis no óleo do grão de arroz por LC-ESI-MS.** 4^o Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins-Sincro, 2010, Campos do Jordão, SP.

SUMÁRIO

SUMÁRIO	I
ÍNDICE DE TABELAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	V
RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	4
Objetivo geral	4
Objetivos específicos	4
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
2.1 ARROZ (<i>Oriza sativa</i>)	6
2.2 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ARROZ	10
2.3 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO DE ARROZ	13
2.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS	17
2.4.1 Cromatografia em Fase Gasosa: GC-FID	17
2.4.2 Espectrometria de Massa	17
2.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	21
3 PARTE EXPERIMENTAL	24
3.1 AMOSTRAS	24
3.2 SOLVENTES, PADRÕES E REAGENTES	24
3.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DO FARELO E DA FARINHA DE ARROZ	25
3.4 ANÁLISE DOS ÓLEOS DE FARELO E FARINHA DE ARROZ	26
3.4.1 Condições de análise no sistema ESI-MS/MS	27
3.4.1.1 Preparo dos padrões e das amostras	27
3.4.1.2 Análise instrumental direta (ESI-MS/MS)	27
3.4.1.3 Análise instrumental cromatográfica (LC-ESI-MS/MS)	28
3.4.2 Condições de análise no LC-DAD e LC-DAD-ESI-MS/MS	29
3.4.2.1 Preparo dos padrões e das amostras	29
3.4.2.2 Parâmetros da validação do método de quantificação de γ -orizanol	31
3.4.2.2.1 Análise Instrumental: LC-DAD e LC-DAD-ESI-MS/MS	33

3.4.3 Condições de análise no GC-FID.....	34
3.4.3.1 Preparo das amostras e dos padrões.....	34
3.4.3.2 Análise quantitativa dos ácidos graxos via GC-FID.....	35
3.4.3.3 Análise Instrumental: GC-FID.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO	38
4.2 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES DA VITAMINA E.....	39
4.2.1 ESI-MS/MS.....	39
4.2.2 LC-ESI-MS/MS e LC-DAD-MS-ESI	41
4.2.3 Considerações sobre as técnicas de análise da vitamina E.....	46
4.3 ANÁLISE DOS ÁCIDOS GRAXOS	47
4.3.1 Ácidos graxos livres: Análise por ESI-MS/MS e LC-ESI-MS/MS.....	47
4.3.2 Ácidos graxos totais: Análise por GC-FID	55
4.3.3 Considerações sobre as técnicas na análise dos ácidos graxos.....	58
4.4 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES DA FRAÇÃO DE γ-ORIZANOL	58
4.4.1 Análise quantitativa de γ -orizanol usando LC-DAD	64
4.4.1.1 Validação da metodologia LC-DAD	66
4.4.1.1.1 Seletividade.....	66
4.4.1.1.2 Linearidade e Intervalo linear	68
4.4.1.1.3 Precisão e Exatidão.....	71
4.4.1.1.4 Robustez	74
4.4.2 Considerações sobre as técnicas para análise do γ -orizanol.....	75
5 CONCLUSÕES.....	77
5.1 CONCLUSÃO GERAL	77
5.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS.....	77
5.2.1 Extração do óleo de arroz	77
5.2.2 Técnicas analíticas.....	77
5.2.3 Composição química das amostras	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I: Identificação de tocóis, γ -orizanol e ácidos graxos em amostras alimentares.....	15
Tabela II: Condições cromatográficas do equipamento LC-ESI-MS/MS	29
Tabela III: Condições empregadas no LC-DAD.....	33
Tabela IV: Rendimento em massa (%) das extrações de óleo fixo.....	38
Tabela V: Concentração dos ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes nas amostras de óleo de farelo e de farinha dos grãos de arroz integral parboilizado.....	56
Tabela VI: Dados do ESI-MS para os constituintes do γ -orizanol no óleo de farelo e de farinha de arroz.	61
Tabela VII: Concentração da fração de γ -orizanol nas amostras.....	65
Tabela VIII: Índice de similaridade entre o padrão e as amostras.	67
Tabela IX: Resultados da curva da linearidade para os constituintes do γ -orizanol, por LC-DAD.	69
Tabela X: Resultados da análise da regressão da curva de linearidade	70
Tabela XI: Análise da variância da curva de linearidade.	70
Tabela XII: Precisão intra-dia das amostras de óleo de farelo e de grão de arroz integral parboilizado.	72
Tabela XIII: Resultados de precisão inter-dia para a análise das amostras de óleo de farelo e grão de arroz.	72
Tabela XIV: Resultados da exatidão.....	73
Tabela XIV: Resultados obtidos para os testes de robustez do método de determinação da fração de γ -orizanol em óleos de arroz por LC-DAD.....	74

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Comparação entre a safra 09/10 e 10/11 de área plantada de arroz, realizada pela CONAB em Janeiro de 2011. Valores em 1.000 toneladas ⁷	7
Figura 2: Comparação entre a safra 09/10 e 10/11 de arroz, realizado pela CONAB em Janeiro de 2011. Valores em 1.000 toneladas ⁷	7
Figura 3: Balanço de oferta e demanda de arroz no Brasil das safras de 2005/06 até 2010/11. Fonte: CONAB - levantamento: Jan/2011.	8
Figura 4: Fluxograma das etapas de beneficiamento do arroz, apresentando produtos e subprodutos dos diversos processos.	9
Figura 5: Estruturas dos constituintes dos tocoferóis e tocotrienóis (α , β , γ e δ). .	11
Figura 6: Fórmulas estruturais dos ácidos graxos insaturados: oléico, linoléico e linolênico	11
Figura 7: Fórmulas estruturais dos principais componentes do γ -orizanol.	13
Figura 8: Analisador <i>ion trap</i> , onde RF indica radio frequência e DC corrente contínua.....	18
Figura 9: Fonte de ionização a Pressão Atmosférica (API) e sistema de vácuo. .	19
Figura 10: Mecanismo de formação de íons na técnica de ionização por “electrospray” (ESI).	20
Figura 11: Esquema representativo de uma fonte de ESI.....	20
Figura 12: Fluxograma das amostras e dos óleos obtidos a partir da extração com Soxhlet. <i>Siglas: OFAI = óleo de farelo de arroz integral; OFAIP = idem, parboilizado; OFGABP = óleo de farinha de grão de arroz branco polido; OFGAPP = idem parboilizado polido e OFGAIP = idem integral parboilizado.</i>	25
Figura 13: Fluxograma das análises realizadas no desenvolvimento do trabalho experimental.....	26
Figura 14: Esquema representativo do preparo das amostras.....	31
Figura 15: Reação de derivatização com BF ₃	34

Figura 16: Espectrograma ESI-MS e MS/MS do padrão de γ -Tocoferol (A, A') e α -Tocoferol (B, B').	40
Figura 17: Espectrograma ESI-MS da amostra OFAIP com ênfase para os íons correspondentes ao α e γ -tocoferol (m/z 429,3 e 415,1).	40
Figura 18: Cromatogramas do íon total (LC-ESI-MS/MS) da mistura de padrões α e γ -tocoferol (A) e da amostra OFAIP (D); Cromatogramas do íon extraído de cada padrão separadamente (B e C) e espectros de massa dos dois compostos (B' e C').	42
Figura 19: Cromatogramas obtidos via LC-DAD das amostras de óleos: (A) OFGAIP; (B) OFGAPP; (C) OFGABP; (D) OFAIP e (E) OFAI, com uma ampliação do cromatograma dos padrões em (F), $\lambda = 290 \pm 10$ nm.	44
Figura 20: Espectros de massa obtidos pelo acoplamento LC-DAD-ESI-MS/MS, no modo negativo, da amostra de óleo de farelo de arroz integral parboilizado nos tempos de retenção do γ e α -tocoferol (42,8 e 45,9 min).	46
Figura 21: Espectrogramas ESI-MS dos pseudos-íons moleculares $[M-H]^{-1}$, no modo negativo, dos padrões do ácido (a) linolênico, (b) linoléico e (c) oléico, e espectro via ESI-MS dos pseudo-íons moleculares $[M-H]^{-}$, no modo negativo, da amostra OFAIP (d). Em destaque os ácidos linolênico (m/z 277), linoléico (m/z 279) e oléico (m/z 281).	48
Figura 22: Espectrograma ESI-MS e MS/MS da amostra de óleo de farelo de arroz integral parboilizado, onde (A) é o espectro de massa dos pseudos-íons moleculares $[M-H]^{-}$ do ácido linolênico (B) do ácido linoléico e (C) do ácido oléico. E (A'), (B') e (C') os espectros dos fragmentos (MS/MS ou MS ₂) dos pseudos-íons moleculares dos respectivos ácidos.	49
Figura 23: Cromatograma do íon total, via LC-ESI-MS/MS, da mistura dos padrões do ácido linolênico, linoléico e oléico (A), íon extraído de cada composto (B, C e D), seus respectivos espectros de massa (B', C' e D') e (E) cromatograma do íon total obtido para a amostra OFAIP.	51
Figura 24: Cromatogramas obtido via LC-DAD das soluções dos padrões dos ácidos graxos: (A) linolênico; (B) linoléico; (C) oléico e das amostras de óleo de farelo de arroz (D) e de farinha de grão de arroz (E), $\lambda = 190 \pm 10$ nm.	53
Figura 25: Cromatograma das amostras de óleo de farelo (A) e de farinha (B) de arroz integral parboilizado derivatizadas com BF ₃ .	56

Figura 26: Espectrograma ESI-MS no modo negativo da solução padrão do γ -orizanol.....	59
Figura 27: Espectro de massas obtido por ESI-MS no modo negativo da amostra OFAIP. Com os pseudo-íons moleculares em destaque: m/z 575, m/z 589, m/z 601, m/z 615.....	59
Figura 28: Espectro ESI-MS e ESI-MS/MS no modo negativo da solução padrão do γ -orizanol, onde em (A) é mostrado o espectro (MS) dos pseudos-íons moleculares $[M-H]^-$ do ferulato de campesterila, em (B) do ferulato de sitosterila, em (C) do ferulato de cicloartanila e em (D) do ferulato de ciclobranila. (A'), (B'), (C') e (D') são os espectros dos fragmentos (MS/MS ou MS ₂) dos pseudos-íons moleculares $[M-H-Me]^-$ dos respectivos compostos.	60
Figura 29: Cromatograma do íon total para a amostra OFAIP (A) e cromatogramas de íons extraídos e espectros de massa para os compostos (B e B') ferulato de cicloartenila, m/z 601; (C e C') ferulato de ciclobranila, m/z 615; (D e D') ferulato de campesterila m/z 575; (E e E') ferulato de sitosterila m/z 589. Dados obtidos na análise LC-ESI-MS da solução padrão dos constituintes do γ -orizanol.	62
Figura 30: Cromatogramas obtidos via LC-DAD das amostras de óleos de farelo de arroz (A) e de farinha dos grãos de arroz (B), $\lambda = 320 \pm 10$ nm	63
Figura 31: Cromatograma obtido por LC-DAD para o branco da amostra (solvente – acetonitrila:metanol:iso-propanol).....	66
Figura 32: Cromatogramas LC-DAD que demonstra a pureza dos picos do γ -orizanol em seus respectivos tempo de retenção.	67
Figura 33: Curva analítica para os constituintes do padrão γ -orizanol, obtida por LC-DAD.....	68
Figura 34: Gráfico dos resíduos para a determinação quantitativa do γ -orizanol, por LC-DAD.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

OFAI: óleo de farelos de arroz integral

OFAIP: óleo de farelos de arroz integral parboilizado

OFGAP: óleo da farinha do grão de arroz parboilizado

OFGAIP: óleo da farinha do grão de arroz integral parboilizado

OFGABP: óleo da farinha do grão de arroz branco polido

α -T: α -tocoferol

γ -T: γ -tocoferol

APCI: Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

API: Ionização à Pressão Atmosférica (do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*)

CID: Dissociação Induzida ou Ativada por Colisão (do inglês *Collision Induced Dissociation*)

MAG: Monoacilgliceróis

DAG: Diacilgliceróis

TAG: Triacilgliceróis

GABA: ácido γ -aminobutírico (do inglês, *Gamma-AminoButyric Acid*)

FFA: ácidos graxos livres (do inglês *Free Fatty Acids*)

PL: fosfolipídeos

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

FAO: Organização Americana de Alimentos e Agricultura (do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

CONAB: Companhia Nacional de Abastecimento

ICH: International Conference on Harmonisation

FM: Fase Móvel

LC-DAD: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodos (do inglês *High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector*)

LC-DAD-ESI-MS: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo de Diodo acoplada à Espectrometria de Massas com Ionização por Eletrobulbulização (do inglês *High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector coupled to Mass Spectrometry with Electrospray ionization*)

LC-MS/MS: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massa (do inglês *High Performance Liquid Chromatography with Mass Spectrometer Detector*)

LC-ESI-MS: Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massa com Ionização por *Electrospray* (do inglês *Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry with Electrospray Ionization*)

LC-UV-ESI-MS/MS: Cromatografia Líquida com Detector de Ultravioleta Acoplado à Espectrometria de Massa com Ionização por *Electrospray* (do inglês *Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector coupled to Mass Spectrometry with Electrospray ionization*)

ESI: Ionização por eletronebulização (do inglês *Electrospray Ionization*)

HPSEC-ELSD: Comatografia de Alta Eficiência por Exclusão de Tamanho com detector Evaporativo de Espalhamento de Luz (do inglês, *High Performance Size Exclusion Chromatography with Evaporative Light Scattering Detector*)

UV: Ultravioleta

GC/FID: Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama (do inglês, *gas chromatograph with flame ionization detector*)

m/z: razão massa-carga

PTFE: Teflon ou Politetrafluoretileno

QqQ: triplo quadrupolo

RF: radio frequência

DC: corrente contínua

RF: Fase Reversa (do inglês *Reverse Phase*)

NP: Fase Normal (do inglês *Normal Phase*)

PE: Ponto de Ebulição

S_E: Soluções Estoque

S_T: Soluções de Trabalho

A_a: área do pico cromatográfico

ma: massa da amostra em µg

FD: fator de diluição

b: coeficiente linear da reta

a: coeficiente angular da reta

fd: Fator de diluição

m: massa de amostra na solução analisada, em µg.

ACN: acetonitrila

MeOH: metanol

Iso-PrOH: isopropanol

DP: desvio padrão

DPR: desvio padrão relativo

R_%: percentual de recuperação em relação à quantidade adicionada

C_r: concentração real encontrada das amostras, em $\mu\text{g mL}^{-1}$

C_t: concentração teórica das amostras, em $\mu\text{g mL}^{-1}$

C_{i%}: concentração percentual do composto i na amostra

C_{i sol padrão}: concentração do composto i da solução padrão, em mg.mL^{-1}

A_{amostra}: área encontrada da amostra

A_{padrão i}: área do padrão do composto i

P_{amostra}: massa de amostra na solução analisada, em mg

RESUMO

O arroz é um importante produto agrícola brasileiro com destaque na produção para o Rio Grande do Sul. Neste trabalho estudou-se a composição química de óleos de farelo e farinha de arroz produzido no Rio Grande do Sul. Os óleos do farelo de arroz integral e integral parboilizado, e da farinha dos grãos do arroz integral parboilizado, parboilizado polido e branco polido foram obtidos por extração com Soxhlet. Foram pesquisados os tocóis (tocoferóis e tocotrienóis), ácidos graxos (livres e ligados) e γ -orizanol. Os óleos foram caracterizados através espectrometria de massa com ionização por eletronebulização (ESI-MS/MS), cromatografia líquida com detector de arranjo de diodo (LC-DAD), acoplamentos LC-DAD-ESI-MS, LC-ESI-MS/MS, além da cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID). O farelo de arroz apresentou maior teor de óleo que a farinha dos grãos, como também maiores concentrações dos ácidos graxos. No óleo do farelo de arroz integral foi encontrada a maior concentração dos constituintes da fração do γ -orizanol. A vitamina E foi detectada em pequena quantidade nos óleos analisados. A metodologia de análise quantitativa por LC-DAD, da fração do γ -orizanol foi realizada considerando os principais parâmetros (seletividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez) de acordo com guia de validação do International Conference on Harmonisation (ICH).

ABSTRACT

Rice is an important Brazilian agricultural product and Rio Grande do Sul is its major producer. Oil composition of rice bran and rice flour produced in Rio Grande do Sul was investigated in this work. The oils from integral and brown parboiled rice bran, flour from grain parboiled brown rice, parboiled polished and polished white were obtained by Soxhlet extraction. Tocopherols and tocotrienols, fatty acids (free and bound) and γ -oryzanol also were analyzed in this work. The oils were characterized by mass spectrometry with electrospray ionization (ESI-MS/MS), liquid chromatography with diode array detector (LC-DAD), tandem LC-DAD-ESI-MS, LC-ESI-MS/MS and gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID). Rice bran had a higher oil content than the flour of grains, as well as higher concentrations of fatty acids. In oil rice bran was found the highest concentration of the fraction of γ -oryzanol. Vitamin E was detected in small amounts in the oils analyzed. The methodology of quantitative analysis of γ -oryzanol fraction, by LC-DAD, was validated considering selectivity, linearity, precision, accuracy and robustness as main parameters, in accordance with International Conference on Harmonisation (ICH) validation guide.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O arroz (*Oriza sativa*) é considerado um alimento básico na alimentação da população brasileira, avaliado como o segundo alimento mais consumido no mundo e está presente na mesa de dois terços da população mundial, sendo a China um dos maiores consumidores. Constitui-se na terceira maior cultura cerealífera do mundo, apenas ultrapassado pelo milho e trigo. O arroz branco é o mais consumido, entretanto, produtos que contenham farinha de arroz (grão triturado) como ingredientes têm surgido no comércio.

Até chegar a forma de ser adquirido pelo consumidor, o arroz passa por um processo de beneficiamento, sendo as principais formas de arroz beneficiado: branco polido, integral e parboilizado. O processo pelo qual os grãos irão ser submetidos durante o beneficiamento é diferente em cada um dos casos. O valor nutritivo e a cor também estão relacionados ao processo de beneficiamento.

O arroz depois de recebido no engenho é seco, descascado e os grãos inteiros seguem para o brunidor que retira uma parte da camada escura, chamada de farelo. Nessa etapa os grãos, que já estão mais brancos e levemente opacos, serão enviados para o polidor, deixando-os com aspecto vítreo. Ocorre, então, a separação dos grãos inteiros da quirera fina (grãos quebrados) e dos grãos descascados daqueles que não foram descascados, estando pronto para ser embalado e comercializado, sendo este, o arroz branco polido¹.

O arroz integral passa pelo mesmo processo de beneficiamento do arroz branco polido, porém a brunição é feita de maneira mais branda. Apenas a camada mais externa é removida, permanecendo o germe e o farelo, motivo pelo qual é considerado um arroz mais nutritivo, além de possuir textura e sabor diferenciados. Devido ao fato do arroz integral ser um grão *in natura*, apenas descascado, possui alta atividade enzimática, dificultando sua conservação, e por consequência, reduzindo o tempo de prateleira².

O processamento do arroz parboilizado passa por outras três etapas. Após uma primeira secagem o grão passa pelo processo de encharcamento em autoclave, no qual a água provoca a migração dos componentes solúveis do grão (vitaminas hidrossolúveis e sais minerais), da camada externa (película e germe)

Introdução

para o interior do grão, enriquecendo-o sob o ponto de vista nutricional. Normalmente esse procedimento ocorre num intervalo de tempo de 6 a 9 horas com temperatura em torno de 65 °C. Essa fase é responsável pelas alterações de cor e aumento do valor nutricional do arroz. A etapa seguinte é chamada de gelatinização, que promove a fixação dos nutrientes transferidos no encharcamento. A gelatinização do amido é realizada em autoclave e promove a eliminação de microrganismos, inativando assim as enzimas, sendo responsável, inclusive, por propiciar um tempo de vida de prateleira maior. A última etapa específica do processo de parboilização consiste em fazer o arroz voltar ao seu teor inicial de umidade (aproximadamente 13%), através de uma segunda secagem^{1,2}.

No processo de beneficiamento do arroz há a geração de subprodutos que podem ser reutilizados com diferentes finalidades. Por exemplo, a casca retirada dos grãos é um importante subproduto, pois pode ser utilizada para geração de energia, fabricação de sabão abrasivo e na composição de fertilizantes, entre outros.

Outro subproduto muito importante é o farelo de arroz, uma das partes mais nutritivas do arroz, que constitui a matéria-prima para extração (com uso de solventes ou prensagem mecânica) do óleo de arroz. Pode ser reutilizado na indústria cosmética e farmacêutica, ou ainda como óleo comestível, após ser refinado. Os alimentos fritos no óleo de arroz industrializado apresentam melhores qualidades sensoriais (crocância, odor e sabor), além de constituírem um alimento de melhor qualidade nutricional. Esse óleo comestível tem recebido atenção por apresentar expressivo conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados, de compostos nutracêuticos, como o γ -orizanol e também de tocoferóis e tocotrienóis, conhecidos como tocóis. Entretanto, apesar de seu alto valor nutritivo, o farelo de arroz é habitualmente empregado na produção de ração animal.

Há também a quirera de arroz (grãos quebrados) como subproduto resultante do beneficiamento de arroz, de baixo valor comercial e que pode ser utilizada em ração animal e na indústria de cerveja.

A composição do grão de arroz vai depender de alguns fatores como tipo de cultivar, tratamento do grão antes do beneficiamento, sistema de beneficiamento empregado e grau de polimento ao qual o grão foi submetido. Os

grãos podem apresentar formatos, aspecto, cor e odores diferentes. Além disso, os nutrientes não estão uniformemente distribuídos nas diferentes frações do grão.

É importante, portanto, identificar e quantificar os constituintes do arroz e seus subprodutos, para melhor utilizar este insumo agrícola. Para isso, é necessário o desenvolvimento de um método analítico eficiente. Observa-se que existem poucos estudos na literatura sobre o isolamento e quantificação dos compostos presentes no óleo de arroz.

O desenvolvimento e validação de novos métodos analíticos são importantes para obtenção de resultados confiáveis, além de possibilitar o conhecimento das limitações das análises.

A cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (HPLC-DAD) é uma eficiente técnica para a análise química, qualitativa e quantitativa das mais variadas amostras. Possui diversas aplicações, podendo ser citadas: amostras ambientais (pesticidas), amostras alimentares (vitaminas, compostos fenólicos, etc.), compostos farmacêuticos (drogas de abuso, antibióticos, etc.), entre outras.

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) permitiu grandes avanços na tentativa de elucidar estruturas complexas como, por exemplo, as estruturas do γ -orizanol. É uma técnica que combina a capacidade de separação da cromatografia líquida, com a sensibilidade da detecção de separação da espectrometria de massas.

Um dos últimos trabalhos publicados sobre análise de óleo de arroz via LC-ESI-MS são de Fang³ (2003) e Yu⁴ (2007), sendo inclusive do mesmo grupo de pesquisa. É importante destacar que o primeiro realiza apenas identificação dos constituintes do γ -orizanol em óleo de farelo de arroz, e o segundo a análise do germe e do farelo de arroz de somente um tipo de arroz.

Face ao exposto, o presente trabalho corrobora a importância da pesquisa na determinação dos constituintes dos óleos de farelos de arroz integral (OFAI) e integral parboilizado (OFAIP) e dos óleos obtidos das farinhas dos grãos de arroz parboilizado polido (OFGAPP), integral parboilizado (OFGAIP) e branco polido (OFGABP). Para isso, serão aplicados métodos cromatográficos (GC e LC) e técnicas espectroscópicas (UV-DAD e MS).

1.1 OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver metodologia analítica para a identificação dos constituintes presentes nos óleos de farelo de arroz (integral e integral parboilizado) e de farinha de arroz (integral, integral parboilizado, parboilizado polido e branco polido) e quantificação do γ -orizanol.

Objetivos específicos

- ❖ Extrair o óleo do farelo e da farinha arroz (integral, integral parboilizado, parboilizado polido e branco polido);
- ❖ Isolar e identificar os constituintes dos óleos através da cromatografia líquida de alta eficiência (LC), da espectrometria de massas (ESI-MS) e dos acoplamentos LC-DAD-ESI-MS e LC-ESI-MS;
- ❖ Utilizar a cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID) na análise e quantificação dos ácidos graxos presentes nos óleos extraídos;
- ❖ Utilizar a cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos para a análise e quantificação dos constituintes do γ -orizanol nos óleos extraídos;
- ❖ Validar o método analítico para análise do teor de γ -orizanol nas amostras de óleos de arroz;
- ❖ Realizar um estudo comparativo entre os dados obtidos para os óleos de farelo e de farinha do grão de arroz.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ARROZ (*Oriza sativa*)

Na literatura chinesa são encontradas as mais antigas referências sobre o arroz, há cerca de 5.000 anos. Porém, bem antes de qualquer evidência histórica, há indícios de que o arroz foi, provavelmente, o principal alimento e a primeira planta cultivada no sudeste da Ásia, que seria o local de origem do arroz. No Brasil, foi introduzido em 1530, no Rio Grande do Sul, e, em Mato Grosso, por volta de 1940 em roça de toco e, na década de 70, com o surgimento da agricultura mecanizada⁵.

Assim como a produção, o consumo de arroz no mundo concentra-se nos países do sudeste asiático. Intimamente agregado à cultura da região, o consumo *per capita* de arroz nos países do sudeste asiático é muito superior aos dos demais países ocidentais. Segundo dados da Organização de alimento e agricultura dos Estados Unidos (FAO)⁶, o consumo brasileiro de arroz é de aproximadamente 52,5 quilogramas por habitante por ano (base casca). Embora o consumo mundial médio por habitante ser inferior (84,8 kg/hab/ano), este valor é considerado alto se comparado com o consumo *per capita* dos países desenvolvidos (16,7 kg/hab/ano).

Dados da CONAB⁷ indicam que apesar da redução das culturas de verão - arroz sequeiro ou arroz de terras altas - a produção de arroz no Brasil deve ser maior que a da safra anterior, compensada, principalmente, pelo aumento de área cultivada na região Sul (5,5%).

A produção nacional de arroz da safra 2010/11 deve ficar em 12.628,2 mil toneladas havendo um incremento em torno de 8,3% (967,3 mil toneladas) em relação à safra 2009/10⁷.

Nas Figuras 1 e 2 são apresentados dados comparativos da safra de 2009/2010 em relação à safra de 2010/2011 (considerando Dezembro/2010 e Janeiro/2011), para área plantada e para a produção de arroz, respectivamente.

