



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS *TRANS* POR CROMATOGRÁFIA
GASOSA EM ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS APÓS AQUECIMENTO NA
PRESENÇA DE ÍONS METÁLICOS**

Leticia de Alencar Pereira Rodrigues

Salvador, BA

2019

LETICIA DE ALENCAR PEREIRA RODRIGUES

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS *TRANS* POR CROMATOGRÁFIA
GASOSA EM ÓLEOS VEGETAIS COMESTÍVEIS APÓS AQUECIMENTO
NA PRESENÇA DE ÍONS METÁLICOS**

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química, Instituto de Química, Universidade Federal da
Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Química.

Salvador, BA

2019

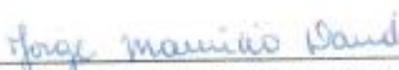
TERMO DE APROVAÇÃO

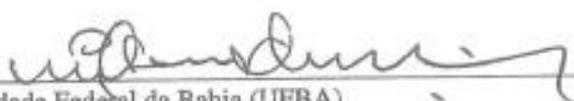
LETÍCIA DE ALENCAR PEREIRA RODRIGUES

“Determinação de ácidos graxos trans por cromatografia gasosa em óleos vegetais após aquecimento na presença de íon metálicos”

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Jorge Maurício David 
Doutorado em Química Orgânica, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Wilson Araujo Lopes 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Adriana Costa Ferreira 
Doutorado em Química Analítica, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Hilda Costa dos Santos Talma 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Salvador, 14 de fevereiro de 2019.

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA),
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

de Alencar Pereira Rodrigues, Leticia
Determinação de ácidos graxos trans por
cromatografia gasosa em óleos vegetais comestíveis após
aquecimento na presença de íons metálicos / Leticia de
Alencar Pereira Rodrigues. -- Salvador, 2019.
118 f. : il

Orientador: Leonardo Sena Gomes Teixeira.
Tese (Doutorado - Pós-Graduação em Química) --
Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química,
2019.

1. Óleos vegetais. 2. Ácidos graxos trans. 3. Íons
metálicos. 4. GC-FID. I. Sena Gomes Teixeira,
Leonardo. II. Título.

Dedico este trabalho

Aos meus pais, pelo carinho e dedicação. Ao meu marido Alessandro e filho Guilherme pelo amor sem limite e paciência.

AGRADECIMENTOS

- A Deus, que me deu força para não desistir.
- Ao meu marido, meus pais e filho, pela força e apoio a todo momento.
- Ao Prof. Dr. Leonardo Teixeira, pela paciência, carinho, apoio e grande conhecimento. Não sei o que seria de mim sem o seu acolhimento. Meu muito obrigado.
- A todos do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Química (LPQ), em especial ao Prof. Dr. Pedro Afonso e Prof. Dr. Wilson Lopes.
- A Profa Dra. Rosângela Novaes pelo apoio e pela preciosa microseringa para as análises cromatográficas.
- A Jicarla Rebouças, Cristiane Brito, Adriana Ferreira e Hilda Costa, antigas colegas do SENAI CETIND, que de alguma forma me apoiaram em diferentes etapas desta pesquisa.
- A Profa. Dra. LÍlian Lefol pelo precioso apoio na liberação do LIPAQ do SENAI CIMATEC, onde consegui finalizar meu trabalho.
- Ao Prof. MSc. Alexandre Machado: você é sensacional. Muito obrigada pelos ensinamentos.
- Ao Prof. Dr. Jeancarlo Pereira dos Anjos pelo apoio, ajuda, transmissão de conhecimento e amizade.
- A Milena Brotas e José Gabriel Amaral pelo apoio e ajuda.
- A Marina Rodrigues pela amizade e pelo apoio constante.
- Ao Prof. Dr. Fabiano Medeiros pelas explicações.
- A Eliete Alves do LIPAQ - SENAI CIMATEC e Tais do SENAI CETIND pelo apoio.
- A Caroline Passos e Cleide Guedes pelo incentivo e amizade.
- Ao programa de Pós-graduação em Química da UFBA, pela oportunidade de realizar esse trabalho.
- Ao SENAI CIMATEC, de onde faço parte com orgulho.