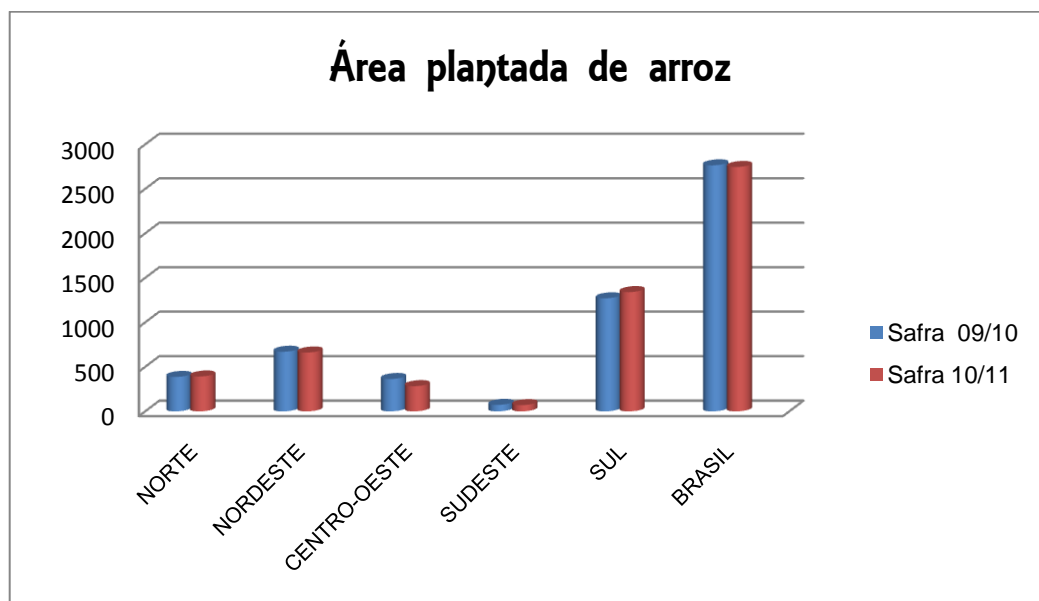


Figura 1: Comparação entre a safra 09/10 e 10/11 de área plantada de arroz, realizada pela CONAB em Janeiro de 2011. Valores em 1.000 toneladas⁷.

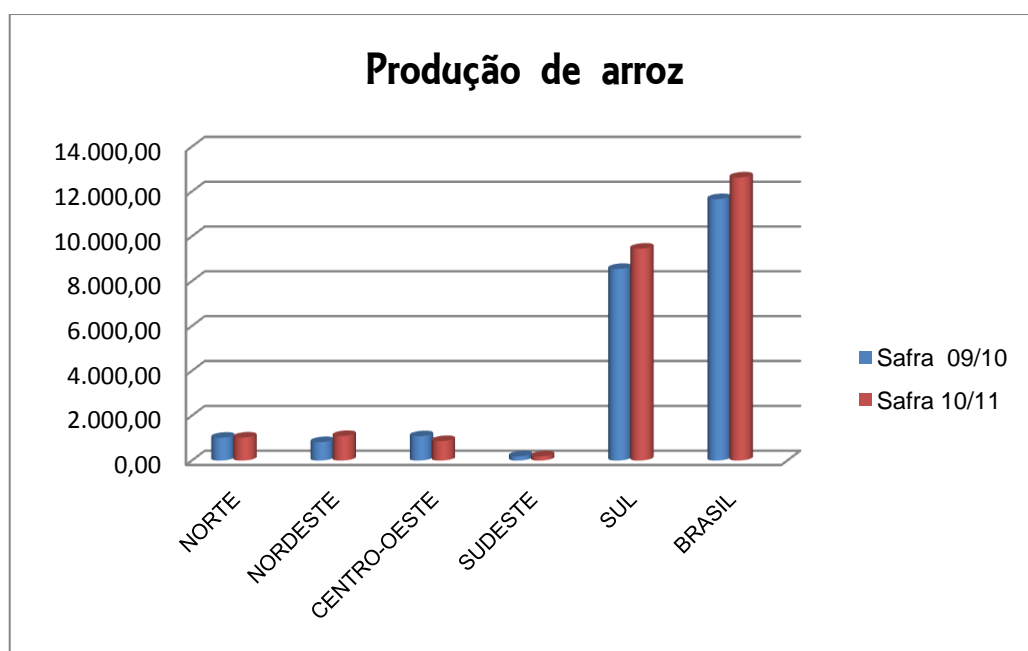


Figura 2: Comparação entre a safra 09/10 e 10/11 de arroz, realizado pela CONAB em Janeiro de 2011. Valores em 1.000 toneladas⁷.

Analisando os gráficos da Figura 1 e 2, percebe-se que o cultivo do arroz irrigado está presente em todas as regiões brasileiras, mas destaca-se a Região Sul, que é responsável, atualmente, por 60 % da produção total deste cereal.

Uma comparação entre as safras de 2005/06 até 2010/11 é mostrada na Figura 3. Neste gráfico constam dados da produção, consumo, importação e exportação de arroz no Brasil. Percebe que há pouca diferença entre os valores de produção e consumo nos últimos anos. Pode-se concluir, também, que a maior parte da produção nacional se destina ao consumo interno, pois tanto a importação como a exportação referem-se a valores pequenos e que apresentam pouca variabilidade com o tempo.

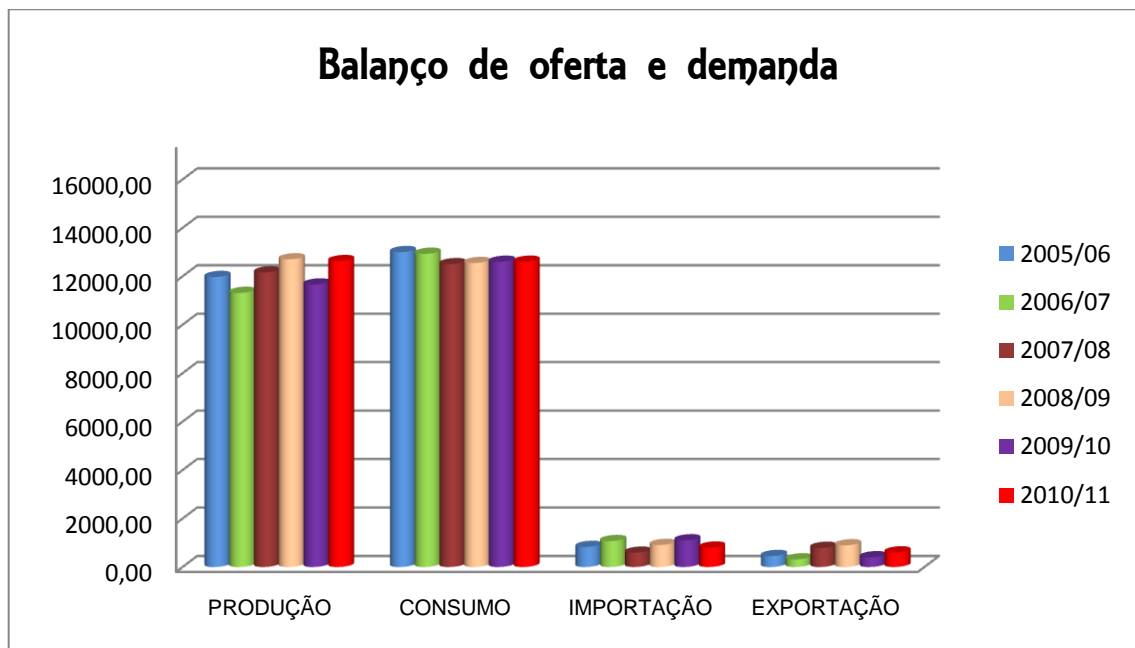


Figura 3: Balanço de oferta e demanda de arroz no Brasil das safras de 2005/06 até 2010/11. Fonte: CONAB - levantamento: Jan/2011.

O beneficiamento deste cereal produz quatro tipos de arroz: integral, branco polido, integral parboilizado e parboilizado polido. As etapas desse beneficiamento estão descritas na Figura 4.

Dentre as características da aparência do arroz, a cor branca e translúcida do grão é a que mais contribui para a aceitação deste produto por parte do consumidor, o qual corresponde a mais de 70% do consumo. O arroz integral parboilizado tem um consumo entre 22 e 25 % e o integral cerca de 3 a 4 %.

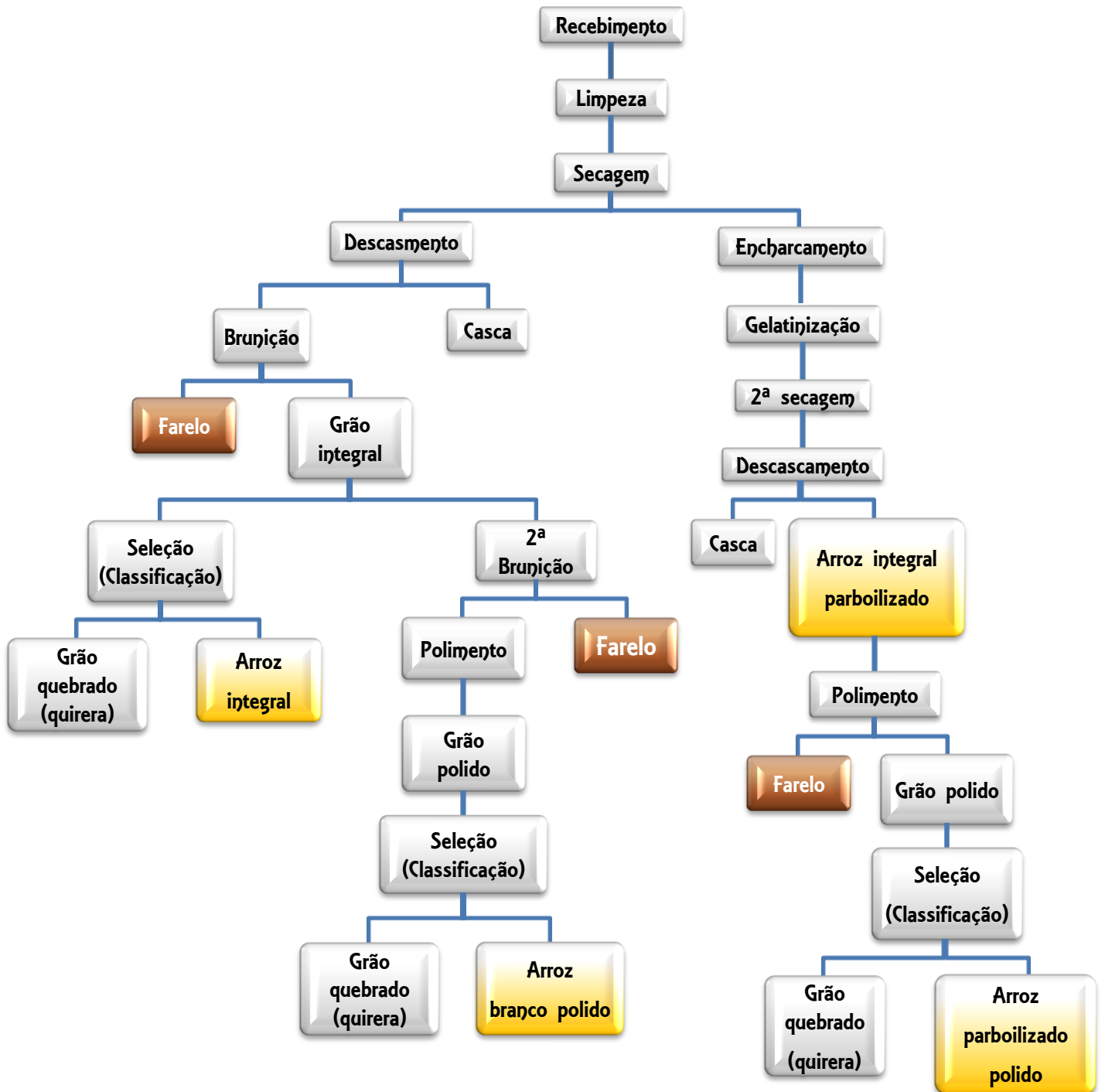


Figura 4: Fluxograma das etapas de beneficiamento do arroz, apresentando produtos e subprodutos dos diversos processos.

O arroz integral apresenta cor marrom devido às camadas de farelo, que são ricas em minerais e vitaminas, como por exemplo, fibras dietéticas, ácidos fítico, vitaminas E e B e do ácido γ -aminobutírico (do inglês, *Gamma-AminoButyric Acid* - GABA), que são removidas durante o processo de beneficiamento⁸. Já o processo de parboilização pode ser resumido como uma ação da água e do calor promovendo a migração e fixação de minerais e vitaminas hidrossolúveis que se encontram na película e germe, que penetram no grão à medida que este absorve água, deixando-o mais rico sob o ponto de vista nutricional⁹.

2.2 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DO ARROZ

Em relação à constituição do arroz, destaca-se a presença fitoquímicos, como carotenóis, tocóis e γ -orizanol. Essas substâncias estão associadas à redução do risco de doenças crônicas^{10,11,12,13}.

O farelo de arroz é um subproduto, gerado a partir do polimento do grão, e seu óleo tem sido relatado como benéfico para a saúde cardiovascular¹⁴. Segundo Zigoneanu¹⁵ e colaboradores, o farelo de arroz contém entre 18 e 22% de óleo e é usado na preparação de alimentos em vários países. Os autores também relatam que o óleo de farelo de arroz contém de 0,10 a 0,14% de vitamina E, entre 0,9 a 2,9% de γ -orizanol, sabendo que estas concentrações podem variar substancialmente de acordo com a origem do arroz.

A vitamina E é um termo genérico para um grupo de quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis (α -, β -, γ - e δ -), conhecidos como tocóis (Figura 5), dos quais o α -tocoferol é o que apresenta maior atividade biológica, exercendo importante papel como inibidor da oxidação dos radicais livres¹⁶. Desde 1922, quando Evans¹⁷ descobriu a vitamina E, foram verificados efeitos positivos no tratamento da síndrome de Parkinson e contra o envelhecimento, capaz de prevenir a doença de Alzheimer e alergias¹⁸. Também tem sido relatada a capacidade de aumentar a imunidade, reduzir o risco de câncer e doenças coronárias^{19,20,21}. Do mesmo modo, o α -tocoferol é conhecido por seus benefícios na diminuição dos índices do colesterol, sua atividade anti-aterogênica e por inibir a oxidação de alimentos^{22,23}.

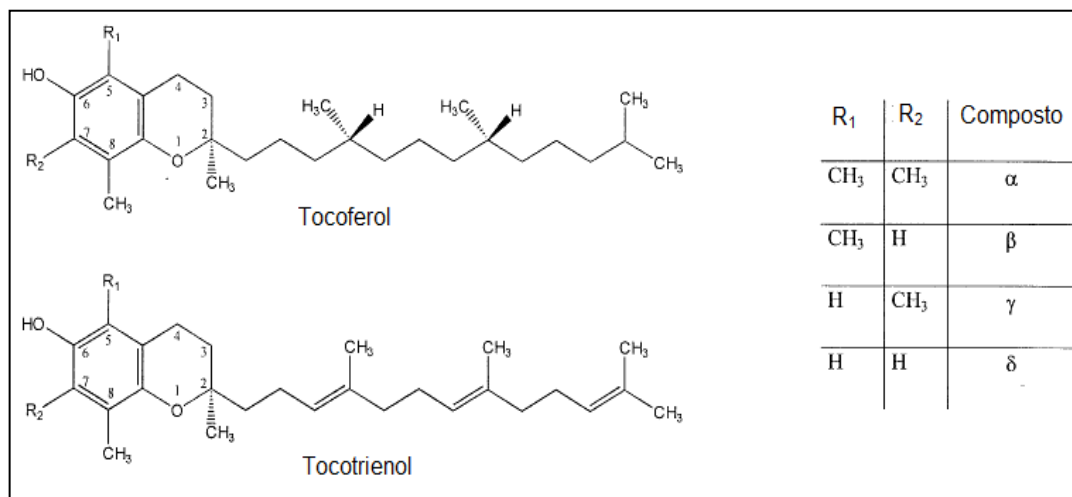


Figura 5: Estruturas dos constituintes dos tocoferóis e tocotrienóis (α, β, γ e δ).

O óleo do farelo de arroz contém cerca de 95% de lipídios saponificáveis, incluindo glicolipídios e fosfolipídios, e 4,2% de compostos insaponificáveis (tocoferóis, tocotrienóis, γ -orizanol, esteróis e carotenóides), enquanto outros óleos apresentam um conteúdo insaponificáveis inferior a 1-2%^{24,25}.

O óleo do farelo de arroz possui uma composição de 81 a 84% triacilgliceróis (TAG), 2 a 3% diacilgliceróis (DAG), 1 a 2% monoacilgliceróis (MAG), 2 a 6% de ácidos graxos livres (FFA, do inglês *Free Fatty Acids*). Ainda, apresenta frações variáveis de ceras, 3 a 4%, glicolipídios, 0,8%, fosfolipídios de 1 a 2 % e lipídios insaponificáveis, 4%²⁵. A Figura 6 mostra as estruturas dos ácidos oléico, linoléico e linolênico, componentes dos ácidos graxos do óleo de arroz.

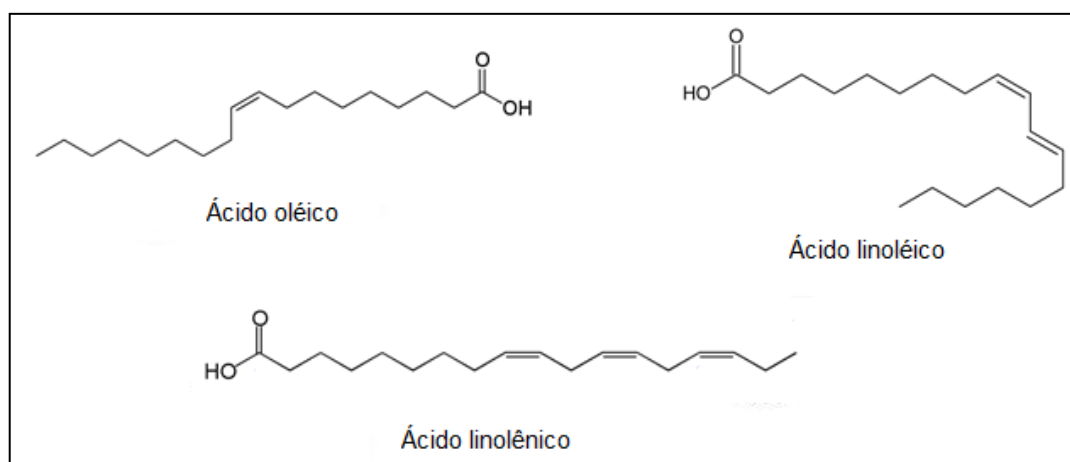


Figura 6: Fórmulas estruturais dos ácidos graxos insaturados: oléico, linoléico e linolênico

Segundo Pestana²⁶, o conteúdo total dos ácidos graxos no farelo corresponde a 18% de saturados, 45% de mono-insaturados e 37% de ácidos graxos poli-insaturados. Os principais ácidos graxos saturados são o ácido palmítico (14 a 17%) e o esteárico (2,0 a 2,5%); e os principais insaturados são os ácidos oléico (40 a 45%), linoléico (35 a 37%) e linolênico (1 a 2%).

Em praticamente todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal são encontrados o ácido oléico, destacando-se como um dos ácidos graxos mais amplamente distribuído na natureza. Os ácidos linoléico e linolênico, do ponto de vista nutricional, são considerados “ácidos graxos essenciais”, e devem ser ingeridos através da dieta, pois não podem ser sintetizados pelo organismo humano²⁶.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)²⁷, considerando a necessidade de maior controle sanitário na área de alimentos, sugere as características mínimas de qualidade a que devem obedecer os óleos e gorduras vegetais, e de acordo com suas normas, no óleo obtido do farelo de arroz, os ácidos graxos insaturados linoléico e oléico devem corresponder à maior concentração na amostra, de 40 a 50% e de 29 a 42%, respectivamente.

Biaggioni e Barros²⁸ realizaram testes que avaliaram o nível de ácidos graxos livres em grãos de arroz envelhecidos artificialmente e amostras comerciais. Como a formação de ácidos graxos livres nos grãos é resultante da hidrólise das gorduras, nesse tipo de análise é possível detectar uma discreta perda de qualidade durante o armazenamento do arroz. Esta análise é interessante, pois além de servir de controle de qualidade para o produto, auxilia na minimização dos prejuízos e no aumento da qualidade fisiológica das sementes.

Um dos principais componentes presentes no óleo de farelo de arroz, é o γ -orizanol, que inicialmente era considerado como um único componente, mas posteriormente foi caracterizado como uma mistura de ésteres de ácido ferúlico de alcoóis triterpênicos (ferulatos de cicloartenila e de ciclobranol) e esteróis (ferulatos de campesterila e de sitosterila)^{3,12,29,30,31}. Na Figura 7 são apresentadas as estruturas dos ferulatos.

Revisão Bibliográfica

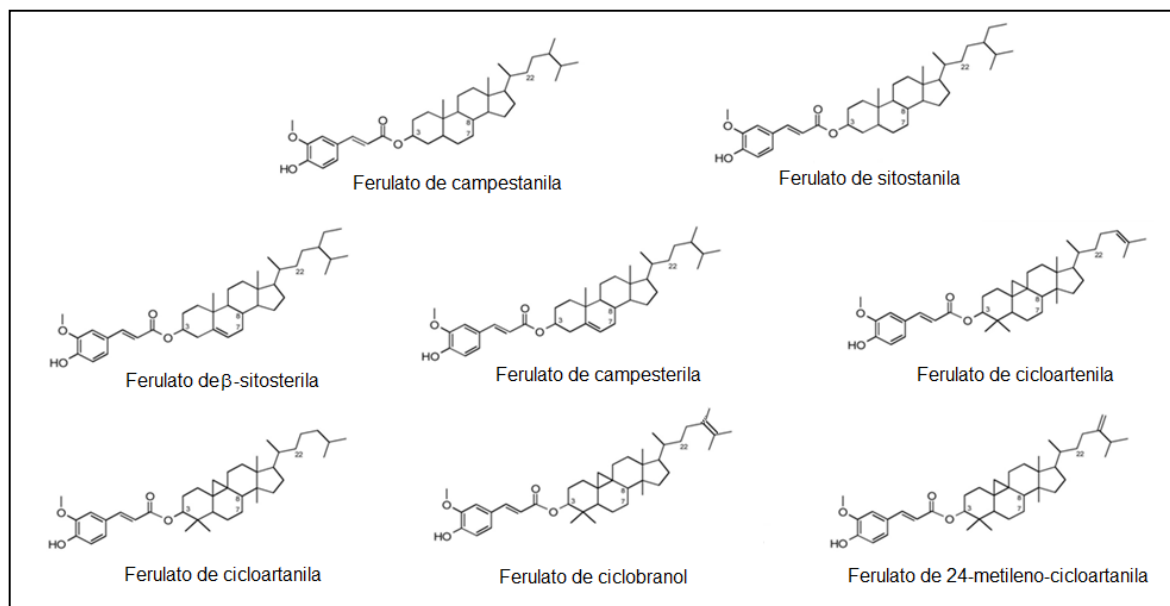


Figura 7: Fórmulas estruturais dos principais componentes do γ -orizanol.

Esse importante fitoquímico, por ser mais resistente ao calor, torna-se mais efetivo que os tocoferóis. Esses compostos apresentam múltiplas ações, como por exemplo, tratamento de úlceras do estresse, efeitos no crescimento, combate a doenças cefálicas e cervicais e à anemia, prevenção da arteriosclerose, entre outros. A fração γ -orizanol além de possuir aplicações nutracêuticas e farmacológicas, também é usada na composição de cosméticos, como antioxidante natural em alimentos, bebidas e cosméticos²⁶. Most¹⁴ e colaboradores afirmaram ter uma redução nas taxas de colesterol no sangue de homens e mulheres que apresentaram consumo de óleo de farelo de arroz em suas dietas.

2.3 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO ÓLEO DE ARROZ

Várias técnicas utilizadas para a extração, isolamento e purificação do óleo de arroz têm sido descritas na literatura^{15,24,29,32,33}.

Diferentes métodos de extração de α -tocoferol e γ -orizanol de farelo de arroz foram estudados por Imsanguan¹⁸ e colaboradores, sendo que o melhor método avaliado foi a extração usando dióxido de carbono como fluido supercrítico, pois apresentou maior rendimento e taxa de extração.

Rúperes³⁴ e colaboradores publicaram uma revisão bibliográfica com 161 artigos, onde analisaram criticamente as diferentes formas de pré-tratamento de amostras e análise desses compostos, além de um estudo sobre as metodologias para análise cromatográfica do α -tocoferol.

A vitamina E foi determinada por vários métodos, usando fase normal ou em fase reversa em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) com detecção por UV e/ou fluorescência^{35,36}.

Yu⁴ e colaboradores identificaram e quantificaram vitamina E e γ -orizanol em farelo e germe de arroz por cromatografia líquida com detector de ultravioleta acoplado à espectrometria de massas com ionização por eletronebulização (LC-UV-ESI-MS/MS, do inglês *Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector coupled to Mass Spectrometry with Electrospray Ionization*), onde constataram que o principal tocol encontrado foi o α -tocoferol no germe e γ -tocotrienol no farelo.

Fang³ e colaboradores identificaram mais de 23 ésteres dos ácidos ferúlico e incluindo o éster do ácido caféico no óleo de farelo de arroz, com o desenvolvimento de uma metodologia usando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa.

A Tabela I apresenta um resumo das técnicas analíticas encontradas na literatura e utilizadas na análise dos tocóis, γ -orizanol e ácidos graxos em amostras alimentares.

Tabela I: Identificação de tocóis, γ -orizanol e ácidos graxos em amostras alimentares.

Amostra	Analito	Técnica	Ref.	
- Óleo de girassol e leite saponificados	Tocoferol: óleo de girassol: 42,46 mg/100 g; leite: 100,47 μ g/100g	HPLC-UV; LC-MS; ESI; APCI	13	
- Farelo de arroz (Chacherngson, Tailândia)	γ -orizanol e α -tocoferol	HPLC-UV	18	
- Óleo de farelo de arroz com γ -orizanol; - Óleo de farelo de arroz e - Óleo de soja parcialmente hidrogenado	Vitamina E; γ -orizanol; ácidos graxos; compostos não voláteis	HPLC-UV; GC-FID; HPSEC-ELSD	22	
-Óleo de farelo de arroz (Taichung, Taiwan)	γ -orizanol ; ácido graxo livre (ácido oléico, linoléico e linolênico); triglicerídios	RP-HPLC com UV-Vis RMN 1 H; GC-FID	24	
-Farelo de arroz de diferentes variedades do Arcansas-USA.	γ -orizanol	LC-MS/MS ESI-MS	3	
- Farelo de arroz	γ -orizanol	HPLC-UV	29	
- Óleo cru de farelo de arroz	γ -orizanol ; tocoferol; β -caroteno	LC-DAD-APCI-MS	30	
- Farelo de milho (Paris, IL) - Óleo de milho refinado e não refinado (Danville, IL) - Farelo e óleo de farelo de arroz (Petaluma, CA; Southampton, NY; Salem, MA; Fountain Hills, AZ; Glendale Heights, IL; Los Angeles, CA; Englewood Cliffs, NJ)	γ -orizanol	HPLC-UV	31	
-Óleo de oliva; - Suco de cenoura e - Farelo de trigo	α -tocoferol; β -caroteno; β - criptoxantina; luteína; zeaxantina	LC-APCI-MS/MS	37	
- Farinha de arroz de três variedades: A: Cripto (Alemanha) B: Balilla (Alemanha) C: Xiuschuil 1 (China)	γ -orizanol (mg g $^{-1}$) A: 0,627 B: 0,393 C: 0,310	HPLC-UV-Vis GC-FID GC/MS LC-GC	38	
- Farelo de arroz integral (Itália, Espanha e França de 2000 a 2002)	γ -orizanol (0,26-62,7 mg g $^{-1}$)	LC-GC	39	
- Germe de arroz - Farelo sem germe	γ -orizanol (mg g $^{-1}$) Germe: 0,578 Farelo: 2,813	Vitamina E (mg g $^{-1}$) Germe: 0,612 Farelo: 0,106	LC-MS/MS ESI-MS	4
-Óleo de farelo de arroz (Crowley, LA)	Tocoferol (α -/ γ -) (μ g g $^{-1}$) 26,04-64,69/3,25-7,29	Tocotrienol (α -/ γ -) (μ g g $^{-1}$) 8,19-183,76/17,36-43,76	HPLC com fluorescência	40
- Óleo de oliva (18 amostras, Portugal)	Tocoferol (α -/ β -/ γ -/ δ -) (μ g g $^{-1}$) 256/2,08/5,29/0,45	Tocotrienol (α -/ β -/ γ -/ δ -) (μ g g $^{-1}$) 0,67/nd 0,49/nd	NP-HPLC-UV; NP-HPLC-ELSD; NP-HPLC-fluorescência/DAD	41

Revisão Bibliográfica

Continuação...

- Óleo refinado de farelo de arroz (5 variedades)	γ -orizanol A: 0,787 mg ml ⁻¹ B: 0,144 mg ml ⁻¹ C: 0,115 mg ml ⁻¹ D: 0,510 mg ml ⁻¹ E: 0,718 mg ml ⁻¹	Tocoferol (α -/ δ -/ β , γ -) A: 0,120/0,017/0,114 mg ml ⁻¹ B: nd/nd/0,016 mg ml ⁻¹ C: 0,016/0,008/0,053 mg ml ⁻¹ D: 0,218/nd/0,99 mg ml ⁻¹ E: 0,054/0,040/0,358 mg ml ⁻¹	Tocotrienol (α -/ δ -/ β , γ -) A: 0,086/0,048/0,478 mg ml ⁻¹ B: 0,010/nd/0,062 mg ml ⁻¹ C: 0,013/0,016/0,309 mg ml ⁻¹ D: nd/0,006/0,322 mg ml ⁻¹ E: 0,078/0,104/0,975 mg ml ⁻¹	HPLC-fluorescência HPLC-PAD (do inglês, <i>Photodiode Array Detection</i>)	11
-Farelo e arroz integral três variedades (Venezuela): A:Cimarrón B: Zeta 15 C: FONAIAP-1	γ -orizanol (mg g ⁻¹) Farelo Arroz A: 1,55 A: 0,33 B: 6,84 B: 0,39 C: 2,12 C: 0,20	Tocoferol (α -/ γ -) (μ g g ⁻¹) Farelo Arroz A: nd/ 41,0 A: 7,83/5,49 B: 26,4/20,9 B: 8,51/4,04 C: 35,0/26,3 C: nd/6,70	Tocotrienol (α -/ δ -/ γ -) (μ g g ⁻¹) Farelo Arroz A: nd/ 17,9/138 A: 7,08/2,08/28,3 B: 15,9/7,21/140 B: 7,18/2,58/42,7 C: 24,3/6,50/127 C: 3,45/4,06/36,2	HPLC-UV	42
- Farelo de arroz A: Cypress B: Bengal	γ -orizanol (mg g ⁻¹) A: 3,4-3,9 B: 3,8-4,2	Tocoferol (α -/ β , γ -) (μ g g ⁻¹) A: 37,1-73,7/9,8-24,6 B: 29,4-80,9/12,4/29,6	Tocotrienol (α -/ β , γ -/ δ -)(μ g g ⁻¹) A: 26,7-54,8/53,2-164,0/ 3,4-4,6 B: 19,2-54,5/43,5-127,5/ 4,5-6,2	RP-HPLC com UV-Vis	43
- Extraído o farelo do arroz em casca da safra 1999/2000 (Arkansas,Louisiana, Mississippi,Texas)	γ -orizanol (mg g ⁻¹) 2,510 – 6,864	Tocoferol (α -/ γ -) (μ g g ⁻¹) 27-94/6-59	Tocotrienol (α -/ γ -) (μ g g ⁻¹) 47-165/61-130	NP-HPLC e com fluorescência	44
- Óleo refinado de arroz (Pelotas) A: óleo cru B: óleo degomado C: óleo neutralizado D: óleo branqueado E: óleo desparafinado F: óleo desodorizado	γ -orizanol (mg g ⁻¹) A: 12,40 B: 12,10 C: 9,49 D: 0,37 E: 0,36 F: 0,29	Tocoferol (α -/ β + γ -/ δ -)(μ g g ⁻¹) A: 0,16/0,097/0,0049 B: 0,16/0,096/0,0048 C: 0,18/0,084/0,0034 D: 0,20/0,086/0,0038 E: 0,19/0,086/0,0038 F: 0,21/0,077/0,0038	Ácido graxo (Sat./insat.) (%) A: 0,26/0,73 B: 0,28/0,71 C: 0,29/0,71 D: 0,26/0,73 E: 0,25/0,74 F: 0,26/0,74	RP-HPLC com UV-Vis; GC-FID	45

nd: não detectado

2.4 TÉCNICAS ANALÍTICAS

2.4.1 Cromatografia em Fase Gasosa: GC-FID

O detector de ionização em chama (FID, do inglês *Flame Ionization Detector*) acoplado à cromatografia gasosa apresenta alto nível de detectabilidade e resposta quase universal^{46,47}. Esta é uma técnica já fundamentada e bastante utilizada na análise de óleos fixos^{58,59,61}. Como o foco principal desse trabalho é a identificação dos principais constituintes dos óleos de arroz, esta técnica foi utilizada com intuito de se obter resultados referentes aos ácidos graxos totais, fazendo desta maneira, uma caracterização total das amostras. Visto que a cromatografia líquida e a espectrometria de massas permitem a caracterização dos ácidos graxos livres (não ligados ao glicerol), não necessitando do passo de derivatização..

2.4.2 Espectrometria de Massa

A espectrometria de massas tem se mostrado uma ferramenta muito poderosa para obter informações adicionais sobre o peso molecular, isótopos, padrões e fragmentação dos analitos. Ela é capaz de separar espécies carregadas de acordo com suas razões massa-carga (m/z), além de determinar suas intensidades⁴⁸.

Há diferentes tipos de analisadores comercializados: analisador do tipo quadrupolo, “triplo” quadrupolo (QqQ) e de aprisionamento de íons (*ion-trap*).

O analisador de aprisionamento de íons (*ion trap*) é um quadrupolo tridimensional que “captura” todos os íons que são introduzidos em seu interior e os mantêm “aprisionados” até que uma determinada rádio frequência seja aplicada tornando os íons de certa razão m/z instáveis, sendo libertados da câmara^{49,50}. A Figura 8 mostra um esquema de um analisador de massa *ion trap*.

Já a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa com ionização por eletronebulização (LC-ESI-MS, do inglês, *Liquid Chromatography*

coupled to Mass Spectrometry with Electrospray Ionization), tem se destacado na caracterização de amostras complexas. A literatura relata que a ionização em modo negativo é mais eficiente do que no modo positivo, tanto na ionização por eletronebulização (ESI), quanto por ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês, *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)^{3,4,13}.

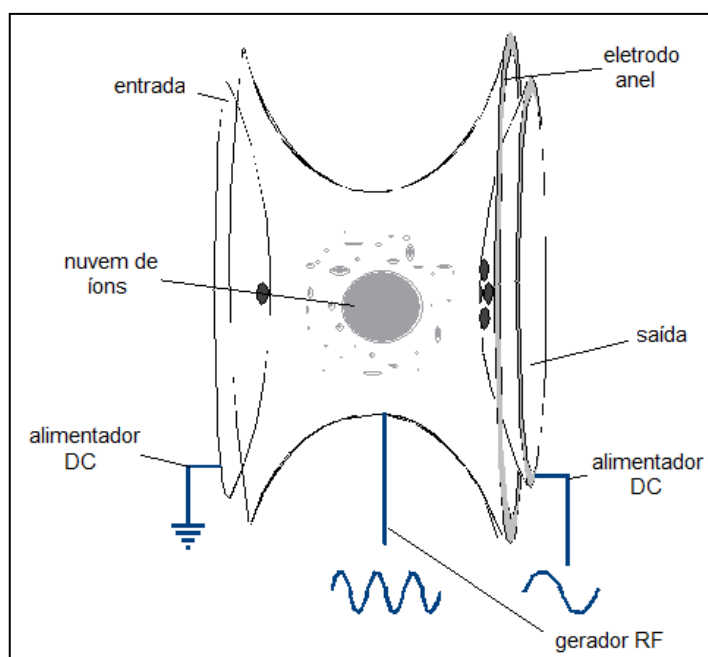


Figura 8: Analisador *ion trap*, onde RF indica radio freqüência e DC corrente contínua.

A ionização à pressão atmosférica (API, do inglês *Atmospheric Pressure Ionization*) ocorre em uma câmara de ionização, e deve executar três processos fundamentais: geração de aerossol, resultado do vácuo; ionização, causada por um forte campo elétrico; e evaporação do solvente, devido ao gás de secagem inerte quente (geralmente aquecido de 120 a 365° C). A amostra é introduzida na câmara de ionização através de um nebulizador, e esses processos ocorrem sob pressão atmosférica, fora da região de vácuo do espectrômetro de massa (Figura 9)⁴⁹.

Os íons dessolvatados são encaminhados para a região de baixa pressão através de um orifício, chamado de capilar. Depois, o *skimmer* tem a função de focalizar esses íons do analito, enquanto a nebulização do gás de secagem está ocorrendo. Assim, os íons são transferidos para o espectrômetro de massa.

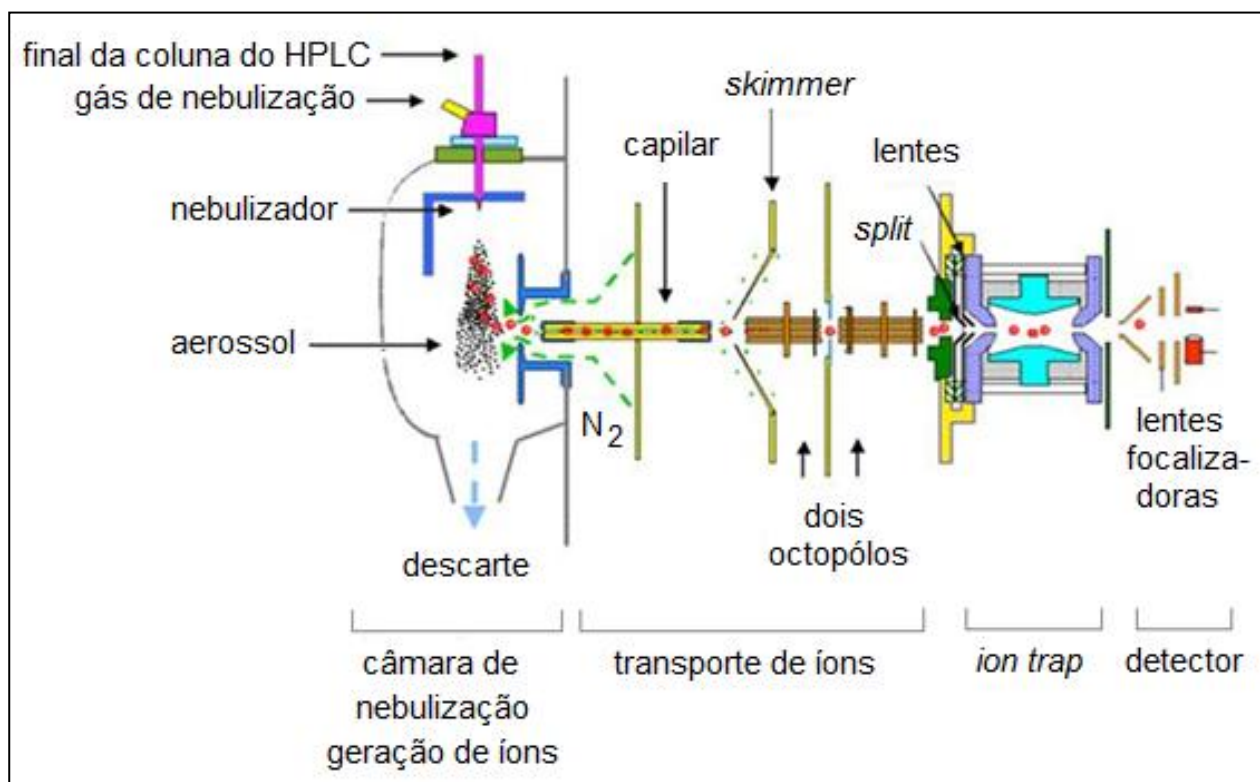


Figura 9: Fonte de ionização a Pressão Atmosférica (API) e sistema de vácuo.

Em ESI, a ionização é suave, isto é, íons pseudo-moleculares intactos são formados, $[M+H]^+$ no modo positivo e $[M-H]^-$ no modo negativo. A técnica ESI é basicamente uma transferência dos analitos da fase líquida para a fase gasosa, e esse processo pode ser resumido em quatro etapas: formação de íons, nebulização, dessolvatação e evaporação do íon. Na fonte de ESI, o analito passa por uma agulha capilar, que está envolta por N_2 com fluxo constante, onde é aplicada uma diferença de potencial, fazendo com que ocorra a pulverização da amostra e do solvente gerando gotículas carregadas (“*spray*”). Então, essas gotículas são dessolvatadas, ocorrendo a diminuição do tamanho, até o ponto em que a tensão superficial não suporta mais a pressão e ocorre uma “explosão coulômbica”, gerando gotas menores, e uma série de explosões passam a ocorrer (Figura 10). Em seguida, essas gotículas passam por um cone, na sequência por um focalizador, e finalmente são enviadas ao espectrômetro de massa (Figura 11)

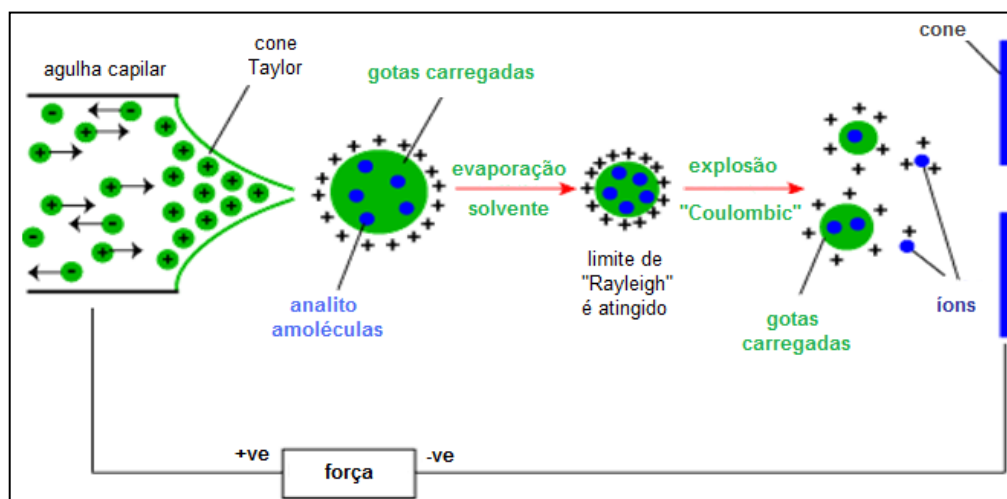


Figura 10: Mecanismo de formação de íons na técnica de ionização por “electrospray” (ESI).

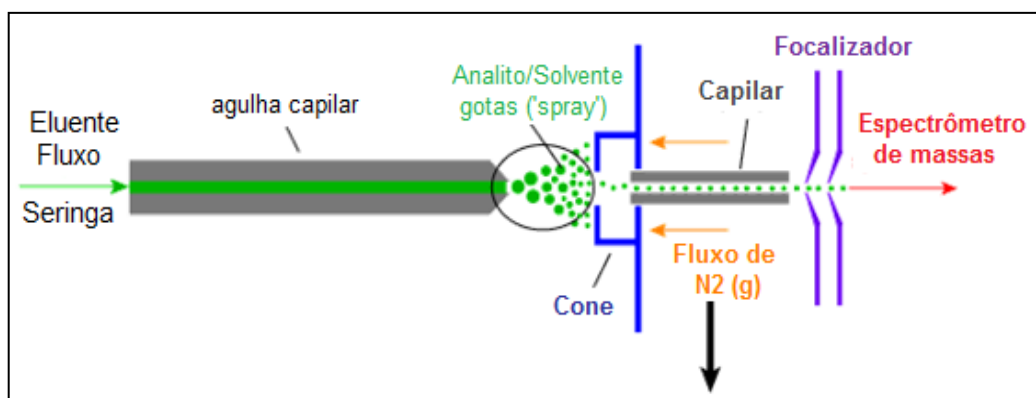


Figura 11: Esquema representativo de uma fonte de ESI.

As gotículas dispersas contêm solvente, íons positivos e negativos do analito. O tipo de íons que se formará, dependerá da composição do líquido pulverizado. Se, por exemplo, a solução contém a amostra em ácido acético, com um potencial positivo em relação à agulha, os íons positivos serão predominantes (H_3O^+) e serão formados íons moleculares carregados positivamente $[\text{M}-\text{H}]^+$.

No acoplamento com a cromatografia líquida, a fase móvel proveniente da coluna analítica é direcionada através de uma interface para o espectrômetro de massa, através de um *split*, sendo realizada com uma conexão adequada, um “T” localizado após a coluna. É de grande importância no acoplamento que os íons na fase gasosa, sejam um reflexo do que está presente na fase líquida proveniente da coluna cromatográfica.

Fenn⁵⁰ e colaboradores demonstraram pela primeira vez o uso do ESI como ferramenta para o acoplamento LC-MS à pressão atmosférica. Fenn foi laureado, em 2002, com o Nobel de Química por suas descobertas e trabalhos com ESI.

2.5 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

O objetivo da validação de um método analítico é demonstrar que o mesmo é apropriado para a finalidade escolhida. Durante a validação do método analítico suas características de execução são expressas em termos de parâmetros analíticos, que são: especificidade, linearidade, exatidão, precisão (repetitividade e precisão intermediária), intervalo e robustez.^{51,52}

Especificidade é a capacidade de avaliar o analito na presença de componentes que podem estar presentes na matriz. Normalmente, essas medidas poderão incluir as impurezas, produtos da degradação, constituintes da matriz, entre outros⁵¹.

O intervalo de linearidade de um procedimento analítico é a sua capacidade (dentro de um determinado intervalo) de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração (quantidade) do analito na amostra⁵¹. Ele é expresso no intervalo superior e inferior de concentração do analito, demonstrando que o procedimento analítico tem um nível adequado de precisão, exatidão e linearidade^{51,53}.

Os erros de uma medida analítica são determinados pela precisão e a pela exatidão⁵⁴. Denomina-se precisão a concordância entre os vários valores obtidos. Pode ser expressa como uma estimativa de desvio padrão(s) ou desvio padrão relativo (DPR), também chamado de coeficiente de variação (CV%), de uma série de repetições da mesma amostra, em diferentes preparações⁵⁵. Esse parâmetro deve ser avaliado de três maneiras: repetitividade (precisão intra-dia), precisão intermediária (precisão inter-dia) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial). A repetitividade é o grau de concordância entre resultados de análises individuais quando o procedimento é aplicado repetidamente às múltiplas análises de uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de teste. De forma geral, a

repetitividade ocorre quando a amostra é a mesma, assim como a mesma instrumentação, analista e dia^{54,56}. A precisão intermediária é expressa como as variações dentro de um laboratório, mas realizadas em dias diferentes, analistas diferentes, sobre uma mesma amostra ou padrão, definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais)⁵⁵.

A precisão entre laboratórios diferentes é chamada de reprodutibilidade, sendo obtida usando o mesmo método e amostra, mas com analistas e equipamentos diferentes. Vale ressaltar que este termo é frequentemente utilizado, erroneamente, para expressar a precisão intermediária⁵¹.

A robustez é uma medida da capacidade de um método em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Esse parâmetro mede a confiabilidade do método em condições normais de operação^{56,57}.

PARTE EXPERIMENTAL

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 AMOSTRAS

As amostras utilizadas foram de farelo e grão de arroz. Os farelos de arroz (2 amostras) foram obtidos do polimento de arroz integral e integral parboilizado, provenientes de arroz da classe longo fino.

O arroz foi cultivado na região sul do Rio Grande do Sul, através de sistema irrigado, safra 2007, gentilmente cedido pelo Laboratório de Pós-Colheita, Industrialização e Qualidade de Grãos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, na Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, Universidade Federal de Pelotas/RS (DCTA-FAEM-UFPEL).

Também foram adquiridas 3 amostras de grão de arroz produzidas comercialmente, do tipo 1, classe longo fino, sendo de arroz branco (subgrupo polido), integral (subgrupo integral parboilizado) e parboilizado (subgrupo parboilizado polido). Essas amostras de grãos de arroz foram moídas em um moedor comercial, obtendo-se assim, um produto denominado de farinha de arroz.

3.2 SOLVENTES, PADRÕES E REAGENTES

Os padrões α - e γ -tocoferol foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os ácidos usados na cromatografia líquida foram: ácidos linoléico, oléico e linolênico (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$), e na cromatografia gasosa o ácido palmítico e linolênico (Fluka, $\geq 99\%$), esteárico e oléico (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$) e linoléico (Sigma-Aldrich).

O padrão de γ -orizanol foi adquirido da Wako Chemicals USA. Os solventes metanol e isopropanol adquiridos da J.T. Baker e acetonitrila da Tedia, todos grau HPLC. O hexano e o metanol usados foram grau p.a, Merck, assim como o BF_3 , NaOH e NaCl.

3.3 EXTRAÇÃO DO ÓLEO DO FARELO E DA FARINHA DE ARROZ

Foram pesadas 20,00 g de cada amostra de arroz (farelo (2) e farinha (3)), em cartuchos de papel filtro e, submetidas à extração em Soxhlet com hexano (PE = 68°C) durante cinco horas⁵⁸. As extrações foram realizadas em triplicata. Os extratos obtidos foram concentrados e o rendimento de cada extração foi calculado pela razão massa/massa (massa de óleo produzida/massa de amostra usada). Na Figura 12 consta um fluxograma sobre as amostras, o processo de extração e os óleos obtidos.

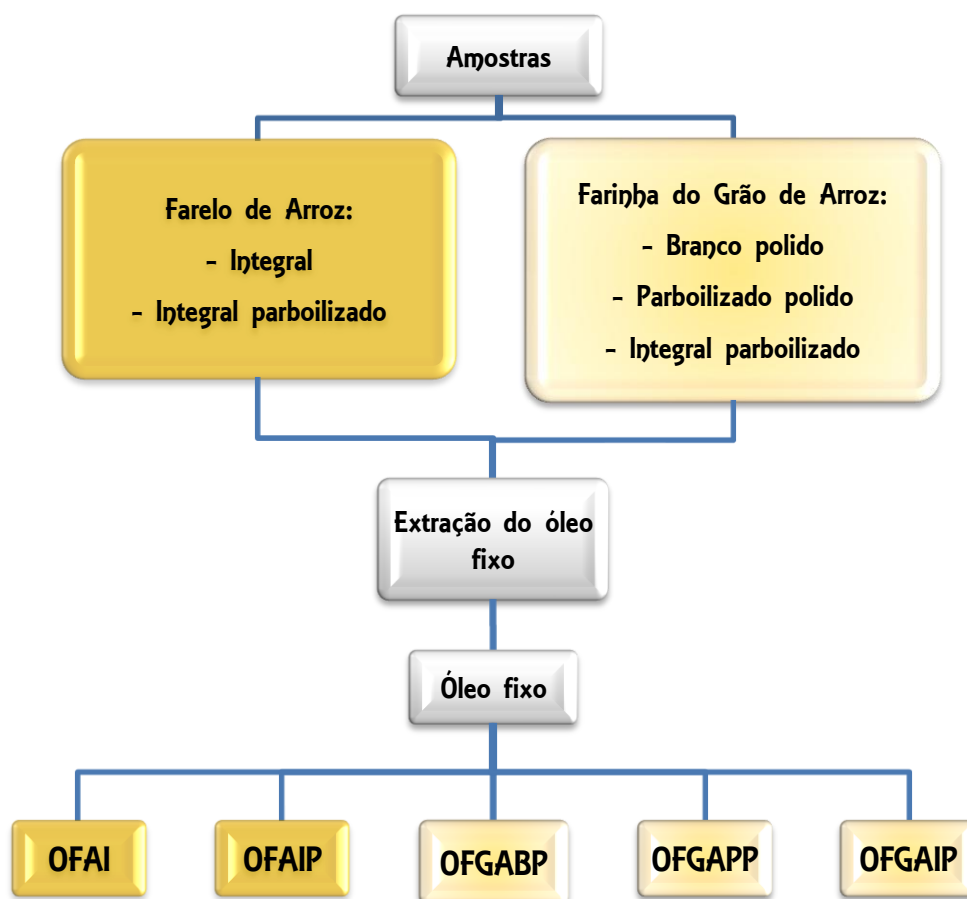


Figura 12: Fluxograma das amostras e dos óleos obtidos a partir da extração com Soxhlet. Siglas: OFAI = óleo de farelo de arroz integral; OFAIP = idem, parboilizado; OFGABP = óleo de farinha de grão de arroz branco polido; OFGAPP = idem parboilizado polido e OFGAIP = idem integral parboilizado.

A partir das extrações foram geradas as amostras codificadas no quadro abaixo:

OFAI =	óleo de farelo de arroz integral
OFAIP =	óleo de farelo de arroz integral parboilizado
OFGABP =	óleo de farinha de grão de arroz branco polido
OFGAPP =	óleo de farinha de grão de arroz parboilizado polido e
OFGAIP =	óleo de farinha de grão de arroz integral parboilizado

3.4 ANÁLISE DOS ÓLEOS DE FARELO E FARINHA DE ARROZ

Um esquema geral das análises realizadas está apresentado na Figura 13.

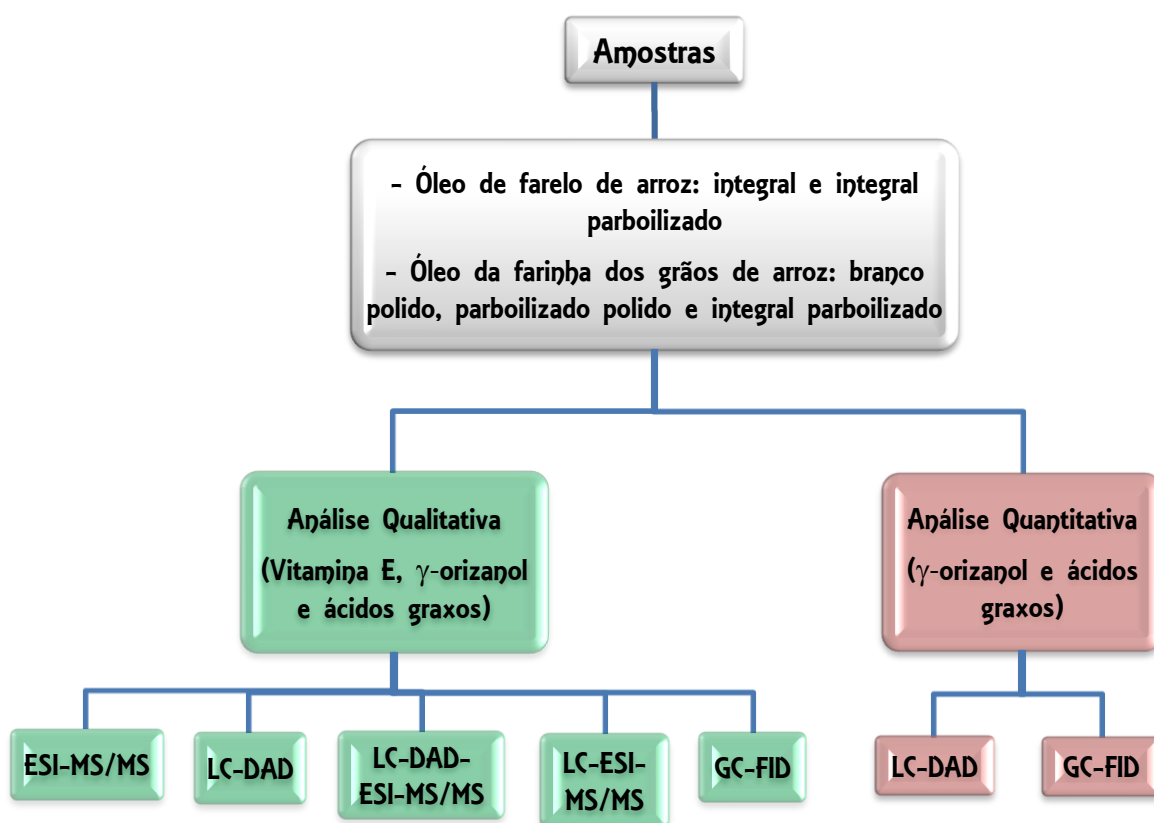


Figura 13: Fluxograma das análises realizadas no desenvolvimento do trabalho experimental.