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”
Albert Einstein

SUMÁRIO

| | |
|--|------|
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| LISTA DE TABELAS | xi |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | xiii |
| RESUMO | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 2. OBJETIVOS..... | 18 |
| 2.1 Objetivos gerais | 18 |
| 2.2 Objetivos específicos | 18 |
| 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 19 |
| 3.1 Ácidos graxos | 19 |
| 3.1.1 Definição..... | 19 |
| 3.2 Oxidação lipídica..... | 25 |
| 3.3 Ácidos graxos <i>trans</i> | 28 |
| 3.3.3 Ácidos graxos <i>trans</i> e suas implicações na saúde..... | 40 |
| 3.3.4 Legislação sobre rotulagem dos ácidos graxos <i>trans</i> | 42 |
| 3.3.5 Ocorrência dos ácidos graxos <i>trans</i> nos alimentos..... | 44 |
| 3.4 Quantificação dos ácidos graxos <i>trans</i> | 47 |
| 4. PARTE EXPERIMENTAL..... | 61 |
| 4.1 Materiais | 61 |
| 4.1.1 Amostras | 61 |
| 4.2 Procedimento de otimização da transesterificação (preparo dos ésteres metílicos)..... | 65 |
| 4.3 Método cromatográfico e quantificação dos ácidos graxos..... | 66 |
| 4.4 Análise do teor de metais nos óleos de soja e canola | 67 |
| 4.4.1 Decomposição das amostras para análise de Fe e Cu..... | 67 |
| 4.4.2 Determinação elementar de Fe e Cu | 68 |
| 4.5 Figuras de mérito consideradas na validação do método analítico | 68 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 4.6 | Aquecimento dos óleos de soja e canola | 72 |
| 4.6.1 | Aquecimento sem metais | 72 |
| 4.6.2 | Aquecimento com adição de Cu^{2+} e Fe^{3+} | 73 |
| 4.7 | Análises Estatísticas | 74 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 75 |
| 5.1 | Otimização do preparo dos ésteres metílicos por transesterificação | 75 |
| 5.2 | Validação do método analítico | 79 |
| 5.3 | Teor de metais e aquecimento do óleo | 86 |
| 6. | CONCLUSÕES..... | 102 |
| 7. | PERSPECTIVAS FUTURAS | 103 |
| 8. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 104 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Representação geral da reação de esterificação e hidrólise para formação de triacilglicerol..... | 20 |
| Figura 2. Ácidos graxos naturais dos tipos ômega 3 e ômega 6 (Timberlake, 2012)..... | 22 |
| Figura 3. Vias de reação para isomerização iniciadas por radicais de ácidos graxos (TZENG e HU, 2014). | 29 |
| Figura 4. Formação de ácidos C18:1-11t e C18:1-10t em ruminantes a partir de ácidos linoleico, alfa-linolênico e gama-linolênico (adaptado de KHANAL e DHIMAN, 2004). | 32 |
| Figura 5. Informação nutricional obrigatória para alimentos com destaque para gordura <i>trans</i> (Ministério da Saúde, 2018). | 44 |
| Figura 6. Etapas reacionais envolvidas na transesterificação de triacilglicerídeos (MENEGHETTI, MENEGHETTI e BRITO, 2013). | 50 |
| Figura 7. Ciclo catalítico do mecanismo da transesterificação com CH ₃ OH como solvente e catálise básica por hidróxido (Cunha <i>et al.</i> , 2018). | 51 |
| Figura 8. Mecanismo de transesterificação de triglicerídeos em meio ácido (MENEGHETTI, MENEGHETTI e BRITO, 2013). | 52 |
| Figura 9. Sistema de aquecimento do óleo. | 73 |
| Figura 10. Efeito da concentração do KOH sob as condições experimentais: tempo de agitação de 30 s; volume do solvente n-hexano 2 mL; volume da solução de NaCl saturado 3 mL..... | 76 |
| Figura 11. Efeito do tempo de agitação sob as condições experimentais: 0,2 mL de KOH 2 mol L ⁻¹ ; volume do solvente n-hexano 2 mL; volume da solução de NaCl saturado 3 mL. | 77 |
| Figura 12. Efeito do volume de NaCl saturado sob as condições experimentais: tempo de agitação de 40 s, 0,2 mL de KOH 2 mol L ⁻¹ ; volume do solvente n-hexano 2 mL..... | 77 |
| Figura 13. Efeito do tipo de solvente sob as condições experimentais: tempo de agitação de 40 s, 0,2 mL de KOH 2 mol L ⁻¹ ; volume da solução de NaCl saturado 3 mL. | 78 |
| Figura 14. Mix de isômeros geométricos do linolenato de metila (C18:3, 47792 – SIGMA) a 100 mg L ⁻¹ . Coluna capilar SLB-IL111 (100 m x 0,25 mm x 0,2 µm). Volume injetado 1 µL. | 80 |
| Figura 15. Mix de isômeros geométricos do linoleato de metila (C18:2, 47791 – SIGMA) a 100 mg L ⁻¹ . Coluna capilar SLB-IL111 (100 m x 0,25 mm x 0,2 µm). Volume injetado 1 µL. | 81 |