Foram realizadas análises qualitativas dos tocóis (α - e γ -tocoferol), dos constituintes do γ -orizanol e dos ácidos graxos (linoléico, oléico e linolênico) presentes nos óleos fixos dos farelos e das farinhas de arroz, fazendo uso de diferentes técnicas cromatográficas. Os compostos dos constituintes do γ -orizanol e os ácidos graxos foram quantificados através de LC-DAD e GC-FID, respectivamente. O método de LC-DAD foi validado.

3.4.1 Condições de análise no sistema ESI-MS/MS

3.4.1.1 Preparo dos padrões e das amostras

Para a determinação da fração dos constituintes do γ -orizanol, dos ácidos graxos (oléico, linoléico e linolênico) e dos tocóis (α - e γ -tocoferol) foram preparadas soluções estoque (S_E) dos padrões em metanol, todas na concentração de 1 mg mL^{-1} . Para o preparo das soluções de trabalho (S_T), $100 \text{ }\mu\text{L}$ de cada solução estoque foram dissolvidos em 10 mL de uma solução metanol/ 10 mM de acetato de amônio ($10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$).

Foram preparadas soluções estoque de cada amostra de óleo dissolvendo 100 mg do óleo em 10 mL de metanol. A partir dessas soluções, preparou-se a solução de trabalho dissolvendo uma alíquota de $100 \text{ }\mu\text{L}$ na solução metanol/ 10 mM de acetato de amônio ($10 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) em um balão volumétrico de 10 mL .

3.4.1.2 Análise instrumental direta (ESI-MS/MS)

As soluções de trabalho (padrões e amostras) foram injetadas manualmente, diretamente ($0,2 \text{ mL min}^{-1}$) no espectrômetro de massa com detector de *ion trap* (MS/MS), Bruker, Esquire 6000, equipado com a câmara de ionização por eletronebulização (ESI), usando para isolamento e fragmentação os valores de m/z de cada íon pseudo-molecular $[M - H]^-$. As condições otimizadas para as análises foram as seguintes:

- gás de nebulização: nitrogênio a uma pressão de 30,0 psi, com fluxo de 8,0 L min⁻¹ e temperatura de secagem de 220 °C;
- temperatura do espectrômetro de massa: 250 °C;
- voltagem do capilar e do focalizador: 4500 V e -40 V, respectivamente;
- voltagem do 1º e do 2º octopólo: -12 V e -1,74 V, respectivamente;
- intervalo da varredura: de m/z 80 a 850.

Os parâmetros de controle da ionização à pressão atmosférica (API) e do espectrômetro de massas via *Smart Tune* foram: estabilidade do composto (*compound stability*) de 50%, nível de aprisionamento (*trap drive level*) de 93%. No modo controle do número de íons (ICC) os parâmetros foram: alvo (*target*) de 5000; tempo máximo de acumulação de 50,00 ms. Condições adaptadas de Fang³.

3.4.1.3 Análise instrumental cromatográfica (LC-ESI-MS/MS)

As análises cromatográficas (LC) foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (Shimadzu, Japão), constituído por dois módulos de mistura dos solventes (bombas reodine LC-20AD), degaseificador DGU-20A³, sistema de controle CBM-20A, forno da coluna CTO-20A, amostrador automático SIL-20A e detector de arranjo de diodos SPD-M20A. As condições cromatográficas otimizadas estão apresentadas na Tabela II.

Tabela II: Condições cromatográficas do equipamento LC-ESI-MS/MS

Características	LC-ESI-MS/MS
Coluna	ACE 5 C-18 (15 cm x 4.6 mm d.i. x 5 μ m)
Fase Móvel	A: água (acetato de amônio 10 mM) B: metanol (acetato de amônio 10 mM)
Gradiente	0 min, 50% B; 5,0 min, 90% B; 8,0 min, 100% B; 30,0 min, 100% B; 30,1 min, 50% B; 35 min 50%B
Fluxo da fase móvel	0,2 mL.min ⁻¹
Volume de injeção	20 μ L
Temperatura da coluna	40 °C
Fonte de ionização	ESI

As condições do espectrômetro de massas (ESI-MS/MS) foram as otimizadas e descritas no item 3.4.1.2. As soluções de trabalho dos padrões e as amostras foram submetidas às mesmas condições. Os dados foram adquiridos e processados com o uso do software Esquire®.

3.4.2 Condições de análise no LC-DAD e LC-DAD-ESI-MS/MS

3.4.2.1 Preparo dos padrões e das amostras

As soluções estoque (S_E) dos padrões γ -orizanol (1030 μ g mL⁻¹), α -tocoferol (2500 μ g mL⁻¹), γ -tocoferol (10000 μ g mL⁻¹), ácido oléico (1760 μ g mL⁻¹), ácido linoléico (1750 μ g mL⁻¹) e ácido linolênico (1000 μ g mL⁻¹) foram preparadas em metanol. A partir das soluções estoques de cada padrão foram preparadas soluções de trabalho (S_T) na solução diluente (acetonitrila:metanol:iso-propanol, 50:45:5 (v/v/v)), todas com concentração de 100 μ g mL⁻¹.

Para a análise quantitativa de γ -orizanol, uma solução estoque do padrão (320 μ g mL⁻¹) foi preparada em metanol. A partir dessa solução foram realizadas diluições na solução diluente (acetonitrila:metanol:iso-propanol, 50:45:5 (v/v)) para construção da curva de calibração (sendo também a curva de linearidade), nas

concentrações de 100, 150, 200, 250 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses valores compreendem o intervalo de 50 a 150% da concentração teórica das amostras, seguindo os parâmetros definidos pelo ICH-Q2(R1), 2005⁵¹.

A concentração das amostras, para análise quantitativa, foi calculada através das equações que são mostradas a seguir:

$$C_{\text{solução injetada}} = \frac{(\sum \text{áreas } \gamma\text{-orizanol} - b)}{a} \quad \text{Equação 1}$$

$$C_{\% \text{ de } \gamma\text{-orizanol}} = \frac{C_{\text{solução injetada}} \times fd \times 100}{m} \quad \text{Equação 2}$$

Onde,

\sum áreas γ -orizanol = somatório das áreas dos picos referentes ao γ -orizanol;

b = coeficiente linear da reta;

a = coeficiente angular da reta

fd = Fator de diluição (2)

m = peso de amostra na solução analisada, em μg .

As amostras foram preparadas em tubos de ensaio para os quais foram pesados cerca de 65,00 mg de cada óleo de arroz, obtido conforme item anterior e adicionado 2,0 mL de uma solução diluente (acetonitrila:metanol:iso-propanol, 50:45:5 (v/v)). As soluções foram agitadas num Vortex, durante 1 min e centrifugadas por 20 min a 3000 rpm (Centrífuga FANEM/SP/Brasil, Excelsa Baby I). A camada superior foi filtrada em membrana de PTFE (Teflon ou Politetrafluotileno), com poros de 0,45 μm , diâmetro de 15 mm, adquiridas da Macherey-Nagel (Düren/Alemanha), conforme metodologia descrita em Stöggli³¹, com modificações. Um esquema do preparo das amostras é mostrado na Figura 14.

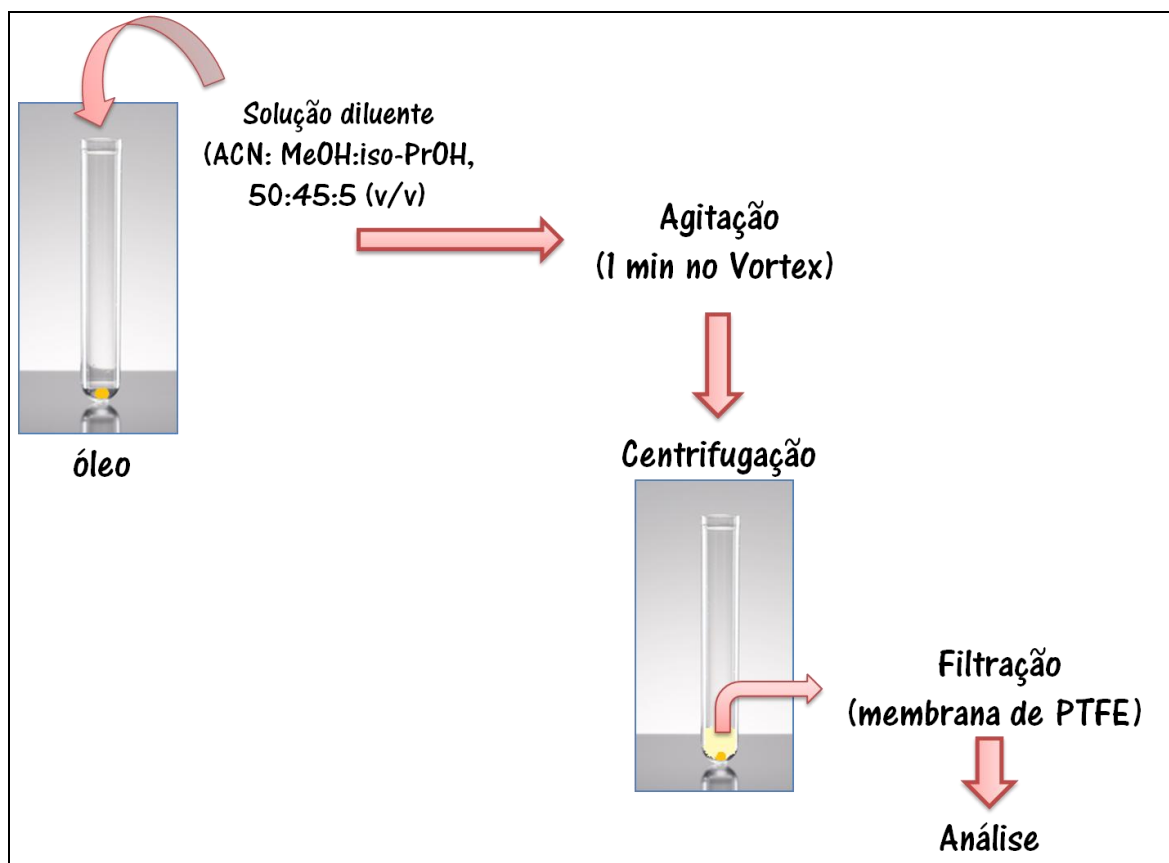


Figura 14: Esquema representativo do preparo das amostras.

3.4.2.2 Parâmetros da validação do método de quantificação de γ -orizanol

Os parâmetros analíticos (ou figuras de mérito) usados para a validação do método de quantificação do γ -orizanol foram: seletividade, linearidade, intervalo (faixa linear), precisão, exatidão e robustez, segundo exigências do ICH-Q2 (R1), 2005⁵¹. Conforme critérios deste instituto, quando os analitos não estão em nível de traço nas amostras, é realizado um intervalo na curva de linearidade abrangendo a concentração esperada na amostra. Sendo esse também o motivo pelo qual, não foram determinados os limites de detecção e quantificação.

A seletividade foi analisada através do branco das amostras (solvente extrator - acetonitrila:metanol:iso-propanol), pureza dos picos dos constituintes do γ -orizanol nos óleos e no padrão, além da comparação espectral (índice de similaridade) entre o padrão e as amostras.

A linearidade foi verificada através da construção de curva de linearidade conforme descrita no item 3.4.2.1.

Para cada concentração foram preparadas soluções em duplicata, sendo cada ponto desta curva representado pela média de duas determinações.

O parâmetro da repetitividade (precisão intra-dia) foi avaliado a partir do desvio padrão relativo (DPR) de seis determinações de igual concentração executadas pelo mesmo analista. A precisão intermediária (precisão inter-dias) foi verificada através do DPR da análise de seis amostras de igual concentração, realizadas em três dias de diferença e por outro analista.

A exatidão foi avaliada pelo teste de recuperação, sendo realizada no nível de 100% da concentração teórica da amostra.

Para as amostras de farelo de arroz cerca de 30 mg de óleo foram pesadas em tubo de ensaio, sendo adicionados 625 μL da solução estoque de γ -orizanol e quantidade suficiente para 2 mL da solução diluente.

Para as amostra de farinha de grãos de arroz, 40 mg de óleo foram pesadas, adicionados 625 μL da solução mãe de γ -orizanol e quantidade suficiente para 2 mL da solução diluente. Após dissolução e agitação de ambas as amostras, as mesmas foram centrifugadas, sendo a parte superior de cada solução encaminhada para análise por LC.

O percentual de recuperação em relação à quantidade adicionada (R%) foi obtido para amostras e foi calculado através da seguinte equação:

$$R_{\%} = \left(\frac{C_r}{C_t} \right) \times 100 \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

C_r = concentração encontrada experimentalmente das amostras, em $\mu\text{g mL}^{-1}$

C_t = concentração teórica das amostras, em $\mu\text{g mL}^{-1}$

Para avaliação da robustez do método, o fluxo da fase móvel, pH e a temperatura da coluna foram alterados. O fluxo da FM foi modificado para 0,9 e 1,1 mL min^{-1} (método validado = 1,0 mL min^{-1}), o pH alterado para 0,075 e 0,125 % de ácido fórmico na FM (método validado = 0,1% de ácido) e a temperatura da coluna teve alteração para 36 e 44 $^{\circ}\text{C}$ (método validado = 40 $^{\circ}\text{C}$). O resultado da

robustez foi avaliado através do DPR entre o valor obtido com o método normal e com as modificações.

3.4.2.2.1 Análise Instrumental: LC-DAD e LC-DAD-ESI-MS/MS

As análises cromatográficas foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (Shimadzu, Japão), constituído por dois módulos de mistura dos solventes (bombas reodine LC-20AD), degaseificador DGU-20A³, sistema de controle CBM-20A, forno da coluna CTO-20A, amostrador automático SIL-20A e detector de arranjo de diodo SPD-M20A. Foi utilizado um gradiente semelhante ao desenvolvido por Yu⁴ e colaboradores. As condições cromatográficas otimizadas são apresentadas na Tabela III.

Tabela III: Condições empregadas no LC-DAD.

Características	Descrição
Coluna	ACE 5 C-18 (15 cm x 4.6 mm d.i. x 5 µm)
Fase Móvel	solvente A: acetonitrila (0,1% ácido fórmico) solvente B: água (0,1% ácido fórmico)
Gradiente	0 min, 20% B; 12 min, 70% B; 16 min, 85% B; 24 min, 90% B; 54 min, 100% B; 67 min 100% B; 68 min, 20% B; 73 min, 20 % B
Volume de injeção	20 µL
Fluxo da fase móvel	1,0 mL min ⁻¹
Comprimento de onda	190 ± 10 nm, para os FFA, 290 ± 10 nm, para os tocóis, 320 ± 10 nm para o γ-orizanol
Temperatura da coluna	40 °C

As condições cromatográficas do LC-DAD-ESI-MS/MS são as mesmas da Tabela II (item 3.4.1.3) e as condições do ESI-MS/MS, estão no item 3.4.1.2. O acoplamento do LC-DAD para o detector de massas ocorreu através de um *split*

com vazão de 1:10 para o fluxo de fase móvel, sendo a maior parte descartada e a menor parte injetada no espectrômetro de massas.

3.4.3 Condições de análise no GC-FID

3.4.3.1 Preparo das amostras e dos padrões

Foi realizada a reação de derivatização nas amostras de óleos dos farelo e das farinhas para análise dos ácidos graxos fixos através da cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID). Dentre os tipos de derivatização, a esterificação com álcool catalisada com trifluoreto de boro (BF_3) é a mais clássica (Figura 15). A reação é basicamente a interação que ocorre entre um ácido graxo existente em óleos ou gorduras, quebrando a molécula de triacilglicerol, formando glicerol e sais de metais alcalinos, com uma base forte, enquanto o sistema é mantido em aquecimento. Concomitantemente, ocorre o deslocamento do metal alcalino pela metila do metanol presente no meio reacional, formando o éter metílico correspondente^{47,59}.

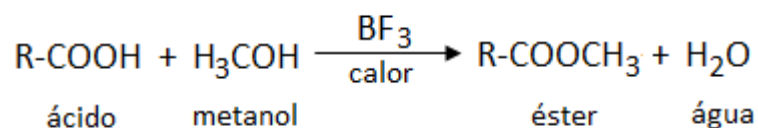


Figura 15: Reação de derivatização com BF_3 .

Foram pesados 100 mg de óleo em um erlenmeyer de 100 mL e adicionados 5 mL de solução metanólica de NaOH (20 mg mL^{-1}). A seguir foi acoplado ao erlenmeyer um condensador e após o início de refluxo o sistema permaneceu por 5 min em chapa de aquecimento com agitação. Então, pela parte superior do condensador, foram adicionados 2 mL de trifluoreto de boro (BF_3) dissolvido em metanol. A mistura permaneceu por mais dois minutos em ebulição, sendo então adicionados 5 mL de hexano. Após 1 min, a agitação foi suspensa e a solução permaneceu em repouso, esfriando naturalmente, e recebeu uma solução saturada de cloreto de sódio (NaCl) até que a mistura se tornasse turva, com intuito de separar as fases. A solução foi transferida para um tubo de ensaio,

onde a fase superior contendo hexano com os ácidos derivatizados (fase orgânica) foi retirada. Essa fase foi filtrada em Na₂SO₄ anidro para retirar o excesso de água. Na sequência, o filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 10 mL, deixando-se evaporar o solvente presente para se obter o rendimento de derivatização, sendo este calculado pela razão massa/massa. Posteriormente o balão foi elevado à marca com hexano para análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, via GC-FID.

Foram usados padrões de ésteres metílicos dos seguintes ácidos graxos:

palmítico (C16:0*, C₁₇H₃₄O₂, Fluka, pureza ≥99%),

esteárico (C18:0*, C₁₉H₃₈O₂, Sigma, pureza ≥99%),

oléico (C18:1*, C₁₉H₃₆O₂, Sigma, pureza ≥99%),

linoléico (C18:2*, C₁₉H₃₄O₂, Sigma, pureza ≥99%) e

linolênico (C18:3*, C₁₉H₃₂O₂, Fluka, pureza ≥99%).

* *n*^o de carbonos na estrutura: *n*^o de ligações duplas. Por exemplo, C16:0: corresponde ao ácido com 16 carbonos e nenhuma ligação dupla.

Destes ésteres, foram preparadas soluções padrão, na concentração de 1000 mg L⁻¹. Cada solução padrão foi injetada individualmente com a finalidade de se obter seus respectivos tempos de retenção, visando a comparação com o tempo de retenção dos compostos de interesse presentes nas amostras de óleo.

3.4.3.2 Análise quantitativa dos ácidos graxos via GC-FID

A análise quantitativa foi realizada através da calibração com padrão externo, também conhecida como calibração com um ponto de calibração. Este método envolve a comparação direta das respostas obtidas com os picos, separadamente analisados, das soluções padrão e amostras. Nos casos em que a padronização externa é utilizada, os cálculos podem ser realizados segundo a equação:

$$Ci_{\%} = \frac{Ci_{sol\ padrão} \left(\frac{A_{amostra}}{A_{padr\ã\ o\ i}} \right) \times fd \times 100}{P_{amostra}} \quad \text{Equação 4}$$

Onde,

$C_{i\%}$ = concentração percentual do composto i na amostra;

$C_{i\text{sol padrão}}$ = concentração do composto i da solução padrão, em mg.mL^{-1} ;

A_{amostra} = área encontrada da amostra;

$A_{\text{padrão } i}$ = área do padrão do composto i ;

f_d = fator de diluição;

P_{amostra} = peso de amostra na solução analisada, em mg.

3.4.3.3 Análise Instrumental: GC-FID

Os ésteres metílicos resultantes da derivatização foram analisados em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama – GC-FID (modelo Shimadzu – 2010), equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-Waxetr (com 30 m de comprimento, 0,25 mm de espessura e revestida por filme de 0,25 μm).

As condições cromatográficas foram: 180°C (0 min), com incremento de 5°C min^{-1} até 220°C, mantendo-se a temperatura por 10 min. As temperaturas do detector e do injetor foram mantidas em 280°C, com *split* de 1:50, num tempo total de corrida de 18 min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EXTRAÇÃO DO ÓLEO

O rendimento dos óleos obtidos das extrações com Soxhlet das amostras estão descritos na Tabela IV.

Tabela IV: Rendimento em massa (%) das extrações de óleo fixo.

Amostra	Rend. (% m/m)
Farelo de arroz integral	13,77 ± 0,31
Farelo de arroz integral parboilizado	24,4 ± 0,43
Farinha de arroz parboilizado polido	0,21 ± 0,05
Farinha de arroz branco polido	0,32 ± 0,03
Farinha de arroz integral parboilizado	2,46 ± 0,04

Analisando a Tabela IV, observa-se que as amostras de farelo de arroz apresentaram maior rendimento de óleo, comparadas às das farinhas de grão de arroz. Esses dados estão de acordo com as informações da literatura⁵⁸. É relatado que, nas camadas do farelo está concentrada a maior parte dos lipídios (biomoléculas insolúveis em água) do grão do arroz. Durante o descascamento, obtém-se o farelo (pericarpo e germe), que representa de 6 a 8% do grão inteiro. O farelo contém entre 12 e 18% de óleo e o restante do grão apenas 0,8%, sendo esse o motivo pelo qual a extração do óleo (nas indústrias) é feita a partir do farelo de arroz^{58,60,61}.

As amostras integrais que passaram pelo processo de parboilização apresentaram maior quantidade de óleo do que as que não passaram por essa etapa. Como pode ser visto na Tabela IV, o farelo do arroz integral parboilizado contém mais óleo que o farelo do arroz integral. A mesma situação tem-se para os grãos, pois dentre as amostras de farinha, é a proveniente do arroz integral parboilizado a que apresentou maior rendimento de óleo. Confirmando que o processo de parboilização (realizado no arroz em casca) provoca a difusão e

lixiviação de uma fração de óleo na operação de encharcamento, que estão em maior concentração na casca do arroz⁵⁸.

4.2 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES DA VITAMINA E

Primeiramente os padrões α -tocoferol (α -T) e γ -tocoferol (γ -T) e as amostras de óleo de farelo (OFAI e OFAIP) e de farinha (OFGAPP, OFGAIP, OFGABP) foram analisados através da infusão direta no ESI-MS/MS. Uma caracterização dessas amostras também foi feita com uso da cromatografia líquida, a partir da comparação com o tempo de retenção e com os espectros do DAD dos padrões utilizados. Esses constituintes também foram analisados via LC-DAD-ESI-MS/MS e LC-ESI-MS/MS.

4.2.1 ESI-MS/MS

As soluções do padrão α e γ -tocoferol foram analisadas através da injeção direta com ionização ESI no modo negativo. Seus espectros são apresentados na Figura 16.

Nessa Figura, observam-se os pseudo-íons moleculares $[M-H]^-$ (Figura 16A e 16B), sendo m/z de 415,3 e 429,2 referentes ao α e γ -tocoferol, respectivamente. Esses íons representam, primeiramente, a perda de um hidrogênio ($[M-H]^-$, m/z 415,3 e 429,2), na sequência a perda de uma metila ($[M-H-Me]^-$, m/z 400,2 e 414,2), e por fim, a estrutura é fragmentada na parte chamada de anel cromanol (m/z 149 e 163) da cauda, representada pelo ligante fitila, conforme representado na parte inferior das Figuras A e B. Os íons identificados, tanto nos padrões, quanto nas amostras, estão de acordo com os dados descritos na literatura^{13,4}.

Resultados e Discussão

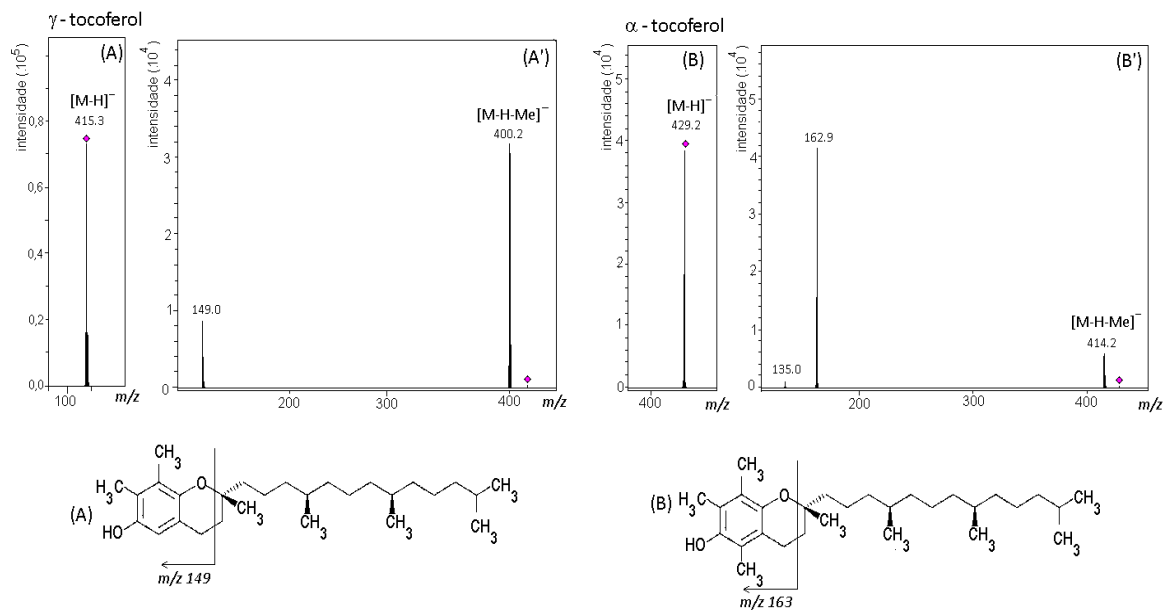


Figura 16: Espectrograma ESI-MS e MS/MS do padrão de γ -Tocoferol (A, A') e α -Tocoferol (B, B').

As amostras também foram analisadas via ESI-MS/MS, nas mesmas condições do padrão. Quando esses íons foram selecionados e fragmentados, obteve-se o mesmo modelo de fragmentação dos padrões. Como os espectros das cinco amostras são muito semelhantes entre si, mostra-se apenas o espectro da amostra OFAIP na Figura 17.

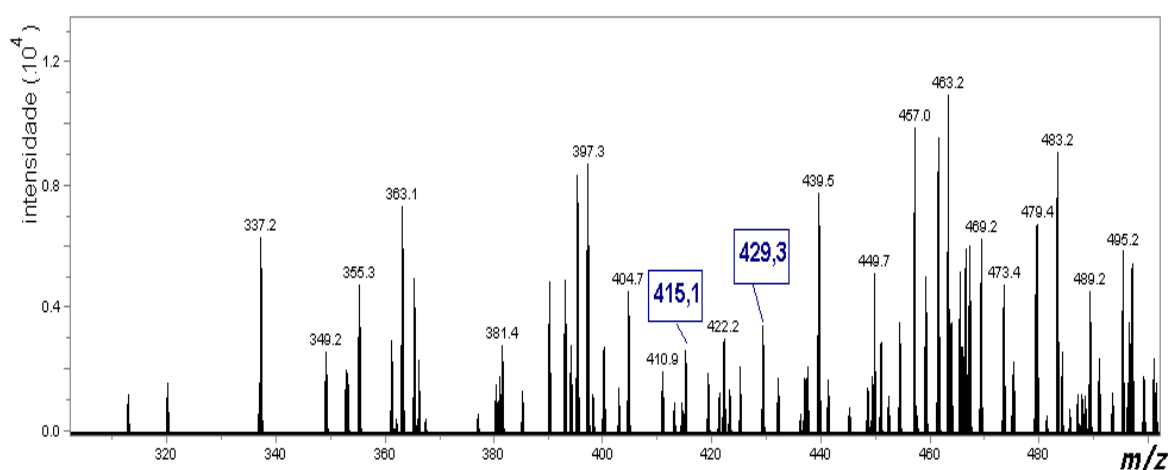


Figura 17: Espectrograma ESI-MS da amostra OFAIP com ênfase para os íons correspondentes ao α e γ -tocoferol (m/z 429,3 e 415,1).

Os íons devem apresentar uma intensidade superior à 10^4 para que seja aceito como um fragmento de interesse e não ser considerado ruído. Os espectros de massas das amostras (Figura 17) confirmam a presença da vitamina E (γ - e α -tocoferol). Apesar dos analitos em questão apresentarem intensidade superior à 10^4 , percebe-se uma baixa intensidade dos mesmos, uma vez que o sinal é relativamente pequena quando comparada aos demais íons.

As amostras foram analisadas no modo negativo, positivo e alternado (quando ocorre ionização ora negativa ora positiva). Sendo observado que, somente quando a ionização ocorria no modo negativo, havia a presença de íons característicos às estruturas estudadas. Logo, todas as amostras foram obtidas no modo de ionização negativa, concordando com dados da literatura, que indicam que esta é a ionização mais efetiva^{3,4}. Lanina e colaboradores¹³, quando analisaram tocoferóis (α -, β -, γ - e δ -), obtiveram uma resposta no modo ESI negativo de 10 a 45 vezes maior em relação ao modo de ionização positivo.

4.2.2 LC-ESI-MS/MS e LC-DAD-MS-ESI

Uma mistura dos padrões γ -T (γ -tocoferol) e α -T (α -tocoferol) foi analisada através da injeção no acoplamento direto do LC com a espectrometria de massas (LC-ESI-MS/MS), usando como fase móvel água e metanol, ambos com acetato de amônio como agente ionizante.

A Figura 18 mostra os resultados da análise dos tocoferóis por LC-ESI-MS/MS tanto para as soluções padrão como para a amostra de OFAIP, uma vez que todas as amostras apresentaram perfis semelhantes. Na Figura 18A tem-se cromatograma de íons totais referentes ao γ -T e α -T na mistura de padrões, nas Figuras 18B e 18C estão os cromatogramas do íon extraído de cada padrão (m/z 415 para o γ -T e m/z 429 para o α -T), os espectros de massas completos destes compostos padrões estão nas Figuras 18B' e 18C', e a Figura 18D apresenta uma ampliação do cromatograma do íon extraído para a amostra OFAIP.

Os cromatogramas do íon extraído do γ -T e α -T apresentaram ótima resolução; já nas amostras, esta resolução não foi tão boa, devido à baixa intensidade encontrada destes compostos.

Resultados e Discussão

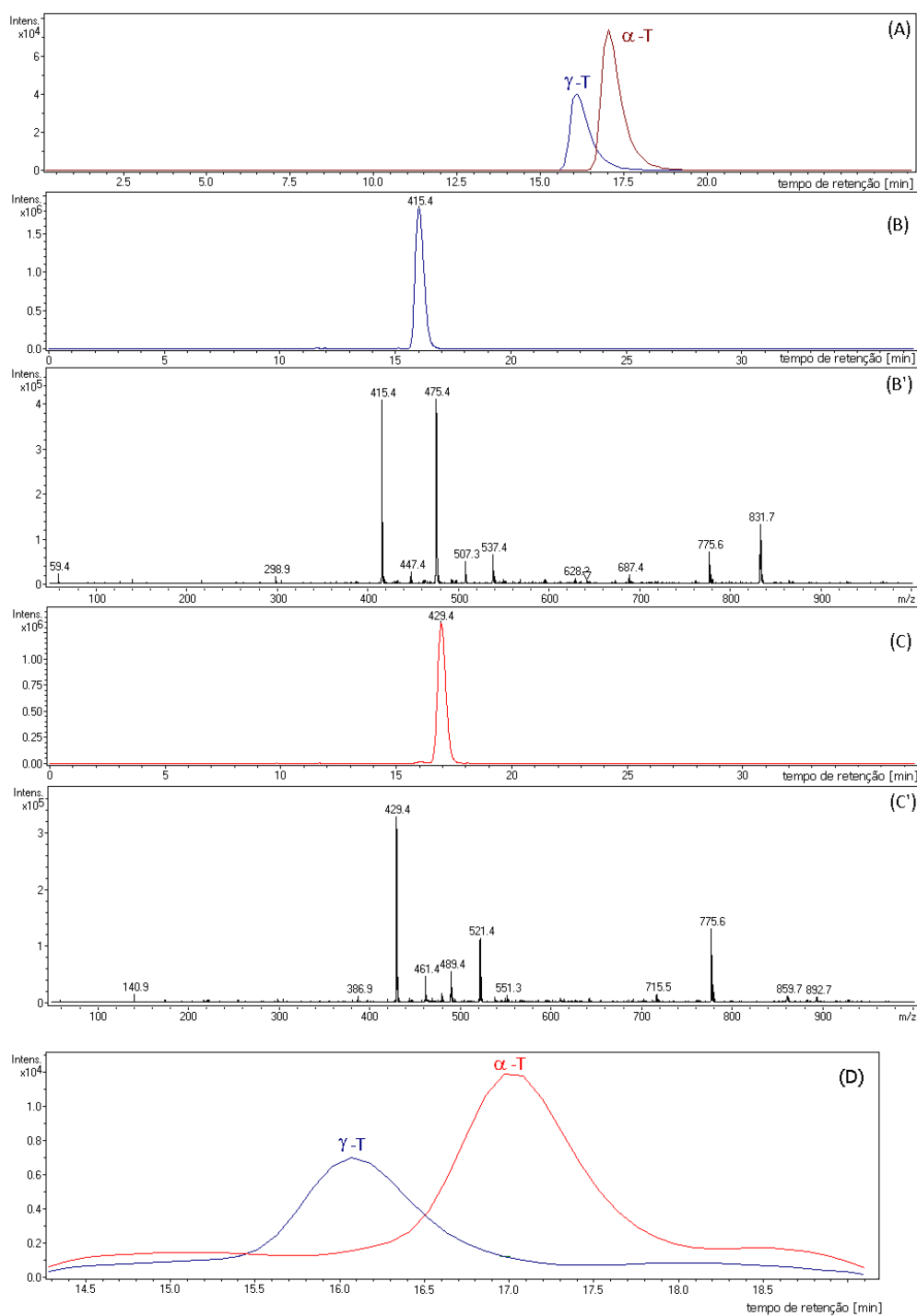


Figura 18: Cromatogramas do íon total (LC-ESI-MS/MS) da mistura de padrões α e γ -tocoferol (A) e da amostra OFAIP (D); Cromatogramas do íon extraído de cada padrão separadamente (B e C) e espectros de massa dos dois compostos (B' e C').

Usando apenas a cromatografia líquida sem a ferramenta da espectrometria de massas e por consequência, do espectro com o íon extraído, não seria possível detectar a presença destes compostos. Provavelmente por estarem em baixa concentração nos grãos e pela presença de interferentes. Entretanto, a ionização dos compostos ocorreu, pois seus pseudo-íons moleculares foram observados através da espectrometria de massas, como pode ser observado nos espectros da Figura 18 B' e C'.

A sequência de eluição e os íons moleculares detectados com essa técnica estão de acordo com os resultados encontrados na literatura^{4,13,31,33,35}.

A literatura relata que a vitamina E está presente em concentrações muito baixas no farelo de arroz. Yu⁴ e colaboradores quantificaram a vitamina E via LC-ESI-MS/MS em uma amostra de farelo de arroz, e, dos dois tocoferóis (γ - e α -) e dois tocotrienóis (γ - e δ -) investigados, foi detectado apenas γ -tocotrienol, com concentração na ordem de $106 \mu\text{g g}^{-1}$.

Existem alguns problemas que dificultam a determinação das vitaminas em alimentos, como por exemplo, as diferentes estruturas e propriedades químicas das vitaminas e também pelo fato que as vitaminas presentes nos alimentos estão em baixas concentrações. Também se deve considerar a alta complexidade das matrizes alimentares, em que as interferências químicas podem ser problemáticas em função da técnica utilizada. Contudo, essa limitação pode ser superada pelo uso da técnica LC-MS, conforme o tipo da amostra.⁶²

Usando-se apenas a técnica de LC-DAD com detecção na região de comprimento de onda na região dos tocóis ($\lambda = 290 \pm 10 \text{ nm}$), a detecção da vitamina E foi mais dificultada.

Na Figura 19 são apresentados os cromatogramas dos padrões γ e α -tocoferol através do LC-DAD, e os cromatogramas das cinco amostras de óleo analisadas. Todos os cromatogramas foram obtidos no comprimento de onda de $290 \pm 10 \text{ nm}$. O γ -tocoferol possui um tempo de retenção de 42 min, e o α -tocoferol de 46 min.

Observa-se similaridade entre o perfil cromatográfico das amostras de óleo de farelo e também entre as do óleo da farinha do grão de arroz. Contudo, percebe-se a baixa intensidade dos picos cromatográficos referentes aos compostos α e γ -tocoferol, assim como sua pouca resolução nas amostras.

Amostras de farelo de arroz e de arroz integral, de três variedades de arroz da Venezuela, foram avaliadas por Aguilar-Garcia⁴². No método HPLC usado, a fase móvel foi uma mistura de MeOH/ACN,15:85 (v/v), modo isocrático. Em uma amostra de farelo e em outra de arroz integral, o α -tocoferol não foi detectado, por estarem abaixo do limite de detecção de $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$. Os resultados das concentrações desses analitos, apresentados pelos autores, são mostrados na Tabela I (página 15).

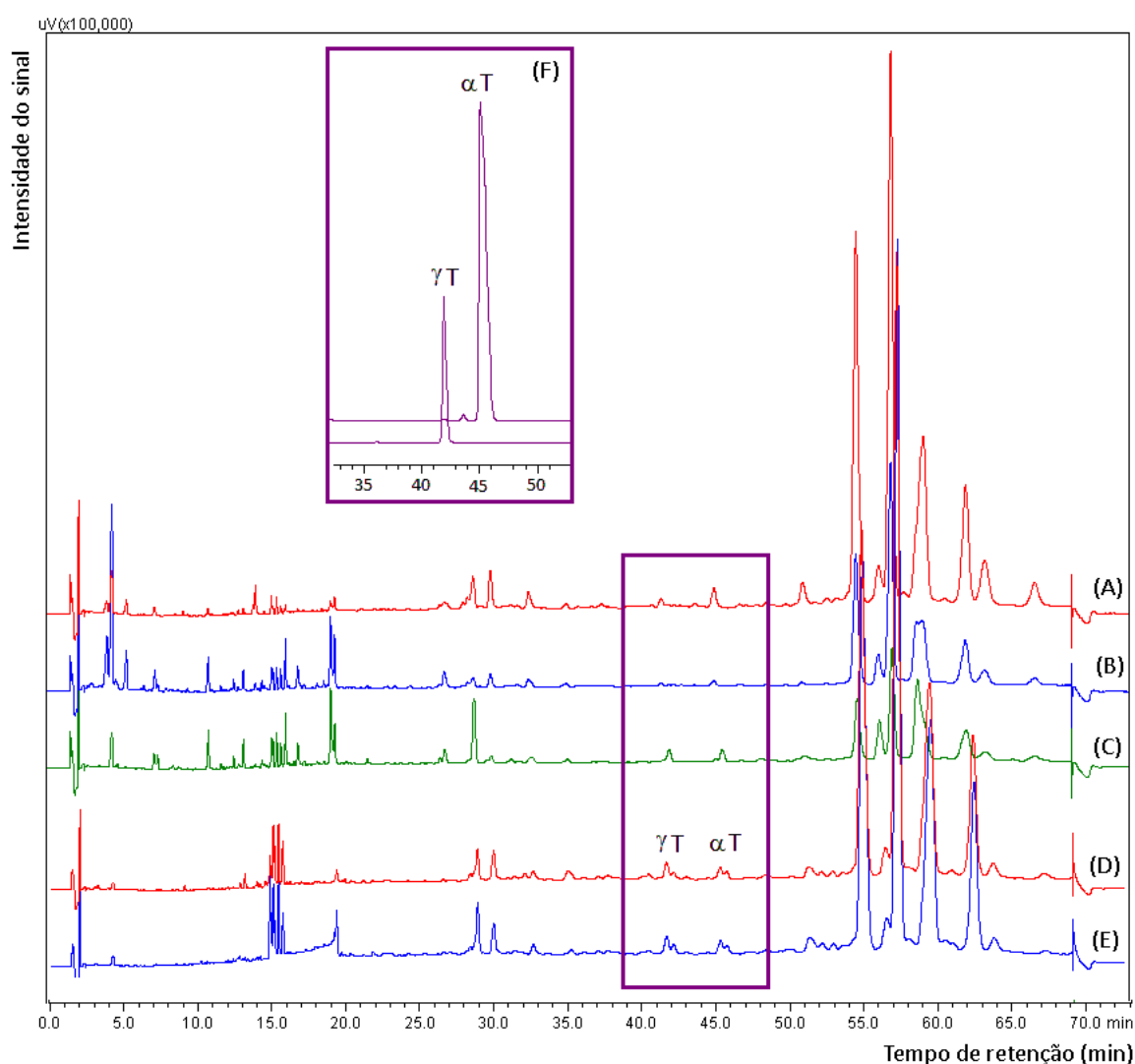


Figura 19: Cromatogramas obtidos via LC-DAD das amostras de óleos: (A) OFGAIP; (B) OFGAPP; (C) OFGABP; (D) OFAIP e (E) OFAI, com uma ampliação do cromatograma dos padrões em (F), $\lambda = 290 \pm 10 \text{ nm}$.

Adibi e Rennick²² utilizaram HPLC para analisar amostras de óleo de farelo de arroz, óleo de farelo de arroz com γ -orizanol e óleo de soja parcialmente hidrogenado usados para fritar batatas. Foram investigados os quatro tocoferóis (α -, β -, γ -, δ -) e tocotrienóis (α -, β -, γ -, δ -). Os resultados das análises do óleo de farelo de arroz, antes de ser utilizado para fritura, mostraram que nem todos os tocois foram detectados na amostra. A concentração de α -tocoferol foi de 118% e de γ -tocoferol foi de 4,64%, cálculos baseados em porcentagem de área. Os compostos β - e δ -tocoferol não foram detectados nas amostras em questão.

Em outro estudo utilizando HPLC, Rogers¹¹ e colaboradores, analisaram cinco amostras de óleo refinado de farelo de arroz de diferentes fabricantes. Seus resultados mostraram valores muito distintos entre si na quantidade de tocoferóis, de tocotrienóis. Por exemplo, em uma amostra (B) foi encontrado 16 mg L⁻¹ de tocoferóis, enquanto que em outra (E) a quantidade foi de 542 mg L⁻¹. O mesmo observou-se para análise de tocotrienóis. Na amostra B foi verificado uma concentração de 72 mg L⁻¹ e na amostra (E) a concentração foi de 1157 mg L⁻¹. Os autores concluíram que, tanto a origem como a variedade do arroz, como o tipo de processamento usado, afetam drasticamente a composição química do óleo produzido.

Os compostos α e γ -tocoferol foram também analisados através do acoplamento LC-DAD-ESI-MS/MS, sendo esse acoplamento realizado através de um *split*. Com essa técnica, além do espectro obtido do DAD, há também a confirmação através dos espectros de massas. Os cromatogramas obtidos apresentam perfis complexos, confirmando a baixa concentração destes compostos nas amostras estudadas. A Figura 20 apresenta os espectros de massas obtidos nesta técnica, nos tempos de retenção de 42,8 e 45,9 minutos, evidenciando a presença dos pseudo-íons moleculares m/z 415 (γ -tocoferol) e m/z 429 (α -tocoferol), porém, com baixa intensidade.

Embora a vitamina E não tenha sido quantificada nesse trabalho, presume-se a pequena concentração desses analitos nas amostras de óleo do farelo e menor ainda no óleo da farinha.

Resultados e Discussão

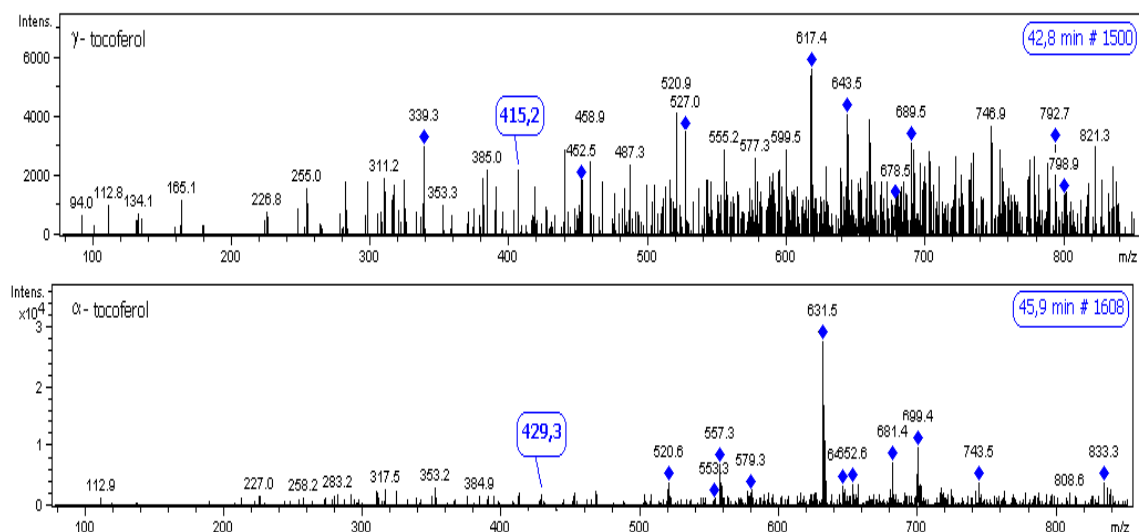


Figura 20: Espectros de massa obtidos pelo acoplamento LC-DAD-ESI-MS/MS, no modo negativo, da amostra de óleo de farelo de arroz integral parboilizado nos tempos de retenção do γ e α -tocoferol (42,8 e 45,9 min).

Os relatos sobre análises dos tocoferóis, usando a LC acoplada à espectrometria de massa, LC-ESI-MS/MS^{13,31,63}, apresentam a seguinte sequência de eluição: $\delta < \beta < \gamma < \alpha$. A literatura também cita que o uso da mistura de acetonitrila-água, como fase móvel, promove uma melhor separação cromatográfica do que quando é usado metanol-água, porém o tempo de análise fica prolongado¹³.

Na literatura há também informações sobre os efeitos da temperatura e da exposição à luz UV⁶⁴, além da instabilidade ao ar, umidade, luz e calor por parte das vitaminas, podendo resultar em uma subestimação da concentração do analito devido à degradação que pode ocorrer durante o preparo da amostra⁶⁵.

4.2.3 Considerações sobre as técnicas de análise da vitamina E

Dentre as técnicas utilizadas neste trabalho para a identificação da vitamina E nos óleos, a que apresentou melhores resultados foi LC-ESI-MS/MS.

Porque além dos espectros de massas, foram obtidos cromatogramas dos íons extraídos com ótima separação cromatográfica.

Com a análise via ESI-MS/MS também se obteve bons resultados. Uma vez que se pode ter um conhecimento prévio dos íons desses compostos.

A técnica com acoplamento através do *split* (LC-DAD-ESI-MS) não demonstrou grandes vantagens. Apesar da boa separação cromatográfica do γ -T e α -T, o tempo de retenção dos compostos foi maior. No LC-ESI-MS/MS os tocóis tiveram tempo de retenção de 16 minutos, enquanto que no LC-DAD ou no LC-DAD-ESI-MS o tempo de retenção foi de 42 min (γ -T) e 46 min (α -T).

4.3 ANÁLISE DOS ÁCIDOS GRAXOS

As cinco amostras (OFAI, OFAIP, OFGAPP, OFGAIP, OFGABP) foram analisadas para investigação dos ácidos graxos livres (FFA, do inglês *free fatty acids*) (linoléico, oléico e linolênico), através das técnicas: ESI-MS/MS, LC-DAD, LC-DAD-ESI-MS/MS e LC-ESI-MS/MS. Além desses, os ácidos totais (incluindo palmítico e esteárico) foram identificados e quantificados via GC-FID. Desta forma se utiliza todo o potencial das técnicas cromatografias disponíveis uma vez que, por cromatografia gasosa só podem ser analisados os ácidos após derivatização, a qual não diferencia a origem dos ácidos: se ligados na forma de glicerídios ou se livres na forma ácida. O total de ácidos indica o perfil do óleo, enquanto os FFA indicam a acidez e a qualidade do óleo em estudo.

4.3.1 Ácidos graxos livres: Análise por ESI-MS/MS e LC-ESI-MS/MS

Primeiramente os padrões dos ácidos graxos (linolênico, linoléico e oléico) foram analisados no modo negativo da ionização ESI, através de infusão direta no MS. Os íons dos espectros obtidos representam a perda de um hidrogênio da estrutura de cada ácido quando ocorre a primeira fragmentação indicando assim com precisão o seu peso molecular. Na sequência, os três ácidos foram investigados em todas as amostras.

A Figura 21 apresenta estes resultados. Devido à semelhança dos espectros, é mostrado apenas da amostra de óleo de farelo de arroz integral parboilizado (OFAIP). No modo de injeção direta, a solução da amostra é ionizada constantemente, ou seja, está sempre ocorrendo a fragmentação dos analitos da amostra. Na Figura 21(d) mostra-se um instante dessa ionização, onde se pode visualizar vários íons presentes na solução analisada, inclusive os íons característicos dos ácidos graxos (em destaque).

Após a identificação dos íons referentes aos ácidos graxos de interesse nas amostras, esses mesmos íons foram selecionados para que a fragmentação seja feita e confirmando assim presença do composto. A Figura 22 mostra esses íons selecionados e sua fragmentação.

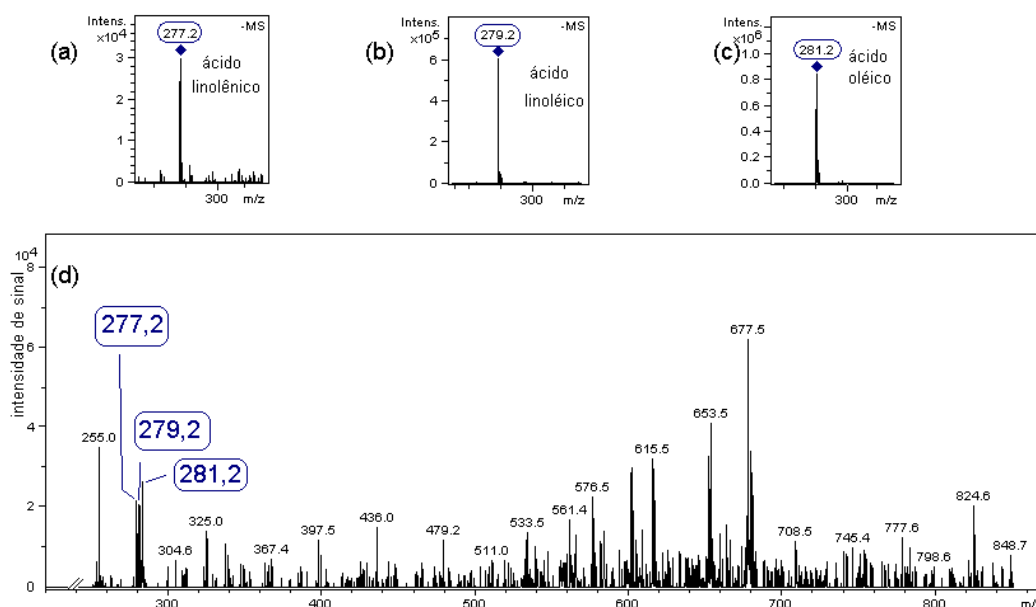


Figura 21: Espectrogramas ESI-MS dos pseudos-íons moleculares $[M-H]^{-1}$, no modo negativo, dos padrões do ácido (a) linolênico, (b) linoléico e (c) oléico, e espectro via ESI-MS dos pseudo-íons moleculares $[M-H]^{-}$, no modo negativo, da amostra OFAIP (d). Em destaque os ácidos linolênico (m/z 277), linoléico (m/z 279) e oléico (m/z 281).

Resultados e Discussão

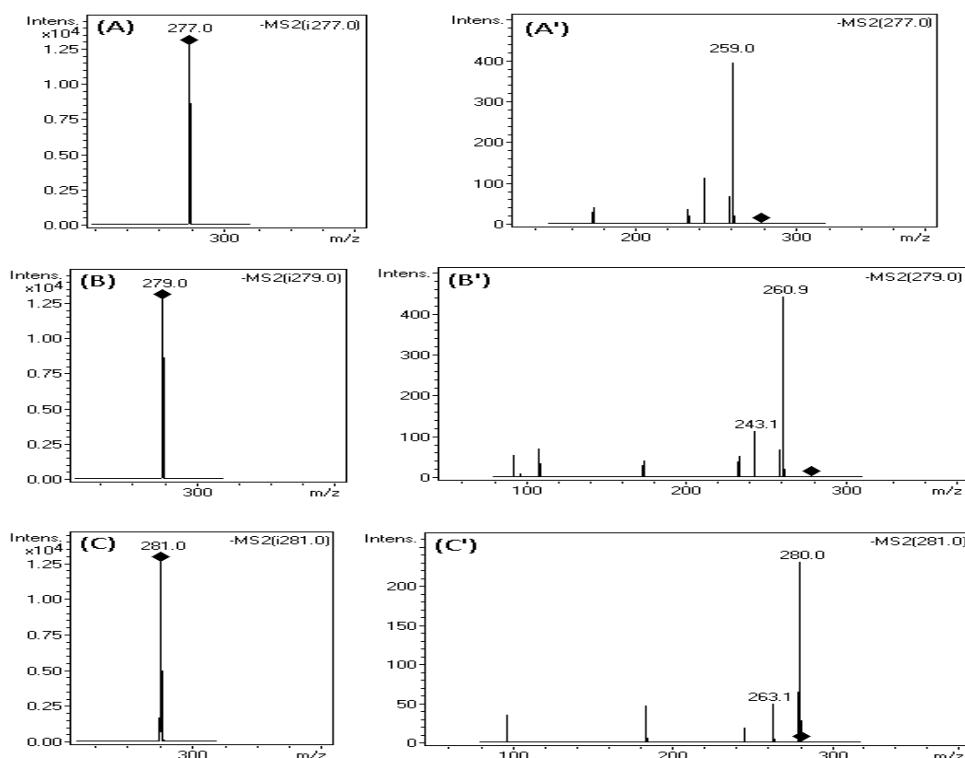


Figura 22: Espectrograma ESI-MS e MS/MS da amostra de óleo de farelo de arroz integral parboilizado, onde (A) é o espectro de massa dos pseudos-íons moleculares $[M-H]^-$ do ácido linolênico (B) do ácido linoléico e (C) do ácido oléico. E (A'), (B') e (C') os espectros dos fragmentos (MS/MS ou MS_2) dos pseudos-íons moleculares dos respectivos ácidos.