| | |
|--|-----|
| Figura 16. Mix de isômeros geométricos do <i>trans</i> -elaidato de metila (C18:1, 9t 46903 – SIGMA) e oleato de metila (C18:1, 9c 18918 – SUPELCO) a 100 mg L ⁻¹ . Coluna capilar SLB-IL111 (100 m x 0,25 mm x 0,2 µm). Volume injetado 1 µL..... | 81 |
| Figura 17. Cromatograma (GC-FID) de aquecimento com isoterma de 168 e 180°C, de amostras derivadas de óleo de soja com expansão nos isômeros de ácido linoleico..... | 87 |
| Figura 18. Concentração de C18:1, 9t em óleo de soja durante 24 h de aquecimento, nas seguintes condições: sem adição de metal, com adição de Cloreto de ferro III (50 µg.kg ⁻¹) (Fe 50) e Cloreto de cobre II (50 µg.kg ⁻¹) (Cu 50). | 91 |
| Figura 19. Concentração de C18:1, 9t em óleo de canola durante 24 h de aquecimento: sem adição de metal, com adição de Cloreto de ferro III (50 µg.kg ⁻¹) (Fe 50) e Cloreto de cobre II (50 µg.kg ⁻¹) (Cu 50)..... | 92 |
| Figura 20. Concentração de C18:2, 9c 12t e C18:2, 9t 12c em óleo de soja durante 24 h de aquecimento: sem adição de metal, com adição de Cloreto de ferro III (50 µg.kg ⁻¹) (Fe 50) e Cloreto de cobre II (50 µg.kg ⁻¹) (Cu 50). | 93 |
| Figura 21. Concentração de C18:2, 9c 12t e C18:2, 9t 12c em óleo de canola durante 24 h de aquecimento: sem adição de metal, com adição de Cloreto de ferro III (50 µg.kg ⁻¹) (Fe 50) e Cloreto de cobre II (50 µg.kg ⁻¹) (Cu 50). | 94 |
| Figura 22. Concentração de C18:3 <i>trans</i> em óleo de soja durante 24 h de aquecimento: sem adição de metal, com adição de Cloreto de ferro III (50 µg.kg ⁻¹) (Fe 50) e Cloreto de cobre II (50 µg.kg ⁻¹) (Cu 50)..... | 95 |
| Figura 23. Concentração de C18:3 <i>trans</i> em óleo de soja durante 24 h de aquecimento: sem adição de metal, com adição de Cloreto de ferro III (50 µg.kg ⁻¹) (Fe 50) e Cloreto de cobre II (50 µg.kg ⁻¹) (Cu 50)..... | 96 |
| Figura 24. Cromatogramas (GC-FID) de amostras derivadas de óleo de soja aquecida por 16 h adicionada de metal. (1) Cloreto de ferro 50 µg kg ⁻¹ de óleo (2) Cloreto de cobre 50 µg kg ⁻¹ de óleo. | 101 |
| Figura 25. Cromatogramas (GC-FID) de amostras derivadas de amostra de óleo de canola aquecida por 16 h adicionada de metal. (1) Cloreto de cobre 50 µg kg ⁻¹ de óleo (2) Cloreto de ferro 50 µg kg ⁻¹ de óleo. | 101 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Nomenclaturas, estruturas e pontos de fusão dos ácidos graxos comuns (TIMBERLAKE, 2012)..... | 23 |
| Tabela 2. Teor médio dos ácidos graxos em óleos vegetais (%)...... | 25 |
| Tabela 3. Estrutura, nomenclatura e temperatura de fusão dos ácidos: elaídico, oléico e esteárico (adaptado de BHARDWAJ <i>et al.</i> , 2011)..... | 30 |
| Tabela 4. Estudos sobre o efeito do aquecimento de óleos e formação de ácidos graxos <i>trans</i> | 37 |
| Tabela 5. Propriedades físicas e aspectos de toxicidade de alguns solventes orgânicos empregados na extração de lipídios dos alimentos..... | 53 |
| Tabela 6. Métodos oficiais para análise de ácidos graxos <i>trans</i> por GC-FID..... | 57 |
| Tabela 7. Métodos Cromatográficos para determinação de ácidos graxos <i>trans</i> | 58 |
| Tabela 8. Padrão com mistura de 14 EMAG variando de 4:0 a 24:0, com percentuais em massa aproximadas de cada isômero. | 62 |
| Tabela 9. Padrão com mistura de 14 EMAG de ésteres metílicos de isômeros <i>cis(c)/trans(t)</i> do ácido linoleico (C18:2), com percentuais em massa aproximadas de cada isômero. | 62 |
| Tabela 10. Padrão com mistura de 14 EMAG isômeros <i>cis (c)/trans (t)</i> do ácido linolênico (C18:3) (Sigma-Aldrich 47792), com percentuais em massa aproximadas de cada isômero. . | 63 |
| Tabela 11. Fatores de conversão de éster metílico de ácido graxo para ácido graxo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). | 66 |
| Tabela 12. Rampa de aquecimento para decomposição de amostras de óleos de soja e canola assistida por radiação de micro-ondas, em forno com cavidade (PINELLI, 2017)..... | 68 |
| Tabela 13. Condições de operação para análise de ferro e cobre por FAAS (BARAN e YASAR, 2010). | 68 |
| Tabela 14. Valores de limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para o método. | 82 |
| Tabela 15. Equações das curvas analíticas, coeficientes de determinação (R^2) e faixas de trabalho para cada composto analisado, para o método de determinação empregado. | 83 |
| Tabela 16. Resultados da recuperação e desvios padrão relativos para 3 níveis de concentração realizada intra-dia para o analito ácido linoleico..... | 85 |
| Tabela 17. Resultados da recuperação (%) e desvios padrão relativos (% RSD) para 3 níveis de concentração realizada inter-dia para o analito ácido linoleico. | 85 |

| | |
|--|----|
| Tabela 18. Resultados da recuperação (%) e desvios padrão relativos (% RSD) para 3 níveis de fortificação em óleo de soja realizada para o analito ácido linoleico. | 86 |
| Tabela 19. Composição de ácidos graxos 18:1, C18:2 e 18:3 <i>cis/trans</i> do óleo de soja e canola antes | 88 |
| Tabela 20. Determinação de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) nas amostras de óleo de soja e canola antes do aquecimento (n=3)..... | 90 |
| Tabela 21. Composição de ácidos graxos <i>trans</i> em g/100 g durante aquecimento de óleo de soja a 180°C, com e sem a adição de metais. | 97 |
| Tabela 22. Composição de ácidos graxos <i>trans</i> em g/100 g durante aquecimento de óleo de canola a 180°C, com e sem a adição de metais. | 99 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------|---|
| AG | Ácido graxo |
| AGI | Ácido graxo insaturado |
| AGT | Ácido graxo <i>trans</i> |
| AGTM | Ácidos graxos <i>trans</i> monoinsaturados |
| ANOVA | Análise de variância |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AOAC | Associação dos químicos analíticos oficiais, do inglês <i>Association of Official Analytical Chemists</i> |
| AOCS | Sociedade americana dos químicos de óleo, do inglês <i>American Oil Chemists' Society</i> |
| CG | Cromatografia gasosa |
| CGAR | Cromatografia gasosa de alta resolução |
| CG-EM | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas |
| GC-FID | Cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, do inglês <i>Gas chromatography with flame ionization detector</i> |
| CLA | Ácido linoleico conjugado, do inglês <i>Conjugated linoleic acid</i> |
| EAG | Ésteres de ácidos graxos |
| EMAG | Ésteres metílicos de ácidos graxos |
| FAAS | Espectrômetro de absorção atômica em chama, do inglês <i>Flame Atomic Absorption Spectrometry</i> |
| FAME | Ésteres metílicos de ácidos graxos, do inglês <i>Fatty acid methyl ester</i> |
| FDA | Administração de alimentos e medicamentos, do inglês <i>Food and Drug Administration</i> |
| FID | Detector de ionização de chama, do inglês <i>Flame ionization detector</i> |
| HDL | lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>High Density Lipoprotein</i> |
| HPLC | Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High performance liquid chromatography</i> |
| LDL | Lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>Low Density Lipoprotein</i> |
| OMS | Organização mundial de saúde |
| RDC | Resolução da Diretoria Colegiada |

RESUMO

A fritura é um dos métodos de cozimento mais utilizados em todo o mundo e tem sido reportado como um processo que aumenta a produção de ácidos graxos *trans* (AGT). A formação de AGT ocorre pelo processo de isomerização *cis-trans* da gordura insaturada, podendo ser favorecida na presença de íons metálicos e em temperaturas acima de 180 °C. Este trabalho teve como objetivo avaliar a formação de ácidos graxos *trans* em amostras de óleos de soja e canola em temperatura típica de aquecimento (180 ± 5)°C na presença de íons de cobre e ferro ao longo de 24 h de aquecimento. Para quantificar os ácidos graxos *trans* no óleo antes e após o aquecimento, a transesterificação alcalina foi otimizada, seguida da validação do método empregando a análise por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID). A otimização da transesterificação foi realizada de maneira univariada e, nas condições recomendadas, empregou-se os fatores estudados nas seguintes condições: concentração da solução metanólica de KOH a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, tempo de agitação de 40 s, volume da solução saturada de NaCl de 3,0 mL e solvente n-heptano. Na validação do método cromatográfico foram avaliados os limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão e exatidão. Os teores de Cu e Fe foram quantificados nos óleos antes do aquecimento, sendo encontrados valores compatíveis com a literatura, revelando a contaminação de origem. Para o óleo de soja observou-se que, nos experimentos de aquecimento sem adição de metais houve a formação em g/100g de C18:1, 9t; C18:2, 9c 12t; C18:2, 9t 12c e C18:3 *trans* em 24 h de, respectivamente: $0,10 \pm 0,02$; $0,38 \pm 0,02$; $0,36 \pm 0,02$ e $0,92 \pm 0,01$. Para o óleo de canola a formação em g/100g de C18:1, 9t; C18:2, 9c 12t; C18:2, 9t 12c e C18:3 *trans* foi de, respectivamente: $0,31 \pm 0,04$; $0,23 \pm 0,02$; $0,24 \pm 0,02$ e $1,25 \pm 0,02$. No estudo da influência dos metais Cu e Fe na concentração de 10, 30 e $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de óleo, de um modo geral, a adição dos íons metálicos às amostras provocou um aumento nas concentrações dos ácidos graxos *trans*. Em termos de efeito catalítico, o ferro foi o metal que mostrou-se mais eficiente em promover um aumento nas concentrações em relação ao cobre, sendo que, em geral, esses efeitos eram superiores na concentração de $50 \mu\text{g kg}^{-1}$. Os resultados do presente trabalho são de grande importância para a sociedade em geral pois aborda a problemática relacionada à formação de AGT em óleos quando submetidos ao aquecimento. Os metais cobre e ferro podem estar presentes em utensílios e recipientes e geram uma maior formação de AGT durante o aquecimento.

Palavras-chave: óleos vegetais, aquecimento, ácidos graxos *trans*, íons metálicos.

ABSTRACT

Frying is one of the most widely used cooking methods in the world and has been reported as a process that increases the production of trans fatty acids (TFA). The formation of TFA occurs through the *cis-trans* isomerization process of the unsaturated fat, which can be favored in the presence of metallic ions and at temperatures above 180°C. The objective of this work was to evaluate the formation of *trans* fatty acids in samples of soybean and canola oils at typical heating temperature (180 ± 5)°C in the presence of copper and iron ions over 24 h of heating. To quantify the *trans* fatty acids in the oil before and after heating, the alkaline transesterification was optimized, followed by the validation of the method using gas chromatographic analysis with flame ionization detector (GC-FID). The optimization of the transesterification was performed in a univariate manner and, under the recommended conditions, the following factors were used: concentration of KOH methanolic solution at 2,0 mol L⁻¹, stirring time of 40 s, volume of the saturated solution of 3,0 mL NaCl and n-heptane solvent. In the validation of the chromatographic method the limits of detection and quantification, linearity, precision and accuracy were evaluated. The Cu and Fe contents were quantified in the oils before heating, and values compatible with the literature were found, revealing the contamination of origin. For the soybean oil it was observed that in the heating experiments without addition of metals there was formation in g/100g of C18:1, 9t; C18:2, 9c 12t; C18:2, 9t 12c and C18:3 *trans* in 24 h of, respectively: $0,10 \pm 0,02$; $0,38 \pm 0,02$; $0,36 \pm 0,02$ and $0,92 \pm 0,01$. For canola oil the formation in g/100g of C18:1, 9t; C18:2, 9c 12t; C18:2, 9t 12c and C18:3 *trans* was, respectively: $0,31 \pm 0,04$; $0,23 \pm 0,02$; $0,24 \pm 0,02$ and $1,25 \pm 0,02$. In the study of the influence of the metals Cu and Fe in the concentration of 10, 30 and 50 µg kg⁻¹ of oil, in general, the addition of the metal ions in the samples caused an increase in the concentrations of the *trans* fatty acids. In terms of the catalytic effect, iron was the metal that proved to be more efficient in promoting an increase in the concentrations in relation to copper, and, in general, these effects were higher in the concentration of 50 µg kg⁻¹. The results of the present work are of great importance for the society in general as it addresses the problems related to the formation of TFA in oils when submitted to heating. Copper and iron metals may be present in utensils and containers and generate increased TFA formation during heating.

Keywords: vegetable oils, heating, *trans* fatty acids, metal ions.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos e gorduras comestíveis são nutrientes essenciais da dieta humana, sendo constituintes do metabolismo primário, apresentando papel vital mediante o fornecimento de ácidos graxos essenciais, energia, vitaminas lipossolúveis e outros compostos benéficos à saúde (ERATTE *et al.*, 2017). Atuam também como precursores na síntese de hormônios como esteroides e prostaglandinas (LI *et al.*, 2016). Os ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados, presentes em óleos vegetais, estão associados à diminuição dos riscos de doença coronariana e, portanto, são geralmente considerados saudáveis (BENDSEN *et al.*, 2011). Em todo o mundo, o consumo de óleo comestível vem aumentando constantemente. Vários fatores estão associados com o aumento do consumo de óleos e gorduras, como o aumento da renda per capita, urbanização e mudança para dietas obesogênicas observadas em todo o mundo (KOJIMA, PARCELL e CAIN, 2016).