Nos espectros da esquerda desta Figura 22 têm-se os pseudo-íons moleculares de cada ácido. Na segunda fragmentação (espectros da direita) dos ácidos linoléico e linolênico, os íon m/z 259 e 261 indicam que há perda de uma molécula de água, pois a diferença é 18 para os íons m/z 277 e 279. Mas no espectro da segunda fragmentação do ácido oléico, há um intenso íon em m/z 280, provavelmente representando a perda de um hidrogênio de ligação dupla. Há também nesse espectro o íon m/z 263 indicando, simultaneamente, a possível perda de uma molécula de água da estrutura.

Após esta análise, realizou-se o acoplamento do sistema ESI-MS/MS com o sistema LC, injetando a mistura de padrões (ácidos linolênico, linoléico e oléico). Neste caso a fase móvel usada foi água e metanol, ambos com acetato de amônio como agente ionizante, com a finalidade de auxiliar a ionização.

Na Figura 23A consta o cromatograma do íon total referente aos três padrões dos ácidos. Na Figura 23B o íon extraído do ácido linolênico, m/z 277, 23C do ácido linoléico m/z 279 e 23D do ácido oléico m/z 281. E seus respectivos espectros de massa nas Figuras 23B', 23C' e 23D'.

Analisando o cromatograma da Figura 23A, nota-se que os picos quase se sobrepõem, não há uma boa resolução cromatográfica. Entretanto, através do íon extraído e, concomitantemente, da espectrometria de massa, essa dificuldade da baixa resolução cromatográfica é sanada. Pois, como mostram os espectros, os íons referentes aos ácidos podem claramente ser observados.

Nas mesmas condições dos padrões, as amostras também foram processadas através do acoplamento direto LC-ESI-MS/MS (Figura 23E). Como todas as amostras apresentaram um perfil cromatográfico semelhante, é mostrado apenas o resultado da amostra OFAIP.

Os picos dos ácidos que foram identificados nas amostras estão em concordância com os picos dos padrões, apresentando o mesmo tempo de retenção. Além disso, os compostos foram confirmados com os espectros de massa, através dos espectros obtidos do acoplamento da cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de massas (LC-ESI-MS).

Resultados e Discussão

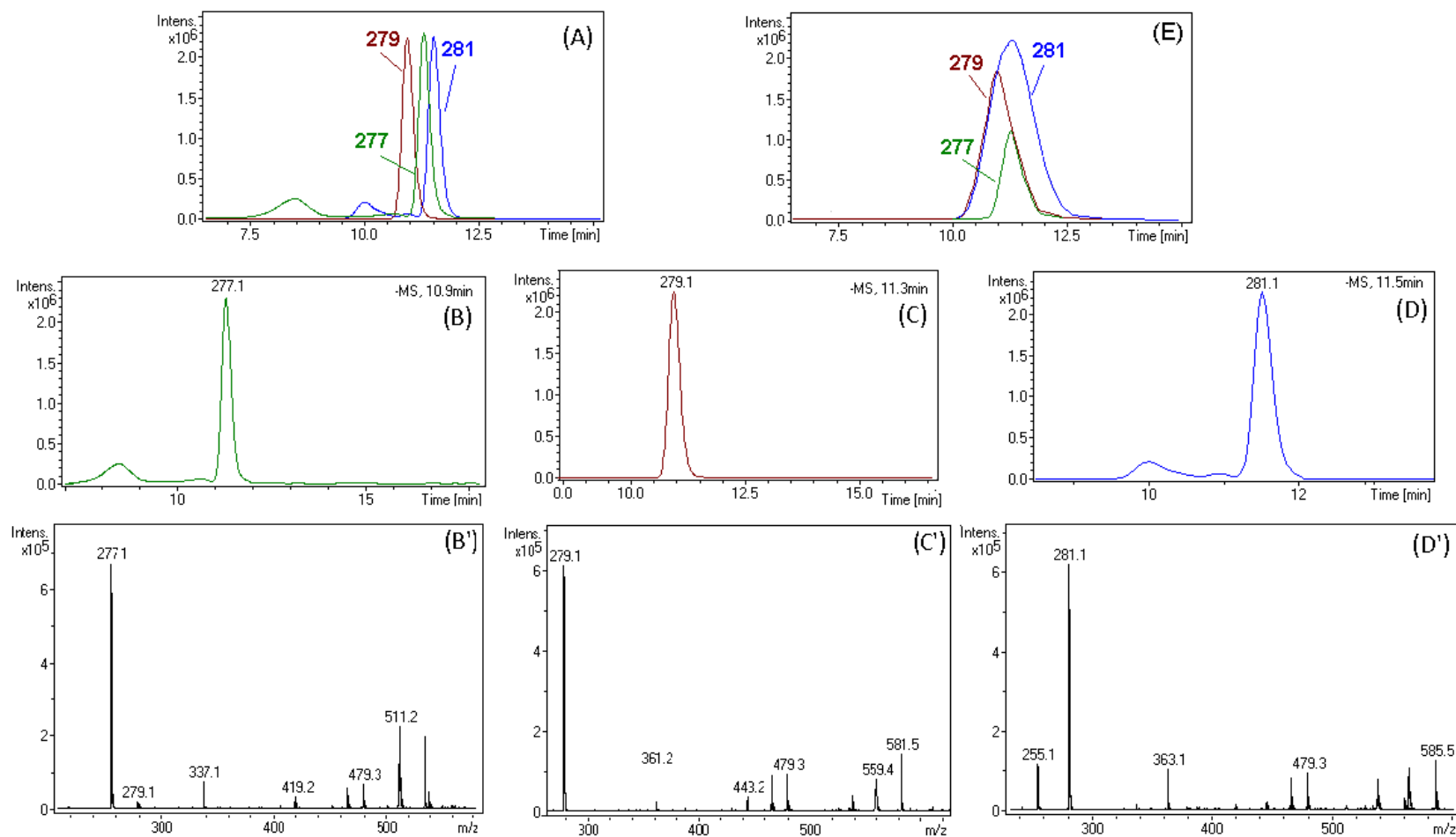


Figura 23: Cromatograma do íon total, via LC-ESI-MS/MS, da mistura dos padrões do ácido linolênico, linoléico e oléico (A), íon extraído de cada composto (B, C e D), seus respectivos espectros de massa (B', C' e D') e (E) cromatograma do íon total obtido para a amostra OFAIP.

Com a presença dos outros íons na amostra, a sobreposição dos picos referente aos ácidos fica mais evidente. Mas, quando se obtém o íon extraído, ou seja, eliminando-se os outros íons, cada pico cromatográfico apresentará um tempo de retenção diferente, logo, um cromatograma distinto. Podendo assim, serem visualizados individualmente.

Os FFA também foram analisados através da técnica de LC/DAD. Na Figura 24 são mostrados os cromatogramas dos padrões dos ácidos graxos oléico, linoléico e linolênico e os cromatogramas das 5 amostras de óleo estudadas neste trabalho, submetidas às mesmas condições dos padrões de ácidos graxos. Os espectros foram obtidos na região dos ácidos graxos livres, $\lambda = 190 \pm 10$ nm. Os tempos de retenção obtidos foram: ácido linolênico 18,5 min, ácido linoléico 20,5 min e ácido oléico 23,6 min.

Os tempos de retenção dos picos dos 3 ácidos identificados nas amostras, assim como os espectros obtidos do DAD, estão de acordo com os obtidos dos padrões. E comparando-se a intensidade dos picos cromatográficos da Figura 24, pode-se deduzir que há uma maior quantidade desses ácidos nas amostras do óleo de farelo arroz integral parboilizado, do que nas demais amostras. Provavelmente devido ao processo de parboilização, onde na etapa de encharcamento em água (em média por 3 h) e depois a autoclavagem, à uma temperatura média de 65°C, aumentando a acidez do meio.

O acoplamento do LC-DAD com a espectrometria de massas permitiu uma confirmação mais precisa sobre a presença ou não dos analitos em questão. Uma vez que, além do íon de interesse, também se pode comparar o pico cromatográfico com o espectro do DAD. Desta maneira, os ácidos foram confirmados nas amostras de óleo de arroz através dos espectros de massas e do DAD dos padrões dos ácidos graxos. Os espectros e cromatogramas obtidos foram muito semelhantes aos obtidos nas técnicas anteriores, e por esta razão não são apresentados aqui.

Resultados

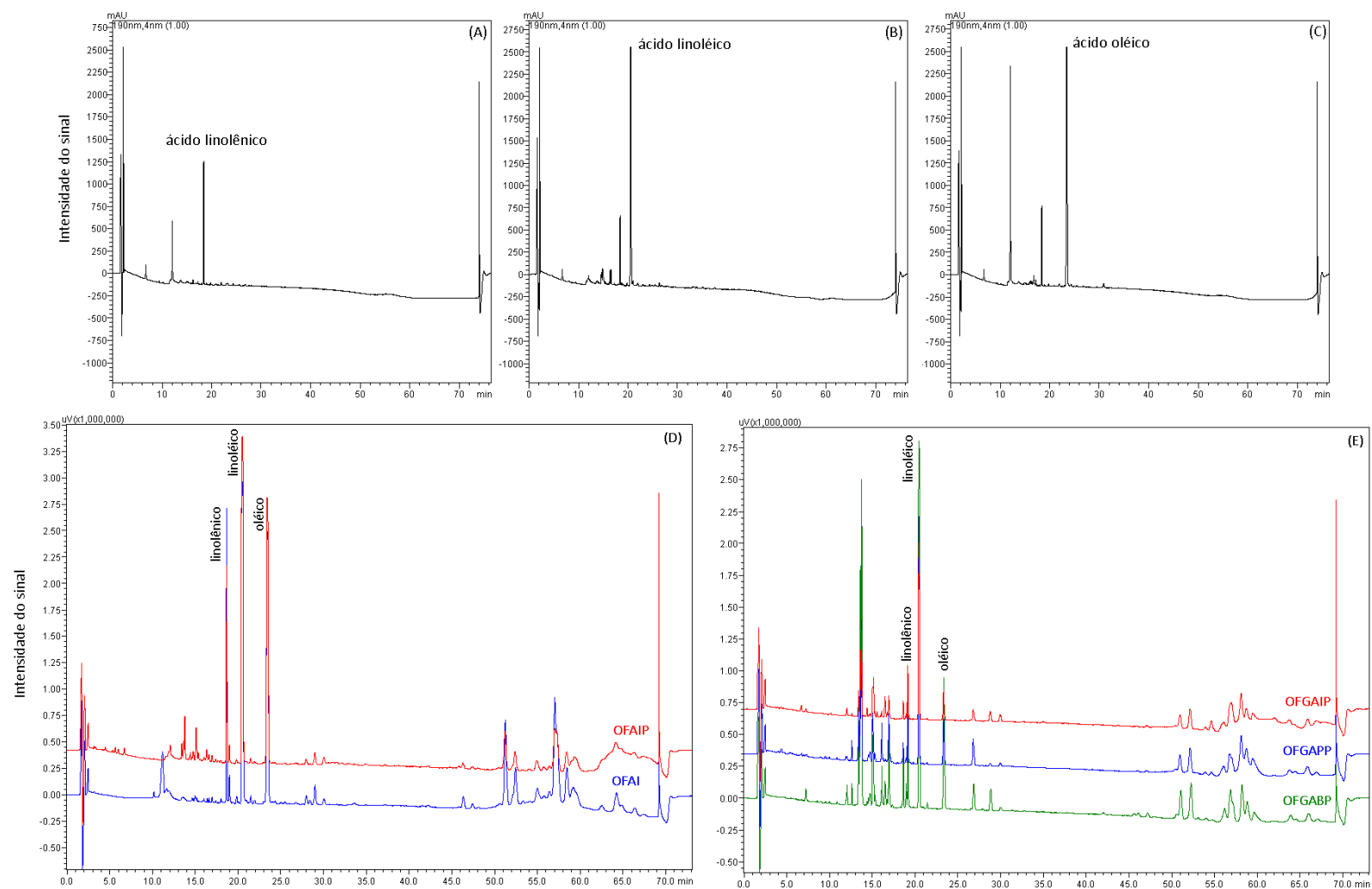


Figura 24: Cromatogramas obtido via LC-DAD das soluções dos padrões dos ácidos graxos: (A) linolênico; (B) linoléico; (C) oléico e das amostras de óleo de farelo de arroz (D) e de farinha de grão de arroz (E), $\lambda = 190 \pm 10$ nm.

Resultados

Convencionalmente, ácidos graxos são analisados por cromatografia gasosa com detector de massa (GC/MS) ou ionização em chama (GC-FID), após esterificação do óleo. Sabe-se que o óleo de farelo de arroz é constituído de 68 a 71% de triacilgliceróis, 2 a 3% de digliceróis, 5 a 6% de monogliceróis e apenas 2 a 3% de ácidos graxos livres²⁶. Sendo a maior parte dos ácidos graxos composta por glicerol, a melhor técnica para sua análise é a cromatografia gasosa após a esterificação do óleo. No entanto, para análise dos ácidos graxos livres, uma opção é a cromatografia líquida. Contudo, não foram encontrados estudos de análises de farelo ou de farinha de arroz por HPLC, tampouco, comparações entre as quantidades de ácidos existentes entre óleo de farelo e de farinha de grão de arroz.

Paucar-Menacho⁶¹ e colaboradores, através da caracterização físico-química, avaliaram o teor de acidez de um óleo bruto de farelo de arroz e do óleo obtido pelo refino físico. A porcentagem de ácidos graxos livres para o óleo bruto foi próximo de 1,5. Valores baixos de acidez para óleo são obtidos somente quando a indústria produtora de arroz tem seu processo de obtenção do óleo dentro da própria planta de produção, permitindo uma inativação eficiente das lipases que atuam fortemente no farelo. Óleos brutos de farelo de arroz disponíveis no mercado nacional apresentam teores elevados de acidez na faixa de 10 a 15% em ácidos graxos livres e apresentam colorações extremamente escuras, aproximando-se da cor negra. Os autores afirmam que, quanto maior a porcentagem de ácidos graxos livres no óleo bruto, maiores serão as perdas no refino do óleo.

Tendo a necessidade de se conhecer o teor ácido em um óleo, a cromatografia líquida pode ser uma alternativa para se quantificar os principais ácidos graxos livres presentes no óleo de arroz.

Os ácidos graxos oléico e linoléico desempenham importante papel no organismo humano. De acordo com Manhães⁶⁶ eles possuem ações antitrombóticas, anti-inflamatórias e estimulam a imunidade, além de estarem relacionados com a diminuição de doenças cardíacas e seus fatores de risco. As duplas ligações de compostos químicos presentes em alimentos que consumimos freqüentemente ocorrem na configuração *cis*. Ligações *trans*, também presentes, são resultados da hidrogenação, processo usado para aumentar viscosidade de

óleos. A maioria dos ácidos graxos *trans* da dieta apresentam n (número de insaturações) igual a 1 e cadeia de 18 carbonos.

Do ponto de vista nutricional, os ácidos linoléico e linolênico são considerados “ácidos graxos essenciais” e como não podem ser sintetizados pelo organismo humano deve ser ingeridos através da dieta, segundo Pestana e colaboradores²⁶.

Manhães⁶⁶ destaca em sua pesquisa que, além do seu papel nutricional, o ácido graxo essencial ω -3, derivado do ácido linolênico, pode ajudar a prevenir ou tratar uma variedade de doenças, incluindo doenças do coração, câncer, artrite, depressão e mal de Alzheimer entre outros.

4.3.2 Ácidos graxos totais: Análise por GC-FID

Como a maior parte dos ácidos graxos estão presentes nos óleos vegetais na forma de ésteres de glicerol, a identificação e quantificação destes ácidos passa por um processo de quebra desta ligação e a formação de um derivado metílico. Os ésteres metílicos resultantes da derivatização dos óleos de farelo e de farinha de arroz pela reação com BF_3 e metanol foram analisados pela cromatografia gasosa com detector de ionização em chama.

A identificação dos ésteres metílicos foi realizada através da comparação com o tempo de retenção dos padrões cromatográficos de ésteres metílicos de ácidos graxos (palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico).

Na Figura 25 são apresentados os cromatogramas referentes às amostras de óleo de farelo e de farinha de arroz integral parboilizado (OFAIP e OFGAIP) derivatizados com BF_3 metanólico. As demais amostras apresentaram resultados semelhantes, e por esta razão, seus cromatogramas não são apresentados.

A Tabela V apresenta os resultados da análise quantitativa realizada também por GC/FID com base na equação 4, seção 3.4.3.2, do teor de ácidos graxos totais nas amostras OFAIP e OFGAIP.

Com base na Tabela V, podemos verificar que as concentrações dos ácidos graxos são maiores no óleo do farelo de arroz do que na farinha dos grãos de arroz. Em ambas as amostras, os ácidos graxos insaturados linoléico e oléico apresentaram uma maior quantidade, seguido do ácido palmítico.

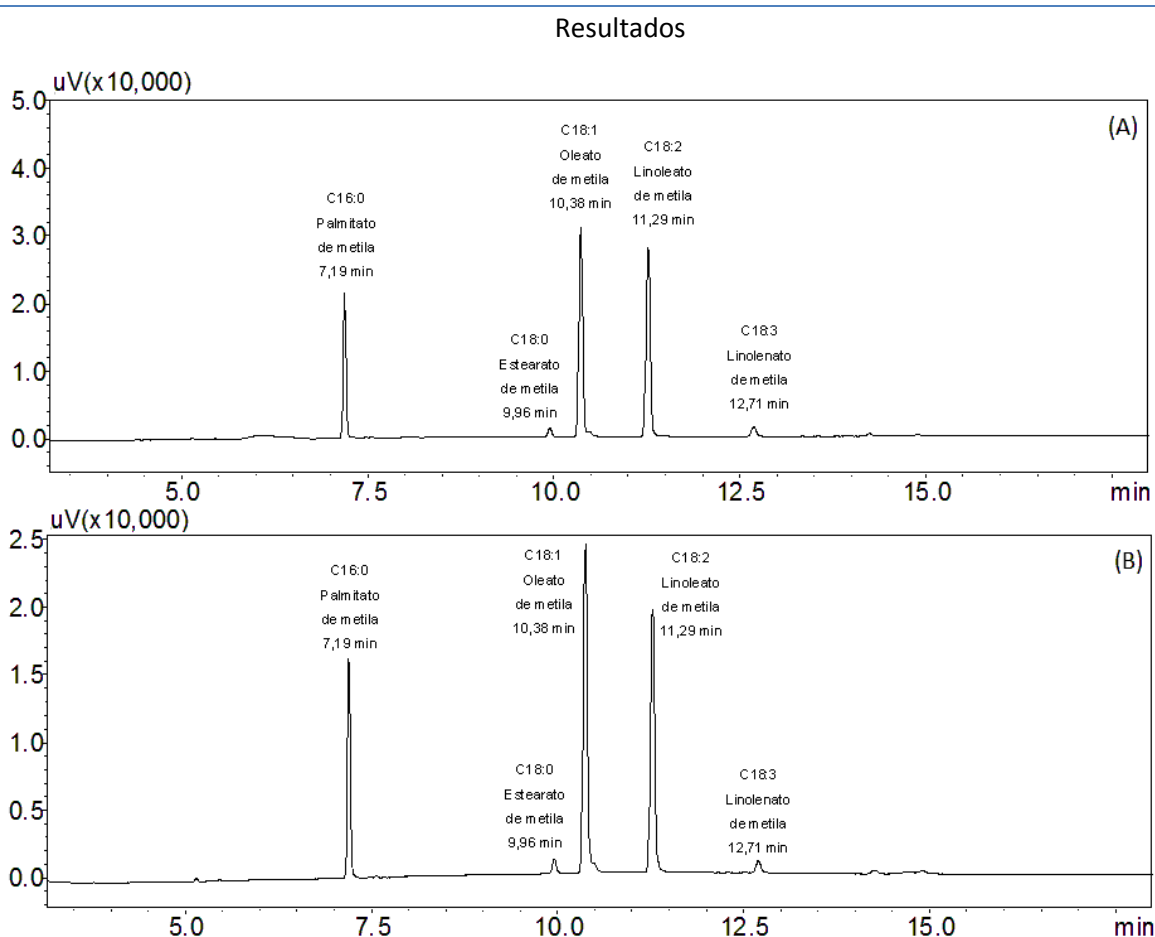


Figura 25: Cromatograma das amostras de óleo de farelo (A) e de farinha (B) de arroz integral parboilizado derivatizadas com BF_3 .

Tabela V: Concentração dos ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes nas amostras de óleo de farelo e de farinha dos grãos de arroz integral parboilizado.

Pico	Ésteres metílicos		tr (min)	Concentração %	
	Sigla*	Nome		Farelo (%)	Farinha (%)
1	C16:0	Palmitato de metila	7,19	16,46	16,35
2	C18:0	Estearato de metila	9,96	1,21	1,17
3	C18:1	Oleato de metila	10,38	37,43	37,30
4	C18:2	Linoleato de metila	11,29	41,41	41,15
5	C18:3	Linolenato de metila	12,71	3,31	3,20

* n° de carbonos na estrutura: n° de ligações duplas. Por exemplo, C16:0: contém 16 carbonos com nenhuma ligação dupla.

Os resultados encontrados nesse trabalho se assemelham aos mostrados por Gonçalves⁵⁸, onde os perfis cromatográficos de suas amostras (óleo extraído

de arroz submetido a diferentes processos de parboilização) mostraram-se similares entre si. Nesse trabalho foram encontrados 37 e 41% de ácido oléico e linoléico, respectivamente no arroz integral. No arroz parboilizado polido, Gonçalves⁵⁸ encontrou uma concentração de 40% do ácido oléico e 41% do linoléico, enquanto o ácido palmítico estava presente na concentração de 16% no arroz integral e 13% no parboilizado polido. Foram analisados os ésteres metílicos dos ácidos graxos extraídos dos óleos de farinhas de arroz, utilizando diferentes tempos e temperaturas de encharcamento, além de colunas capilares de sílica fundida DB-5 e carbowax HP 20M. Seus resultados mostram que a diminuição de óleo nos grão de arroz é provocada por aumentos da temperatura da água de encharcamento. Mas que essa variação da temperatura e duração da operação não alteram a distribuição dos ácidos graxos no óleo de arroz.

Em outro trabalho, o óleo bruto e óleo refinado de farelo de arroz parboilizado (Jaraguá do Sul-SC) foram usados para caracterização e comparação de seus constituintes. Seus resultados mostraram que os ácidos palmítico, oléico e linoléico são os principais ácidos graxos presentes nos óleos, constituindo mais de 90% da porção dos triacilgliceróis⁶¹.

Parrado⁶⁷ e colaboradores realizaram um estudo em amostras de farelo de arroz e o extrato enzimático do farelo de arroz. O farelo de arroz foi extraído com hexano, para análise dos ácidos graxos e investigados através do GC-FID. Os ácidos graxos que apresentaram maior concentração percentual foram: palmítico, com 16,4%, oléico, com 42,4% e o linoléico, com 36,4%. Essas concentrações são próximas às encontradas nesse trabalho.

Pestana²⁶ afirma que em óleo de farelo de arroz há uma quantidade muito pequena de ácido linolênico. Este óleo, associado ao óleo de girassol, na proporção 70:30 (v/v), pode reunir as vantagens do alto teor de matéria insaponificável do óleo de arroz e o alto teor de ácido linolênico do óleo de girassol.

Abidi e Rennick²² realizaram um estudo em óleo de farelo de arroz, óleo de soja parcialmente hidrogenado e óleo de farelo de arroz com γ -orizanol, originados de Stuttgart, AR. As análises foram via HPSEC-ELSD para os compostos não voláteis, GC-FID para os ácidos graxos e HPLC-UV para os tocóis e o γ -orizanol. Os resultados mostraram que, no óleo de farelo de arroz, a

composição percentual para os ácidos saturado palmítico e esteárico foi de 14,9 e 1,86% respectivamente. Os ácidos insaturados oléico, linoléico e linolênico, a concentração na amostra foi de 42,7; 36,8 e 1,22%, respectivamente.

4.3.3 Considerações sobre as técnicas na análise dos ácidos graxos

Os ácidos graxos totais são analisados e quantificados normalmente via GC-FID. Esta é a técnica convencional, sendo inclusive, a melhor para se analisar o glicerol após a esterificação^{58,60,61}.

Porém, para análise dos ácidos graxos livres, a cromatografia líquida foi mais conveniente. Dentre as utilizadas no presente trabalho, LC-ESI-MS/MS foi a mais adequada, uma vez que houve a confirmação da presença dos compostos nas amostras com os espectros obtidos do espectro do DAD do padrão. Também, com os espectros de massas, obtiveram-se os íons característicos aos ácidos graxos, permitindo uma completa caracterização.

As técnicas de cromatografia líquida e gasosa, acopladas à espectrometria de massas permitiram, portanto, a análise completa dos ácidos livres e ligados, presentes nas amostras estudadas.

4.4 ANÁLISE DOS CONSTITUINTES DA FRAÇÃO DE γ -ORIZANOL

As cinco amostras (OFAI, OFAIP, OFGAPP, OFGAIP, OFGABP) foram analisadas através das técnicas: ESI-MS/MS, LC-ESI-MS/MS, LC-DAD e LC-DAD-ESI-MS/MS. O γ -orizanol foi quantificado nas amostras de óleo de farelo e de farinha dos grãos de arroz integral parboilizado e o método analítico foi validado.

Inicialmente os constituintes do padrão do γ -orizanol foram analisados por injeção direta no ESI-MS/MS, no modo negativo. O espectro dos pseudo-íons moleculares $[M-H]^{-1}$ é apresentado na Figura 26. As amostras também foram analisadas nas mesmas condições dos padrões. A Figura 27 apresenta o espectrograma no modo SCAN da amostra OFAIP, onde os íons correspondentes aos constituintes da fração do γ -orizanol estão em destaque. Os demais espectros

Resultados

foram muito semelhantes, por esta razão não são apresentados aqui. Na Figura 28 tem-se os espectros dos fragmentos (MS/MS ou MS₂) dos ions [M-H-Me]⁻ de cada constituinte da fração de γ -orizanol.