Os óleos vegetais de soja, colza, palma e milho representam uma fração importante da dieta humana, além de ser fonte de energia (9 kcal/g) e de ácidos graxos essenciais como linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3) (ENDO, 2018). Em adição às qualidades nutricionais, os óleos e gorduras proveem consistência e características de fusão específicas aos produtos que os contêm, atuam como meio de transferência de calor durante o processo de fritura e como carreadores de vitaminas lipossolúveis e aroma (BHARDWAJ *et al.*, 2011; ENDO, 2018; YOUNG, 1985). Além disso, os lipídios afetam a estrutura, estabilidade, sabor, aroma, qualidade de estocagem, características sensoriais e visuais dos alimentos (ENDO, 2018; O'BRIEN, 1998).

A fritura é um dos métodos de cozimento mais utilizados em todo o mundo, especialmente em se tratando de óleos comestíveis, e tem sido indicado como um processo que aumenta a produção de ácidos graxos *trans* (AGT), sendo dependente das condições aplicadas, incluindo a temperatura, tempo, tipo de óleo, composição de ácidos graxos e presença de antioxidantes. A notável popularidade da fritura é devido às suas características favoráveis, incluindo cozimento rápido, praticidade, baixo custo de investimento, sabor e cor atraentes do produto final (BANSAL *et al.*, 2009; ZIAIIFAR *et al.*, 2010). Durante o processo de fritura, algumas reações químicas ocorrem no óleo, incluindo isomerização, hidrólise, oxidação, ciclização e polimerização, e os produtos resultantes podem modificar as condições físicas e características químicas de óleos comestíveis, tais como a viscosidade, composição de ácidos graxos e substâncias polares totais (GERTZ, 2000; GOYAL e SUNDARARAJ, 2009).

A presença de ácidos graxos na alimentação humana, especialmente dos ácidos graxos *trans*, e seus efeitos na saúde têm se destacado como temas de interesse de novos estudos e pesquisas (DJOUSSE *et al.*, 2014; FLOCK e KRIS-ETHERTON, 2013; GANGULY *et al.*, 2016; HUA *et al.*, 2017). Os AGT são encontrados naturalmente em pequenas quantidades em alimentos de origem animal, como leite e carne bovina, devido à biohidrogenação e também em gorduras vegetais hidrogenadas industrialmente, a partir da reação de hidrogenação catalítica (GALVÍN *et al.*, 2016).

O tipo de gordura consumida e o seu estado de oxidação influenciam o desenvolvimento de doenças crônicas vasculares. O uso generalizado de óleos vegetais parcialmente hidrogenados tem levantado questões sobre os efeitos na saúde decorrentes do consumo de AGT. Existem estudos que citam o consumo de AGT como fatores de risco para doenças crônicas como, doenças cardíacas, diabetes mellitus e síndrome metabólica (ESTADELLA *et al.*, 2013), devido ao acúmulo destes componentes em diversos órgãos como coração e fígado, além de tecidos (GANGULY *et al.*, 2016).

Considerando a produção dos AGT e as questões relacionadas à saúde, são necessários estudos comparativos de diferentes métodos de frituras para avaliar as influências sobre os aspectos nutricionais e sensoriais dos alimentos, incluindo a formação dos ácidos graxos *trans* (NEFF *et al.*, 2014).

A literatura cita diversos estudos sobre a formação dos ácidos graxos *trans* durante a oxidação térmica de óleo (BALTACIOĞLU, 2017; BHARDWAJ *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2014; CUI *et al.*, 2017; GOTOH *et al.*, 2018; HOU, JIANG e ZHANG, 2012; KALA, JOSHI e GURUDUTT, 2012; MENAA *et al.*, 2013), todavia, não há estudos que investigam a presença de metais em óleos de soja e canola sob aquecimento por diferentes intervalos de tempo em temperatura típica utilizada na fritura de alimentos. Assim sendo, este estudo visa, dentre outros fatores, avaliar o impacto da formação dos AGT do ponto de vista da presença dos metais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Determinar o teor de ácidos graxos *trans* em amostras de óleos de soja e canola em temperatura típica de aquecimento com e sem adição de íons metálicos.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1** Otimizar a transesterificação alcalina com base no Método 055/IV do Instituto Adolf Lutz - Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos para determinação de ácidos graxos para posterior determinação por cromatografia em fase gasosa;
- 2.2.2** Implementar o método cromatográfico em fase gasosa com detector de ionização de chama (DIC) para determinação de ácidos graxos;
- 2.2.3** Quantificar os ácidos graxos *trans* nas amostras de óleo de soja e canola à temperatura ambiente (25°C) e após o aquecimento por intervalos de tempo variáveis, na temperatura empregada em processos de fritura (180°C ± 5°C);
- 2.2.4** Quantificar os ácidos graxos *trans* nas amostras de óleo de soja e canola após o aquecimento por intervalos de tempo variáveis, na temperatura empregada em processos de fritura (180°C ± 5°C) com adição dos íons metálicos Cu²⁺ e Fe³⁺ em três diferentes concentrações;
- 2.2.5** Avaliar a influência dos íons metálicos Cu²⁺ e Fe³⁺ na formação dos ácidos graxos *trans* nas amostras de óleo de soja e canola em temperatura típica de fritura.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Ácidos graxos

3.1.1 Definição

São denominados ácidos graxos (AG) todos os ácidos monocarboxílicos alifáticos originários da hidrólise de óleos e gorduras (FAHY et al., 2009). Em geral, possuem uma cadeia longa constituída de átomos de carbono e hidrogênio (hidrocarboneto) e um grupo terminal, característico de ácidos orgânicos, denominado de grupo carboxila (RIBEIRO e SERAVALI, 2004). A grande maioria dos ácidos graxos encontrados em animais e plantas terrestres tem número par de carbonos na cadeia, e quando insaturados, na maioria das vezes, tem a configuração *cis*. Todos esses ácidos existem na natureza principalmente na forma dos ésteres de glicerol ou de álcoois alifáticos de cadeia longa, embora possam ocorrer em quantidades menores na forma de ésteres de vitamina A, de esteróis ou de outros compostos cíclicos e ácidos livres (BOBBIO e BOBBIO, 2003). Podem também estar presentes, sob a forma de ésteres, nos esfingolipídios, cerebrosídeos, lipoproteínas, colesterol e fitoesteróides (VIANNI e BRAZ-FILHO, 1996). Desempenham várias funções biológicas essenciais como, por exemplo, produção de energia, estrutura de membranas, imunidade e inflamação (RUSTAN e DREVON, 2005).

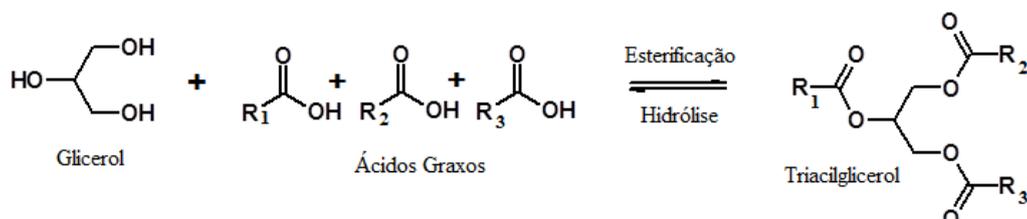
Um das principais fontes de ácidos graxos são os lipídios, pois são formados por ésteres de ácidos e álcoois graxos, ou seja, os glicerídeos. Vale salientar ainda que, os lipídios são encontrados em: óleos comestíveis; gorduras; carne; produtos lácteos; peixe e nozes (DORNI *et al.*, 2018).

Os ácidos graxos livres ocorrem em quantidades pequenas nos óleos e gorduras, mas participam da construção das moléculas de glicerídeos e de certos não glicerídeos, representando até 96% da massa total dessas moléculas (RIBEIRO e SERAVALI, 2004).

Gorduras e óleos comestíveis são diferenciados pela estrutura do glicerídeo (comprimento da cadeia, posição da ligação dupla e orientação *cis/trans*), bem como, pela proporção relativa de ácidos graxos saturados e ácidos graxos insaturados (número e posição das ligações duplas) (O'BRIEN, 2008). Quando três moléculas de ácidos graxos são combinadas com uma molécula de glicerol através do processo esterificação temos um triacilglicerol (TAG) (Figura 1). Por hidrólise total, uma molécula de TAG origina três

moléculas de ácidos graxos livres e uma de glicerol. No caso de hidrólise parcial, é formado ácido graxo livre, diacilglicerol ou monoacilglicerol (BOBBIO e BOBBIO, 2003).

Figura 1. Representação geral da reação de esterificação e hidrólise para formação de triacilglicerol.



Os ácidos graxos possuem uma cadeia carbônica que varia de 2 a 36 ou mais átomos de carbono além de um grupo metílico (CH₃) e um grupo carboxílico (HO-C=O) em extremos opostos (ASSIS, 1999; GÓMEZ, 2003). A cadeia carbônica dos ácidos graxos saturados está sob a forma estendida em virtude da sua conformação linear e flexível, sendo o estado de menor energia, o que permite o empacotamento e aumento de interação das moléculas pela maior proximidade (GÓMEZ, 2003; KUS, 2009).

Na natureza, os ácidos graxos estão normalmente presentes com números pares de átomos de carbono e de cadeia contendo de 10 a 22 átomos sem ramificações (GURR *et al.*, 2002). Podem ser classificados pelo tamanho da cadeia em termos de número de carbonos: curta (2–8); média (8–12) e longa (13–24) ou em ácidos graxos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e polinsaturados (AGPI), dependendo da presença ou ausência de ligações duplas (KOSTIK, MEMETI e BAUER, 2013). Os principais AGPI são: ácido linoleico (*cis*-9,12-ácido octadecadienóico, C18:2) e ácido α -linolênico (*cis*-9,12,15-octadecatrienóico, C18:3), que são chamados de ácidos graxos essenciais, já que eles não podem ser sintetizados pelo corpo humano e precisam ser fornecidos através da dieta. As principais fontes de lipídios da dieta humana são os óleos comestíveis, gorduras, carne, produtos lácteos, peixe e nozes (DORNI *et al.*, 2018).

As características físicas e químicas de ácidos graxos como temperatura de congelamento, solubilidade e propriedades nutricionais dependem do número de átomos de carbono, da posição e da configuração da ligação dupla (isômeros *cis-trans*), no caso de ácidos insaturados. Nos ácidos graxos saturados os átomos de carbonos estão ligados entre si por ligações simples (ligação δ) e simples e duplas (ligações π) nos ácidos graxos insaturados. Essas ligações dupla estão localizadas na cadeia de forma não conjugada (sistema 1,4-diênico) quase sempre separadas por grupo metilênico (α -CH₂) sendo que as duas unidades da

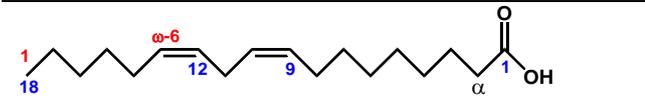
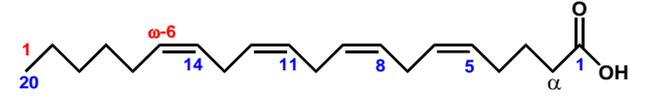
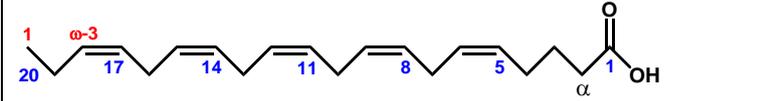
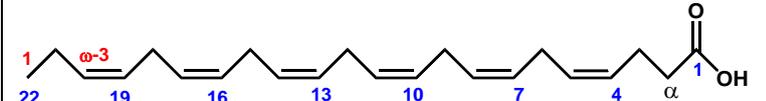
molécula estão localizadas em cada um dos lados da ligação dupla assumindo a configuração espacial do tipo *cis* = Z, sendo que essa configuração poderá ser convertida no isômero *trans* = E, quando da ocorrência de algumas reações químicas (VIANNI e BRAZ-FILHO, 1996).