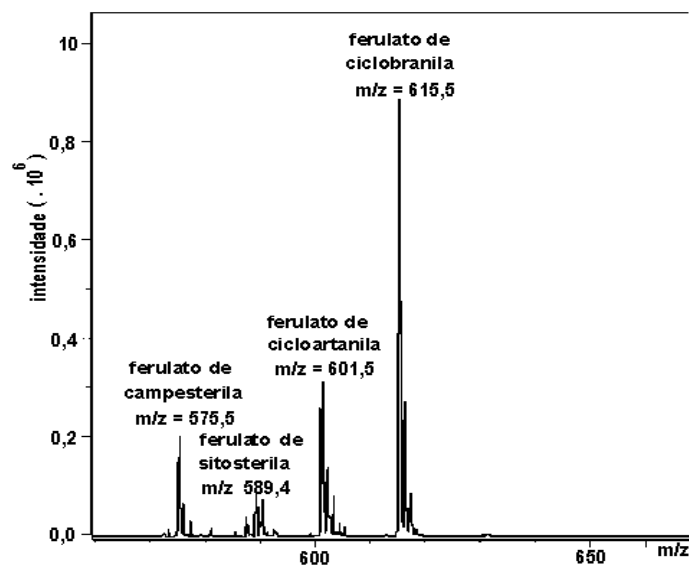


Figura 26: Espectrograma ESI-MS no modo negativo da solução padrão do γ -orizanol.

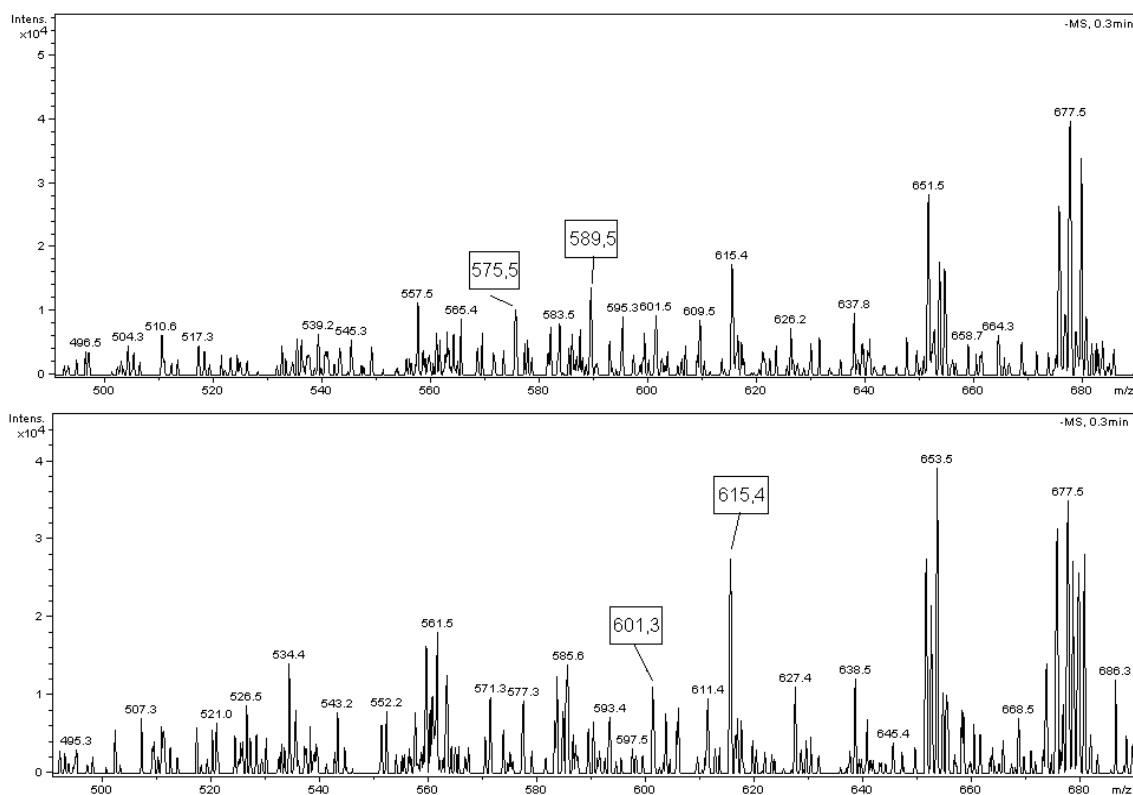


Figura 27: Espectro de massas obtido por ESI-MS no modo negativo da amostra OFAIP. Com os pseudo-íons moleculares em destaque: m/z 575, m/z 589, m/z 601, m/z 615.

Resultados

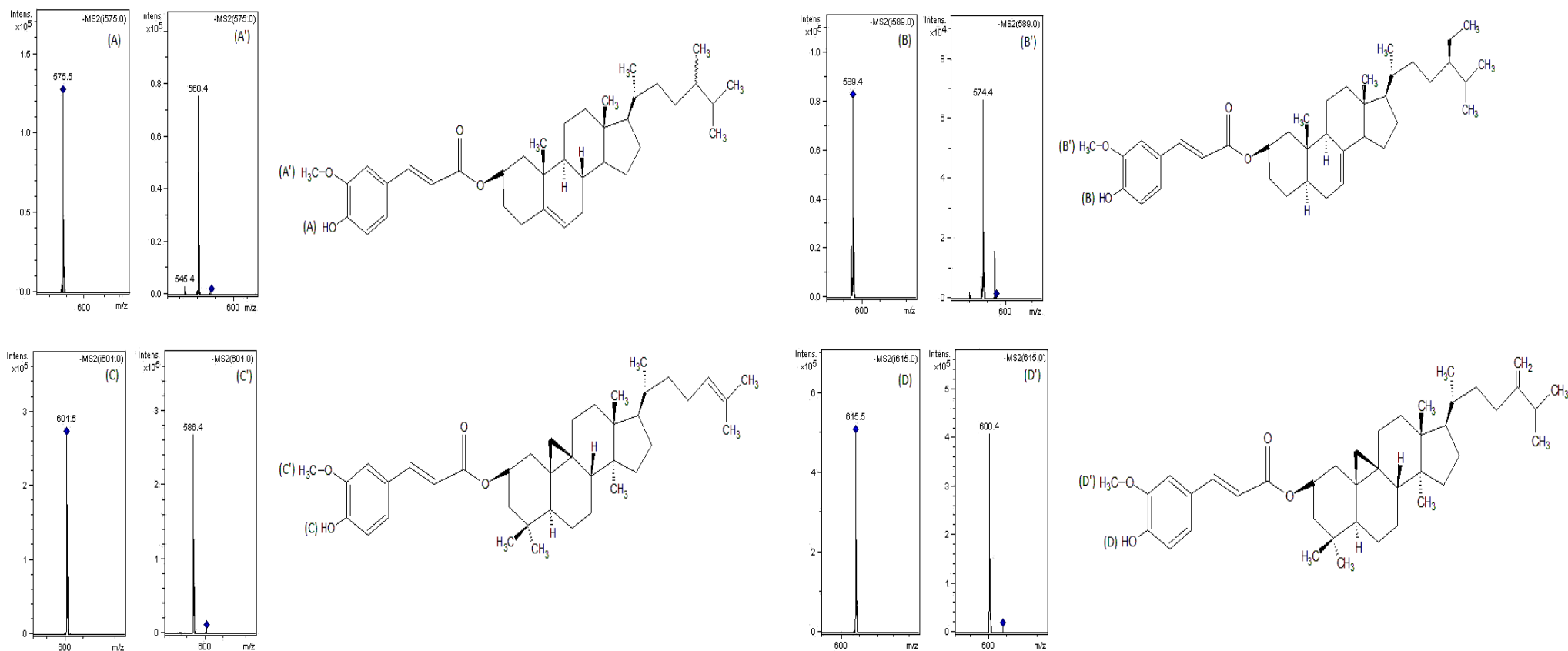


Figura 28: Espectro ESI-MS e ESI-MS/MS no modo negativo da solução padrão do γ -orizanol, onde em (A) é mostrado o espectro (MS) dos pseudos-íons moleculares $[M-H]^-$ do ferulato de campesterila, em (B) do ferulato de sitosterila, em (C) do ferulato de cicloartanila e em (D) do ferulato de ciclobranila. (A'), (B'), (C') e (D') são os espectros dos fragmentos (MS/MS ou MS₂) dos pseudos-íons moleculares $[M-H-Me]^-$ dos respectivos compostos.

Resultados

Utilizando o modo negativo de ionização ESI-MS foram produzidos íons moleculares desprotonados. Esses íons estão de acordo com as estruturas dos quatro principais constituintes da fração do γ -orizanol (Figura 28), previamente identificados em óleo de farelo de arroz^{3,11,29}. Os dados dos íons moleculares desprotonados do MS para esses compostos, assim como, os fragmentos resultante da perda de diferentes grupos metílicos são apresentados na Tabela VI.

Tabela VI: Dados do ESI-MS para os constituintes do γ -orizanol no óleo de farelo e de farinha de arroz.

Estrutura	[M-H] ⁻	[M-H-Me] ⁻	[M-H-2Me] ⁻
A	575	560	545
B	589	574	559
C	601	586	-
D	615	600	-

O acoplamento direto do LC com a espectrometria de massas (LC-ESI-MS), usando como fase móvel água e metanol, ambos com acetato de amônio para facilitar a ionização, propicia um tempo de análise consideravelmente menor. Além disso, nesse caso não há necessidade de resolução cromatográfica dos picos para a identificação dos compostos de interesse. As cinco (5) amostras e a solução padrão dos constituintes do γ -orizanol foram analisadas pela técnica. A Figura 29 apresenta o cromatograma do íon total para a amostra OFAIP, os cromatogramas dos íons extraídos para os constituintes do γ -orizanol e os seus respectivos espectros de massas.

Apesar da coeluição dos compostos ferulato de ciclobranol (m/z 615) e ferulato de campesterila (m/z 575), estes podem ser identificados quando se obtém o íon extraído, sem que esse fato interfira na identificação. Esta é uma grande vantagem da técnica LC-ESI-MS, porque não é necessário que haja uma total separação cromatográfica dos picos para que os analitos sejam identificados na amostra.

Resultados

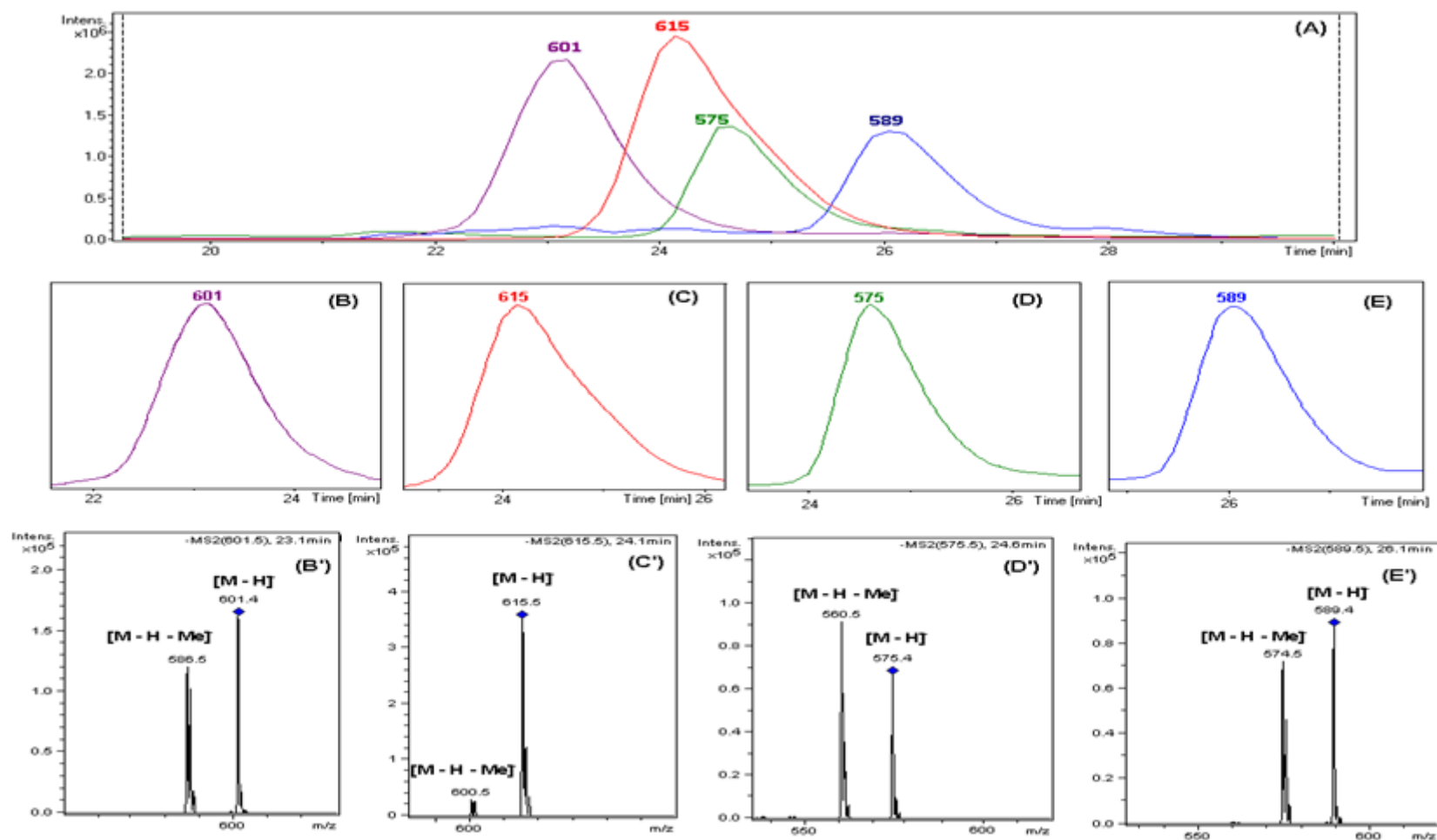


Figura 29: Cromatograma do íon total para a amostra OFAIP (A) e cromatogramas de íons extraídos e espectros de massa para os compostos (B e B') ferulato de cicloartenila, m/z 601; (C e C') ferulato de ciclobranila, m/z 615; (D e D') ferulato de campesterila m/z 575; (E e E') ferulato de sitosterila m/z 589. Dados obtidos na análise LC-ESI-MS da solução padrão dos constituintes do γ -orizanol.

Resultados

Os picos cromatográficos identificados com o espectro de massas nas amostras estão de acordo com os espectros do padrão, assim como seus íons. Durante a análise, além de selecionar os íons de interesse, tem-se a opção de fragmentá-los. Os íons dos espectros da Figura 29 (B', C', D', E') representam essa fragmentação. Os íons dos espectros da Figura 29 (B', C', D', E') representam essa fragmentação. Nesses espectros estão os pseudo-íons moleculares referentes à perda de um hidrogênio da estrutura $[M-H]^-$, m/z 601, 615, 575 e 589 e seus respectivos fragmentos, indicando a perda de uma metila $[M-H-Me]^-$, m/z 586, 600, 560 e 574.

Na Figura 30 são apresentados os cromatogramas obtidos através da análise por LC-DAD dos óleos dos farelos de arroz e das farinhas de grãos de arroz, para a análise dos constituintes da fração γ -orizanol, os quais apresentam absorção no comprimento de onda de 320 ± 10 nm.

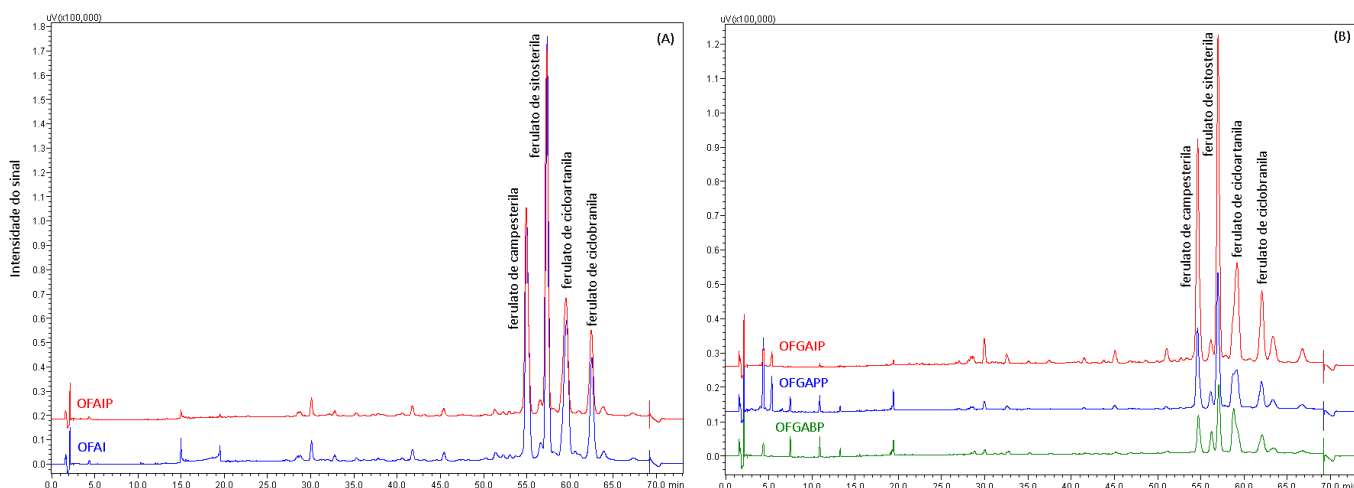


Figura 30: Cromatogramas obtidos via LC-DAD das amostras de óleos de farelo de arroz (A) e de farinha dos grãos de arroz (B), $\lambda = 320 \pm 10$ nm.

Verifica-se grande semelhança do perfil cromatográfico das amostras de óleo do farelo de arroz e também entre as amostras do óleo da farinha dos grãos de arroz. Estando presentes, em todas as amostras, os quatro constituintes principais do γ -orizanol. A Figura também sugere, através da intensidade dos sinais, que no farelo de arroz, esses compostos estejam em maior quantidade. Esse fato pode ser confirmado com a análise quantitativa e validação da metodologia, e também está de acordo com os valores encontrados na revisão bibliográfica^{3,10,11,31}.

No trabalho desenvolvido por Rogers e colaboradores³³, onde foram analisadas amostras de óleo refinado de farelo de arroz de diferentes fabricantes por HPLC-UV-Vis e GC/MS, usando acetonitrila ou metanol isoladamente como fase móvel tiveram piores resultados na resolução de γ -orizanol. Mas com a combinação de acetonitrila:metanol (50:45, v/v) obtiveram melhores resultados. Também foram analisados δ , β/γ e α -tocoferol e δ , β/γ e α -tocotrienol, onde foi observado que com uso do detector de fluorescência houve um aumento da sensibilidade em relação ao UV. Os autores também relatam que os componentes do γ -orizanol encontraram-se separados dos tocoferóis e dos tocotrienóis, fato este também comprovado nos estudos desenvolvidos neste trabalho.

Stöggel e colaboradores³¹ compararam o uso de C18 e C30 como fases estacionárias para analisar γ -orizanol, tocoferóis (α , β , γ , δ -tocoferol) carotenóides (β -caroteno) e fitoesteróis em amostras de óleo cru de farelo de arroz. Os resultados mostraram que, utilizando cromatografia líquida em fase reversa (RP-LC) com C30 como fase estacionária e metanol:ter-butil metil éter como fase móvel, o método é mais eficiente e obtem-se melhor resolução entre todos os compostos investigados.

A cromatografia líquida com detector DAD acoplada à espectrometria de massa foi utilizada para analisar as duas (2) amostras de óleo de farelo e as três (3) amostras óleo de farinha de grãos de arroz. Esta análise foi apenas comprobatória das investigações anteriores, apresentado um cromatograma idêntico aos conseguidos no sistema LC-ESI-MS/MS, razão pela qual seus resultados não são discutidos separadamente.

4.4.1 Análise quantitativa de γ -orizanol usando LC-DAD

A concentração do γ -orizanol, considerando-se os 4 constituintes da fração, para cada amostra de óleo de arroz foi calculada conforme as Equações 1 e 2, e os resultados estão apresentadas na Tabela VII.

Conforme previsto, o óleo do farelo de arroz apresentou índices maiores de γ -orizanol do que a farinha de arroz, o que confirma que o farelo contém maior quantidade de nutrientes/orizanol. Importante também mencionar que o arroz

Resultados

integral parboilizado apresenta maior quantidade de γ -orizanol no farelo (0,81%) do que na farinha (0,51%).

Tabela VII: Concentração da fração de γ -orizanol nas amostras.

Amostra	Concentração de γ -orizanol (%)	DPR (%)
Óleo de farelo de arroz integral	0,94	1,28
Óleo de farelo de arroz integral parboilizado	0,81	0,13
Óleo de farinha de arroz integral parboilizado	0,51	0,19
Óleo de farinha de arroz parboilizado polido	0,16	0,04
Óleo de farinha de arroz branco polido	0,12	0,45

Analisando as amostras de óleo de farinha, também se comprova que o processo de parboilização aumenta o teor de γ -orizanol no grão, pois durante esse processo o γ -orizanol migra para o interior do grão. Também a farinha do grão integral parboilizado tem um teor maior de γ -orizanol do que no grão parboilizado polido, e muito mais que no arroz branco polido, indicando que o polimento retira uma grande quantidade deste composto.

Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Gonçalves⁵⁸ onde o teor de γ -orizanol foi avaliado em amostras de óleo de arroz. Seus resultados mostraram que no óleo do grão parboilizado polido o teor de γ -orizanol foi de $3,6 \mu\text{g g}^{-1}$ de óleo. Esse valor foi cerca de 6 vezes maior do que a quantidade obtida do grão polido não parboilizado ($0,63 \mu\text{g g}^{-1}$ de óleo), evidenciando a migração da fração do γ -orizanol para o interior do grão, decorrente do processo de parboilização.

Yu⁴ em 2007 publicou um trabalho onde quantificou via LC-ESI-MS/MS γ -orizanol e vitamina E em amostras de farelo e germe de arroz. Os resultados indicaram que a quantidade desses compostos é praticamente a mesma no germe de arroz. Entretanto, quando a análise foi realizada no farelo, γ -orizanol apresentou uma concentração de 2813 mg kg^{-1} , 27 vezes maior que a concentração da vitamina E (106 mg kg^{-1}).

O teor de γ -orizanol também foi avaliado em farelo e em óleo de farelo de arroz por Norton⁶⁸. A quantidade do composto determinada pelo autor foi de $3,4 \text{ mg g}^{-1}$ no farelo e de $15,7 \text{ mg g}^{-1}$ no óleo do farelo.

4.4.1.1 Validação da metodologia LC-DAD

4.4.1.1.1 Seletividade

A seletividade do método cromatográfico foi avaliada através do branco da amostra, análise da pureza dos picos referentes ao γ -orizanol nos cromatogramas das amostras e padrões, além da comparação do espectro do padrão com os espectros presentes nas amostras. O branco da amostra, solvente carregador – acetonitrila:metanol:iso-propanol) (Figura 31) não apresentou picos próximos ao tempo de retenção do γ -orizanol. A pureza dos picos cromatográficos referentes ao γ -orizanol na análise do padrão e das amostras (OFAIP e OFGAIP) é mostrada na Figura 32, sendo que estes se apresentaram puros através da análise do DAD.

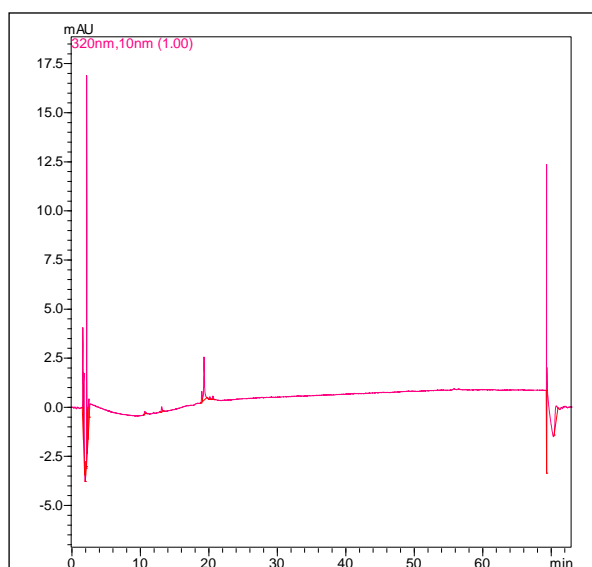


Figura 31: Cromatograma obtido por LC-DAD para o branco da amostra (solvente – acetonitrila:metanol:iso-propanol).

Resultados

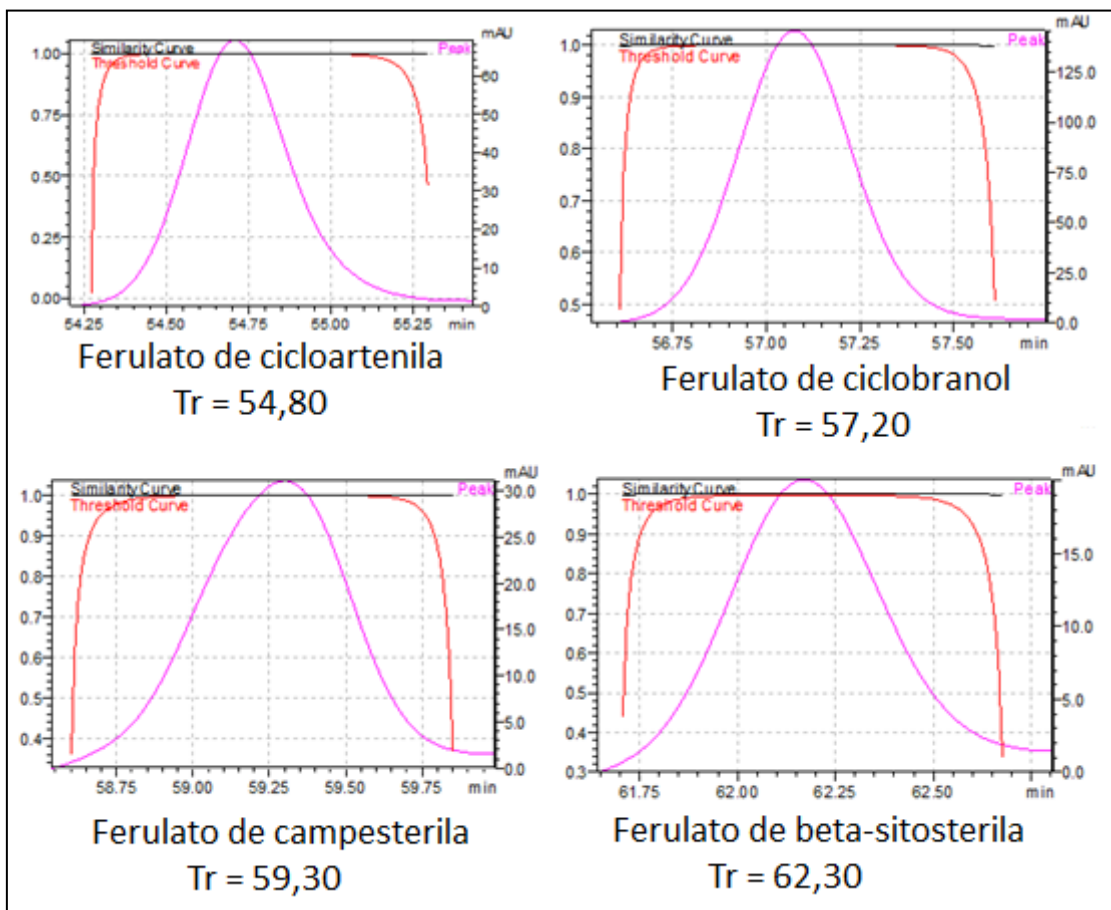


Figura 32: Cromatogramas LC-DAD que demonstra a pureza dos picos do γ -orizanol em seus respectivos tempo de retenção.