A insaturação presente nos ácidos graxos restringe a rotação da cadeia hidrocarbonada e permite a isomeria sendo uma das formas de classificação em séries/famílias. Desta forma a nomenclatura IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry) tem como referência o radical carboxila e na outra extremidade da cadeia, o radical metila é à base da nomenclatura ômega (KUS, 2009).

No sistema de nomenclatura oficial, o número de carbonos é indicado por um prefixo grego sendo, como exemplo, dodeca- (12 carbonos), tetradeca- (14 carbonos), hexadeca- (16 carbonos), octadeca- (18 carbonos), eicosa- (20 carbonos) e docosa- (22 carbonos). Os ácidos graxos saturados são conhecidos pelo sufixo anóico, os mono insaturados por enóico, para os di-insaturados como dienóico e os tri-insaturados por trienóico (VIANNI e BRAZ-FILHO, 1996).

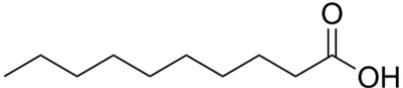
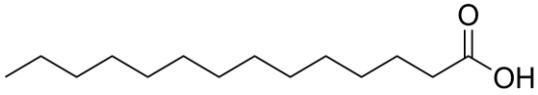
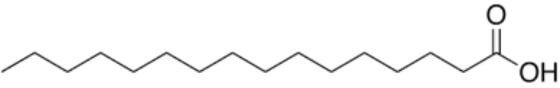
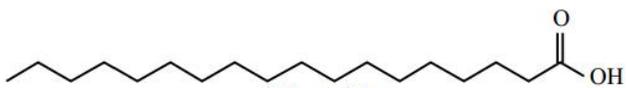
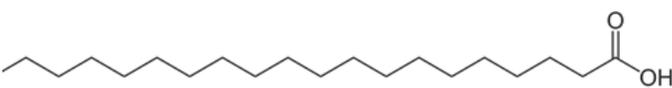
Os ácidos graxos também podem ser representados por letras gregas minúsculas, referindo à posição do carbono no ácido graxo. A letra α (alfa) se refere ao primeiro carbono adjacente ao grupo carboxila, β (beta) ao segundo carbono e ω (ômega) ao último carbono (MARTINS *et al.*, 2008; NOVELLO, FRANCESCHINI e QUINTILIANO, 2008). A posição da ligação dupla na cadeia carbônica é definida por um número arábico, atribuindo-se 1 ao carbono da carboxila ou o da carbonila da função éster correspondente ao ácido graxo. Essa estrutura química também pode ser indicada por uma notação simplificada na qual se escreve o número de átomos de carbono seguido de dois pontos e do número de ligações duplas presentes na molécula. Em seguida identifica-se a posição da primeira ligação dupla pela letra grega ômega, Figura 02 (VIANNI e BRAZ-FILHO, 1996).

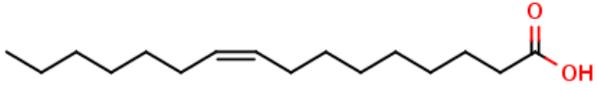
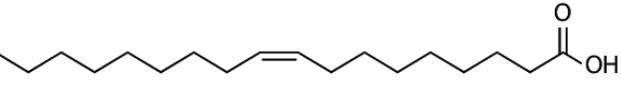
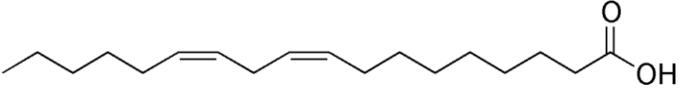
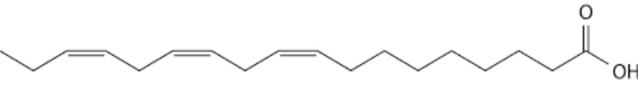
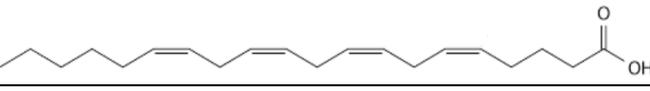
Figura 2. Ácidos graxos naturais dos tipos ômega 3 e ômega 6 (Timberlake, 2012).

| Ômega 6 (ω -6) | Ômega 3 (ω -3) |
|---|---|
|  <p>Ácido linoléico (LA, C18:2)</p> |  <p>Ácido α-linolênico (ALA, C18:3)</p> |
|  <p>Ácido araquidônico (AA, C20:4)</p> |  <p>Ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5)</p> |
| |  <p>Ácido decosa-hexaenóico (DHA, C22:6)</p> |

Os ácidos graxos saturados apresentam temperaturas de fusão relativamente elevadas e geralmente possuem elevada viscosidade e podendo ser sólidos à temperatura ambiente. Os ácidos graxos insaturados geralmente são líquidos à temperatura ambiente, conforme apresentado abaixo na Tabela 1. Quando existe mais de uma ligação dupla, estas são sempre separadas por pelo menos 3 carbonos e nunca são adjacentes nem conjugadas (BOBBIO e BOBBIO, 2003; DIXIT e DAS, 2012; TIMBERLAKE, 2012; WAHEED *et al.*, 2009).