O índice de similaridade entre os espectros UV do padrão e da amostra está descritos na Tabela VIII e demonstram que os constituintes do γ -orizanol presentes nas amostras são os mesmos presentes no padrão empregado.

Tabela VIII: Índice de similaridade entre o padrão e as amostras.

Composto	OFAIP	OFGAIP
(1) ferulato de cicloartenila	0,999333	0,999985
(2) ferulato de ciclobranól	0,999597	0,999583
(3) ferulato de campesterila	0,999395	0,999827
(4) ferulato de sitosterila	0,997606	0,999721

4.4.1.1.2 Linearidade e Intervalo linear

A determinação da linearidade e do intervalo linear foi executada em triplicata a partir da construção de uma curva de calibração. Esta curva foi construída em duplicata, na faixa de concentração de 100 a 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a fração de γ -orizanol por LC-DAD e os valores estão apresentados na Tabela IX.

A representação gráfica da curva analítica e de calibração para os constituintes do padrão do γ -orizanol encontra-se na Figura 33. Observa-se que a curva de calibração apresentou um R^2 de 0,9996 demonstrando que o método é linear dentro do intervalo de concentração testado (100-300 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Segundo o ICH⁵¹ (Q2(R1)-2005), o valor mínimo aceitável do coeficiente de correlação (R) da curva de calibração é de 0,998. Na elaboração da regressão, optou-se por trabalhar com o método dos mínimos quadrados por ser a técnica mais amplamente utilizada para encontrar a equação da “melhor” reta que passa através dos pontos experimentais. Através desse método, obteve-se a equação da reta $y = 31422x - 299353$.

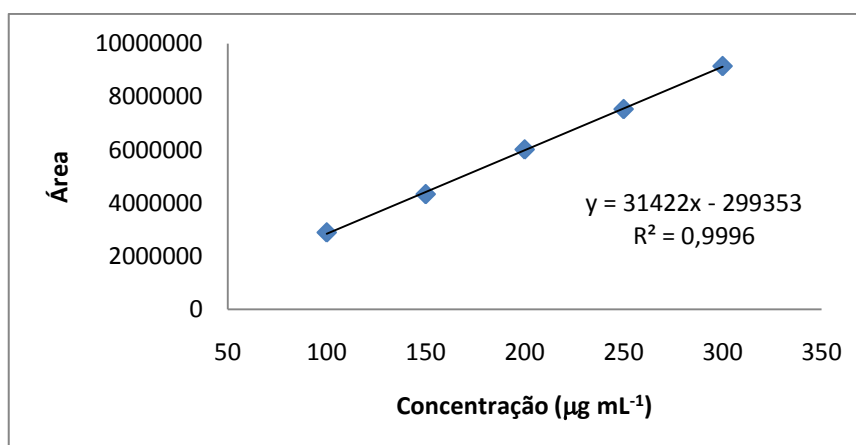


Figura 33: Curva analítica para os constituintes do padrão γ -orizanol, obtida por LC-DAD.

A curva obtida mostra que os resultados da metodologia analítica são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, podendo ser relacionada com a área dos picos cromatográficos. O intervalo de linearidade do método ficou definido entre 93 - 292 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Resultados

Tabela IX: Resultados da curva da linearidade para os constituintes do γ -orizanol, por LC-DAD.

Composto	CTi ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Áreas dos picos cromatográficos (padrão)							CR ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Precisão (DPR)	Exatidão (%)
		Curva 1			Curva 2			Média das 2 curvas			
		Área 1	Área 2	Média 1	Área 1	Área 2	Média 2				
1 (50 %)	100	2908362	2902578	2905470	2882342	2881212	2881777	2893623	93	0,58	93,04
2 (75 %)	150	4357893	4366728	4362310	4306769	4305018	4305893	4334102	139	0,92	92,59
3 (100 %)	200	6078566	5981479	6030022	5971406	6029095	6000250	6015136	192	0,35	96,19
4 (125 %)	250	7437155	7688114	7562635	7528425	7477902	7503164	7532899	241	0,56	96,27
5 (150 %)	300	9291324	9284883	9288104	8999098	9023927	9011513	9149808	292	2,14	97,38

CTi = concentração teórica inicial; CR = concentração real encontrada; DPR = desvio padrão relativo ou coeficiente de variação

Resultados

A partir do gráfico da linearidade, pode ser feita a relação entre a concentração e o resíduo, representado na Figura 34, e a análise da regressão descrita na Tabelas X.

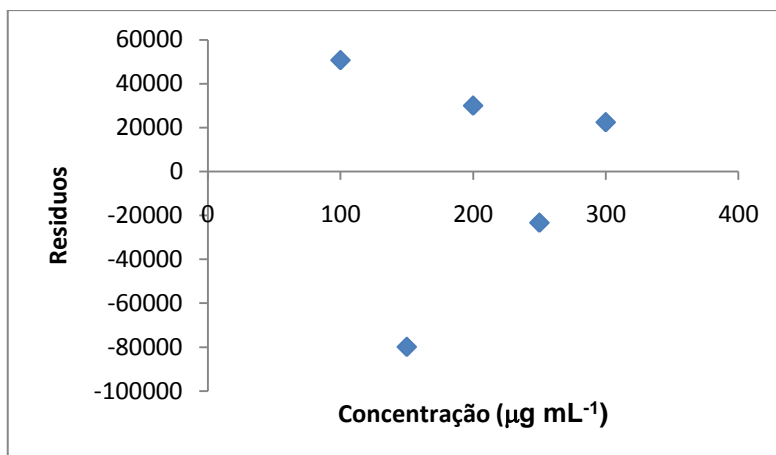


Figura 34: Gráfico dos resíduos para a determinação quantitativa do γ -orizanol, por LC-DAD.

Tabela X: Resultados da análise da regressão da curva de linearidade

Estatística da regressão	
R Múltiplo	0,9997791
R-Quadrado	0,9995583
R-Quadrado ajustado	0,9994110
Erro padrão	60299,855
Observações	5

Tabela XI: Análise da variância da curva de linearidade.

Fontes de variação	gl	SQ	MQ	F	F de Significação
Regressão	1	2,46841e ⁺¹³	2,4684 e ⁺¹³	6788,6647	3,94061 e ⁻⁶
Resíduo	3	10908217380	3636072460	-	-
Total	4	2,4695 e ⁺¹³	-	-	-

SQ - Soma dos quadrados

MQ - Quadrados médios

A partir da análise de variância podemos testar a validade e a significância estatística da curva ajustada. A análise de variância dos dados demonstrou que a hipótese nula (H_0) deve ser rejeitada já que o valor - p é menor que 0,05 ($p=3,94 \times 10^{-6}$) e os valores de $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$ ($F_{\text{calculado}} = 6788,6647 > F_{\text{tabelado}}(0,05; 1,3) = 10,13$). Ao rejeitar a hipótese nula aceitamos a hipótese alternativa (H_1), onde $H_1: B_1 \neq 0$, significando que a inclinação da reta da regressão não é nula, demonstrando que a regressão é significativa e existe uma forte relação estatística entre as variáveis. Observa-se no gráfico dos resíduos resultante da duplicata das curvas que a distribuição é aleatória, não existindo um padrão ou auto correlação aparente entre os resíduos.

4.4.1.1.3 Precisão e Exatidão

Os resultados de precisão e exatidão estão apresentados nas Tabelas XI e XII.

Tabela XII: Precisão intra-dia das amostras de óleo de farelo e de grão de arroz integral parboilizado.

Analista	Óleo de farelo de arroz integral parboilizado				Óleo de grão de arroz integral parboilizado (farinha)			
	Ci ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Ce (%)	DPR (%)	Ci ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Ce (%)	DPR (%)
1	247,56	1,07	0,72	1,41	173,86	2,20	0,5	2,43
2	246,72	2,01	0,73	1,09	169,99	4,07	0,50	4,21

Ci = Concentração de γ -orizanol na solução injetada ($\mu\text{g mL}^{-1}$) Ce = Concentração encontrada de γ -orizanol (%).

Tabela XIII: Resultados de precisão inter-dia para a análise das amostras de óleo de farelo e grão de arroz.

Amostras	Precisão inter-dia			
	Ci ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Ce (%)	DPR (%)
Farelo	247,14	0,17	0,72	0,79
Farinha	171,93	1,12	0,51	1,32

Resultados

A repetitividade (precisão intra-dia) foi analisada através de seis determinações, realizadas no mesmo dia e pelo mesmo analista. A precisão intermediária (precisão inter-dia) foi verificada através da análise de doze determinações, realizadas por 2 analistas diferentes e em dias diferentes.

Para análise de quantificação, recomenda-se que o desvio padrão relativo da precisão seja de no máximo 5% ⁵¹. Portanto, o método proposto é preciso.

A exatidão foi verificada através dos testes de recuperação no nível de 100 %. A concentração teórica foi calculada em função do resultado obtido na precisão, onde 65 mg de óleo de farelo apresentaram 247,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de γ -orizanol (concentração da solução injetada) e 30 mg deveriam representar 114 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de γ -orizanol. Adicionou-se 625 μL da solução estoque de γ -orizanol (320 $\mu\text{g mL}^{-1}$) que representam 200 μg de γ -orizanol, diluindo para 2,0 mL representariam um acréscimo de 100 μg de γ -orizanol na solução injetada, totalizando uma concentração teórica de 214 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de γ -orizanol.

A amostra de óleo de farinha de arroz (65 mg) apresentou uma concentração da solução injetada de 171,93 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de γ -orizanol. Para os testes de exatidão pesou-se 40 mg, que representam uma concentração de 105,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de γ -orizanol. Adicionaram-se os 625 μL da solução estoque de γ -orizanol (320 $\mu\text{g mL}^{-1}$) que representariam 100 μg de γ -orizanol na solução injetada, totalizando uma concentração teórica de 205,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de γ -orizanol.

Os resultados encontrados encontram-se na Tabela XIV.

Tabela XIV: Resultados da exatidão.

Amostras	Ct ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cr ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recuperação (%)
Farelo	214,0	193,86	90,59
Farinha	205,8	187,97	91,34

Ct = Concentração teórica da solução injetada em γ -orizanol

Cr = Concentração real da solução injetada em γ -orizanol

Observa-se uma recuperação média de 90,965 %, demonstrando que o método é preciso e apresenta boa recuperação.

4.4.1.1.4 Robustez

Os resultados obtidos para a robustez do método na determinação do γ -orizanol, através de pequenas alterações nas condições cromatográficas podem ser observados na Tabela XIII. O cálculo do DPR foi obtido através da comparação entre o resultado da modificação e o obtido na precisão intermediária para o farelo ($247,14 \mu\text{g mL}^{-1}$) e farinha ($171,93 \mu\text{g mL}^{-1}$) de óleo de arroz integral parboilizado.

Tabela XV: Resultados obtidos para os testes de robustez do método de determinação da fração de γ -orizanol em óleos de arroz por LC-DAD.

Modificações	Farelo		Farinha	
	Ci ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)	Ci ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPR (%)
36 °C	249,90	0,56	171,69	0,07
44 °C	265,62	3,60	184,46	3,51
0,9 mL min ⁻¹	286,24	7,33	199,81	7,50
1,1 mL min ⁻¹	241,38	1,18	168,43	1,03
0,075 % ácido	260,46	2,62	198,23	7,10
0,125 % ácido	262,13	2,94	198,72	7,23

Ci = Concentração da solução injetada em γ -orizanol

Observa-se que as modificações de temperatura da coluna (36 °C e 44 °C) podem ser realizadas sem causar alteração considerável no resultado, pois apresentam desvio padrão relativo aceitável (inferior a 5). Apesar do fluxo de 1,1 mL min⁻¹ apresentar desvio padrão relativo cabível, realizar alterações nesse parâmetro e na acidez da fase móvel, não deverão ser realizadas, pois provocam modificações consideráveis nos resultados.

4.4.2 Considerações sobre as técnicas para análise do γ -orizanol

As quatro técnicas utilizadas no presente trabalho mostraram-se eficazes para identificação do γ -orizanol.

Porém, a técnica ESI-MS apesar de proporcionar a identificação mais rápida e direta dos constituintes do γ -orizanol, não é apropriada para a quantificação. Isto se deve ao tipo de analisador utilizado, *ion-trap*, o qual não permite o conhecimento da quantidade exata do analito a ser quantificado no interior do trap.

O método desenvolvido para o LC-ESI-MS/MS foi eficiente, pois apresentou o benefício de identificar os quatro constituintes do γ -orizanol através do cromatograma do íon extraído, não necessitando da total separação dos picos cromatográficos. Também, confirmação pelo espectro de massa de cada composto da fração do γ -orizanol.

Da mesma maneira, no acoplamento com *split* (LC-DAD-ESI-MS/MS) há a identificação pelo DAD e pelo MS, porém o tempo total de análise foi bastante elevado (75min).

Tendo em vista que o objetivo era, além de identificar, quantificar os constituintes da fração do γ -orizanol nas amostras, a análise via LC-DAD mostrou-se mais adequada. Pois, com ela, conseguiu-se uma ótima resolução cromatográfica dos picos referentes aos constituintes do γ -orizanol. O método de quantificação foi validado.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

5.1 CONCLUSÃO GERAL

Considerando a complexidade da matriz do arroz, os métodos cromatográficos de análise desenvolvidos no presente trabalho mostraram-se eficientes para a identificação dos principais constituintes do óleo de farelo e de farinha de arroz.

5.2 CONCLUSÕES ESPECÍFICAS

5.2.1 Extração do óleo de arroz

Das amostras estudadas, o farelo do arroz apresentou maiores teores de óleo do que as amostras de farinha dos grãos. O farelo de arroz integral parboilizado apresentou um rendimento de 13,77% de óleo, enquanto a farinha do grão do mesmo tipo de arroz verificou-se um rendimento de 2,46% de óleo.

5.2.2 Técnicas analíticas

A espectrometria de massa com ionização por eletronebulização ESI-MS é uma técnica que permite uma identificação rápida dos constituintes presentes na amostra. Esta técnica possibilitou a identificação dos íons referentes ao α - e γ -tocoferol, dos ácidos graxos livres (linoléico, oléico e linolênico) e dos constituintes do γ -orizanol, nas cinco amostras estudadas. Porém, é necessário um conhecimento prévio dos íons de interesse existentes na solução em estudo.

A cromatografia líquida, LC-DAD, mostrou-se eficiente, tanto para análise de identificação, quanto para quantificação dos constituintes do γ -orizanol. Ela também foi eficaz para separação cromatográfica dos ácidos graxos livres. Mas, para análise dos tocóis, não apresentou bons resultados, pois não propiciou boa

separação dos picos. Foi necessário um longo tempo de análise para investigação de todos analitos em uma única corrida cromatográfica.

O acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria através do *split* (LC-DAD-ESI-MS) possibilitou a identificação dos analitos em estudo, através do tempo de retenção dos padrões, do espectro do DAD e confirmação com os espectros de massa.

Da mesma maneira, o acoplamento LC-ESI-MS, foi eficiente para os três grupos de analitos. Com um tempo total de análise menor, e sem a necessidade de total separação dos picos cromatográficos, sendo esta, uma grande vantagem. Logo, entre todas as técnicas utilizadas nesse trabalho, foi a que apresentou melhores resultados e maior rapidez na análise.

O uso da derivatização com BF_3 possibilitou a análise cromatográfica dos ácidos presentes nas amostras de óleo de farelo e de farinha de arroz integral parboilizado via GC-FID.

5.2.3 Composição química das amostras

A vitamina E foi identificada com picos de pequena intensidade nas amostras de óleo de farelo de arroz, e intensidade inferior no óleo de farinha de grão de arroz.

Nas cinco amostras estudadas, foram identificados os ácidos graxos livres linoléico, oléico e linolênico. A quantificação, via GC-FID, dos ácidos graxos totais, apresentou maiores concentrações do ácido oléico e linoléico. Verificou-se também que a amostra de óleo de farelo de arroz integral parboilizado possui teores de ácido superiores aos da amostra de óleo de farinha do grão do arroz integral parboilizado.

Os constituintes da fração do γ -orizanol foram identificados e quantificados em todas as amostras. Das amostras de óleo de farelo, aquela proveniente do arroz integral foi a que apresentou maior concentração de γ -orizanol que o arroz integral parboilizado. Entre as amostras de óleo de farinha, a do grão do arroz integral parboilizado mostrou maior concentração de γ -orizanol, seguido do arroz parboilizado polido e do branco polido. Comparando-se o óleo do farelo com o da farinha, o primeiro apresentou maior concentração de γ -orizanol.

Conclusão

O método LC-DAD validado demonstrou linearidade, precisão, exatidão, robustez e sensibilidade adequada para determinação conjunta dos quatro principais constituintes do γ -orizanol nas amostras de óleo de farelo e de farinha de arroz integral parboilizado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ <http://www.ufrgs.br/alimentus/terradearroz/index.htm>; acessado em: 04.08.2010.
- ² http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoTocAntins/secagem_armaz_beneficiamento.htm; acessado em: 04.08.2010.
- ³ Fang, N., Yu, S., Badger, T.M.; *J. Agric. Food Chem.*, **2003**, 51, 3260.
- ⁴ Yu, S., Nehus, Z.T., Badger, T.M., Fang, N.; *J. Agric. Food Chem.*, **2007**, 55, 7308.
- ⁵ <http://www.cnpaf.embrapa.br/arroz/historia.htm> (*Embrapa*); acessado em: 04.07.2010.
- ⁶ <http://www.fao.org/docrep/012/ak341e/ak341e05.htm> (*FAO*); acessado em: 04.07.2010.
- ⁷ http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_01_06_08_41_56_boletim_graos_4o_lev_safra_2010_2011..pdf (*Conab*); acessado em 07.01.2011.
- ⁸ Rosell, M.C., Marco, C.; *Rice in Gluten-Free Cereal Products and Beverages*. s.l. : Elsevier Inc., **2008**, 81.
- ⁹ Monks, J.L.F. et al. *Simpósio Sul-Brasileiro de qualidade de arroz*, Camaquã, 3, **2008**.
- ¹⁰ Lerma-García, M.J., Herrero-Martínez, J.M., Simó-Alfonso, E.F., Mendonça, C.R.B., Ramis-Ramos, G.; *Food Chem.*, **2009**, 115, 389.
- ¹¹ Rogers, E. J., Rice, S.M., Nicolosi, R.J., Carpenter, D.R., McClelland, C.A., Romanczyk, L.J.; *American Oil Chemist's Society*, **1993**, 70, 301.
- ¹² Shen, Y., Jin, L., Xiao, P., Lu, Y., Bao, J.; *Journal of Cereal Science*. **2009**, 49, 106.
- ¹³ Lanina, S.A., Toledo, P., Sampels, S., Kamal-Eldin, A., Jastrebova, J.A.; *Journal of Chromatogr. A*, **2007**, 1157, 159.
- ¹⁴ Most, M.M., Tulley, R., Morales, S., Lefevre, M., *American Journal of Clinical Nutrition*, **2005**, 81, 64.
- ¹⁵ Zigoneanu, I.G., Williams, L., Xu, Z., Sabliov, M.C.; *Biores.Technol.*, **2008**, 99, 4910.
- ¹⁶ Rodrigo, N., Alegría, A., Barberá, R., Farré, R., *J. Chromatogr. A*, **2002**, 947, 97.

- ¹⁷ Evans, H.E., *Vitam. Hormones*, **1963**, 20, 379.
- ¹⁸ Imsanguan, P., Roaysubtawee, A., Borirak, R., Pongamphai, S., Douglas, S., Douglas, P.L.; *Food Science and Technol.*, **2008**, 41, 141.
- ¹⁹ Blackett, A., Hall, D. A., *Gerontology*, **1981**, 27, 133.
- ²⁰ Kramer-Stickland, K., Krol, E. S., Liebler, D. C., *Chem. Res. Toxicol.*, **1999**, 12, 187.
- ²¹ Nikiforova, N. V., Kirpatovsky, V. I., Darenkov, A. F., Chumakov, A. M., Sevrukov, E. A., Darenkov, S. P., *Nephron*, **1995**, 69, 449.
- ²² Abidi, S.L., Rennick, K.A.; *JAOCs*, **2003**, 80, 11, 1057.
- ²³ Revilla, E., Maria, C. S., Miramontes, E., Bautista, J., García-Martínez, A., Cremades, O., Cert, R., Parrado, J., *Food Research International*, **2009**, 42, 387.
- ²⁴ Chen, C.R., Wang, C.H., Wang, L.Y., Hong, Z.H., Chenb, S.H., Hoc, W.J., Chang, C.M.J.; *Separation and Purification Technology*, **2008**, 61, 322.
- ²⁵ Ghosh, M.; *Journal of the American Oil Chemists Society*, **2007**, 84.
- ²⁶ Pestana, V.R., Mendonça, C.R.B., Zambiazzi, R.C.; *B.CEPPA*, **2008**, 26, 29.
- ²⁷ http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm, (ANVISA). Acessado em: 02.12.2010
- ²⁸ Biaggioni, M.A.M., Barros, R.E.; *Cienc. Agrotec.*, **2006**, 30, 679.
- ²⁹ Xu, Z., Godber, J.S.; *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 2724.
- ³⁰ Nyaradzo, T.L., Chigorimbo-Murefu, Sergio, R., Stephanie G. B; *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2009**, 56, 277.
- ³¹ Stöggel, W., Huck, C., Wongyai, S., Scherz H., Bonn G.; *J. Sep. Sci.*, **2005**, 28, 1712.
- ³² Shen, Z., Palmer, M.V., Ting, S.S.T., Fairclough, R.J.; *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 4540.
- ³³ Rogers, E.J., Rice, S.M., Nicolosi, R.J., Carpenter, D.R., McClelland, C.A., Romanczyk, L.J.; *JAOCs*, **1993**, 70, 3, 301.
- ³⁴ Rupérez, F.J., Martín, D., Herrera, E., Barbas, C. *Journal of Chromatography A*, **2001**, 935, 45.
- ³⁵ Gliszczynska-Swiglo, A., Sikorska, E.; *J. Chromatogr. A*, **2004**, 1048, 195.
- ³⁶ Revilla, E., Maria, C. S., Miramontes, E., Bautista, J., García-Martínez, A., Cremades, O., Cert, R., Parrado, J., *Food Research International*, **2009**, 42, 387.

- ³⁷ Hao, Z., Parker, B., Knapp, M., Yu, L.L., *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1094, 83.
- ³⁸ Miller, A., Frenzel, T., Schmarr, H-G., Engel, K-H., *J. Chromatogr. A*, **2003**, 985, 403.
- ³⁹ Miller, A., Engel, K-H., *J. Agric. Food Chem.*, **2006**, 54, 8127.
- ⁴⁰ Zigoneanu, I.G., Williams, L., Xu, Z., Sabliov, C.M., *Biores. Technol.*, **2008**, 99, 4910.
- ⁴¹ Cunha, S.C., Amaral, J.S., Fernandes, J.O., Oliveira, M.B.P.P., *J. Agric. Food Chem*, **2006**, 54, 3351.
- ⁴² Aguilar-Garcia, C., Gavino, G., Baragaño-Mosqueda, M., Hevia, P., Gavino, V.C., *Food Chem.*, **2007**, 102, 1228.
- ⁴³ Chen, M.-H., Bergman, C.J., *J. Food Comp. Anal.*, **2005**, 18, 319.
- ⁴⁴ Bergman, C.J., Xu, Z., *Cereal Chemistry*, **2003**, 80, 4, 446.
- ⁴⁵ Pestana, V.R., Zambiasi, R.C., Mendonça, C.R.B., Bruscatto, M.H., Lerma-García, M.J., Ramis-Ramos, G., *J Am Oil Chem Soc.*, **2008**, 85, 1013.
- ⁴⁶ Collins, C.L., Braga, G.L., Bonato, P.S., *Fundamentos de cromatografia*. Campinas, SP: Unicamp, 2006.
- ⁴⁷ Lanças, F.M., *Cromatografia em fase gasosa*, São Carlos: Editora Acta, 1993.
- ⁴⁸ Chiaradia, M.C., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F.; *Quím. Nova*, **2008**, 31, 3, 632.
- ⁴⁹ HCT ultra, User Manual Volume 1 Theory – Bruker Daltonics®; Versão 1.2.1, 2006.
- ⁵⁰ Fenn, F.B., Whitehouse, C.M., Dreyer, R.N., Yamashita, M.; *Anal. Chem.*, **1985**, 57, 675.
- ⁵¹ ICH - Harmonised Tripartite Guideline, Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2(R1). In: International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use, 2005.
- ⁵² Lanças, F.M., *Cromatografia líquida moderna HPLC/CLAE*. Campinas-SP: Átomo, 2009.
- ⁵³ Lanças, M.F. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos-SP: Rima, 2004.
- ⁵⁴ Cassiano, N.M., Barreiro, J.C., Martins, L.R.R., Oliveira, R.V., Cass, Q.B., *Quím. Nova*, **2009**, 32, 1021.

- ⁵⁵ ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Guia para Validação de Métodos Analíticos*. Resolução - RE nº 475, de 19 de março de 2002.
- ⁵⁶ Leite, F., *Validação em análise química*. Campinas-SP: Átomo, 2008.
- ⁵⁷ Okada, I.A., Duran, M.C., Buzzo, M.L., Dovidauskas, S., Sakuma, A.M., Zenebon, O.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **2007**, 27(3), 492.
- ⁵⁸ Gonçalves, P.R. *Influência da temperatura da água na operação de encharcamento sobre a fração lipídica do arroz parboilizado*. Pelotas, FAEM (Tese Doutorado) 2007.
- ⁵⁹ Freitas, L.S., *Desenvolvimento de procedimentos de extração do óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos*. Porto Alegre, UFRGS (Tese Doutorado), 2007.
- ⁶⁰ Pestana, V.R., *J Food Sci Technol*, **2001**, 85, 1013.
- ⁶¹ Paucar-Menacho, L.M., Silva, L.H., Sant'ana, A.S., Gonçalves, L.A.G., *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2007**, 27, 45.
- ⁶² Guy, P.A., Fenaille, F., *Mass Spectrom. Reviews*, **2006**, 25, 290.
- ⁶³ Rentel, C., Strhschein, S., Albert, K., Bayer, E., *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4394.
- ⁶⁴ Sabliov, C.M., Fronczenk, C., Astete, C.E., Khachatryan, Khachatryan L., Leonardi, C., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2009**, 86, 895.
- ⁶⁵ Gentili, A., Caretti, F., D'Ascenzo, F., Marchese, S., Perret, D., Di Corcia, D., Rocca L.M., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2008**, 22, 2029,
- ⁶⁶ Manhães, L. R. T., *Caracterização da polpa de buriti (Mauritia Flexuosa, Mart.): um potente alimento funcional*. PPG-CTA/UFRRJ – 2007. (Dissertação de mestrado). Disponível em: <<http://www.ufrrj.br/posgrad/ppgcta/dissertacoes/D-236.pdf>>. Acessado em 04.01.2011.
- ⁶⁷ Parrado, J., Miramontes, M., Jover, M., Gutierrez, J.F., Terána, L.C., Bautista, J., *Food Chem.*, **2006**, 98, 4, 742.
- ⁶⁸ Norton, R.A.; *Lipids*, **1995**, 30, 269.