Tabela 1. Nomenclaturas, estruturas e pontos de fusão dos ácidos graxos comuns (TIMBERLAKE, 2012).

| Nome Trivial do AG | Nome sistemático do AG | Delta (Δ) | Ômega (ω) | Estrutura | Temperatura de fusão ($^{\circ}\text{C}$) | Fonte |
|--------------------------------|------------------------|--------------------|--------------------|---|---|--------------------------------------|
| Ácidos graxos saturados | | | | | | |
| Cáprico | Decanóico | C10:0 | - |  | 32 | Pele de caprinos |
| Láurico | Dodecanóico | C12:0 | - |  | 43 | Côco |
| Mirístico | Tetradecanóico | C14:0 | - |  | 54 | Noz-moscada |
| Palmítico | Hexadecanóico | C16:0 | - |  | 62 | Palma |
| Esteárico | Octadecanóico | C18:0 | - |  | 69 | Gordura animal |
| Araquídico | Eicosanóico | C20:0 | - |  | 76 | Óleos de: amendoim, vegetais e peixe |

| Nome Trivial do AG | Nome sistemático do AG | Delta (Δ) | Ômega (ω) | Estrutura | Temperatura de fusão ($^{\circ}\text{C}$) | Fonte |
|---------------------------------------|---|----------------------------|--------------------|---|---|----------------------------------|
| Ácidos graxos monoinsaturados | | | | | | |
| Palmitoléico | <i>cis</i> -9-hexadecenóico | C16:1 Δ^9 | Ômega -7 |  | 0 | Manteiga e óleo de peixe |
| Oleico | <i>cis</i> -9-octadecenóico | C18:1 Δ^9 | Ômega -9 |  | 13 | Azeite de oliva e óleo de milho |
| Ácidos graxos poli-insaturados | | | | | | |
| Linoleico | <i>cis</i> -9,12-octadecadienóico | C18:2 $\Delta^{9,12}$ | Ômega -6 |  | -9 | óleo de soja, cártamo e girassol |
| Linolênico | <i>cis</i> -9,12,15-octadecatrienóico | C18:3 $\Delta^{9,12,15}$ | Ômega -3 |  | -17 | Milho |
| Araquidônico | <i>cis</i> -5,8,11,14-eicosatetraenoico | C20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$ | Ômega -6 |  | -50 | Prostaglandina |

Na Tabela 2, são mostrados os teores de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e polinsaturados de alguns óleos vegetais. Pode-se observar que o óleo de girassol é o que possui um maior teor de ácidos graxos polinsaturados e o óleo de oliva é o que possui o menor teor. Por outro lado, observa-se que o azeite de oliva tem o maior percentual de ácidos graxos monoinsaturados (REDA e CARNEIRO, 2007).

Tabela 2. Teor médio dos ácidos graxos em óleos vegetais (%).

| Óleo | Ácidos graxos (AG) | | | |
|----------|--------------------|-----------------|---------------|------------|
| | Saturados | Monoinsaturados | Polinsaturado | |
| | | | Linoleico | Linolênico |
| Canola | 6 | 58 | 26 | 10 |
| Girassol | 11 | 2 | 69 | - |
| Milho | 13 | 25 | 61 | 1 |
| Oliva | 14 | 77 | 8 | < 1 |
| Soja | 15 | 24 | 54 | 7 |

REDA e CARNEIRO, 2007

3.2 Oxidação lipídica

A oxidação dos constituintes lipídicos constitui reação importante que limita a vida-de-prateleira de vários alimentos. As alterações na qualidade dos alimentos podem ser percebidas pelas mudanças nas características sensoriais, no valor nutricional e pela produção de compostos potencialmente tóxicos (MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2009). A diferença na composição e no grau de insaturação dos ácidos graxos presentes nos óleos e gorduras pode alterar as suas qualidades físico-químicas, além de favorecer ou diminuir as alterações químicas sofridas durante o processo, armazenamento e preparo desses produtos. São diversas as alterações que podem acometer os lipídios, sendo a oxidação a mais comum, e pode ser favorecida por fatores como luz, presença de metais, calor, contato com oxigênio, entre outros (BOBBIO e BOBBIO, 2003; MORETTO *et al.*, 2002).

A oxidação lipídica é o termo geral utilizado para descrever uma sequência complexa de alterações químicas resultantes da interação de lipídios com oxigênio. Durante esse processo, os ácidos graxos esterificados em triacilgliceróis e fosfolipídios decompõem-se, formando moléculas pequenas e voláteis que produzem os aromas indesejáveis conhecidos como rancidez oxidativa. Este processo pode ser descrito por três etapas gerais: iniciação, propagação e terminação. Na iniciação há a abstração do hidrogênio de um ácido graxo para a formação de um radical conhecido como aquila. Uma vez formado, o radical formado é estabilizado através da mudança de configuração *cis* ou *trans*. A facilidade para a formação de radicais de ácidos graxos aumenta com o crescimento da insaturação, isto porque, a energia de dissociação da ligação covalente carbono-hidrogênio em uma cadeia alifática é de 98 kcal

mol^{-1} . Se o átomo de carbono é adjacente a uma ligação dupla, a ligação covalente carbono-hidrogênio torna-se mais fraca com energia de dissociação de $89 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Em ácidos graxos polinsaturados, as ligações duplas apresentam-se em uma configuração de pentadieno com carbono metilênico intermediário. Adicionalmente, quando ligação covalente desse carbono é enfraquecida por duas ligações duplas, a energia de dissociação é ainda menor de $80 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

Na etapa de iniciação ocorre a formação de radicais. Esta reação tem elevada energia de ativação, não ocorrendo de forma espontânea. Para o seu desenvolvimento é necessária a presença de catalisadores, tais como luz visível, radiação ultravioleta, metais (cobre, ferro, níquel, cobalto e manganês) ou metaloproteínas (grupo heme) (JORGE, 2009). Segundo Fogaça e Sant'ana (2009), os radicais são espécies químicas que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados no seu último orbital, o que os tornam altamente reativos. Devido à essa característica de alta reatividade, tais espécies químicas podem alterar a estrutura e a função de componentes celulares e extracelulares, contribuindo para o surgimento de doenças.

Uma vez formado, o radical ($\text{R}\cdot$) reage com o oxigênio e origina o radical peroxila ($\text{ROO}\cdot$). Este, por sua vez, abstrai um átomo de hidrogênio do carbono α -metilênico de outro ácido graxo insaturado adjacente, produzindo hidroperóxidos (ROOH) e outro radical alila ($\text{R}\cdot$) que retroalimenta a reação. No início da fase de propagação os hidroperóxidos acumulam-se, porém, devido a sua natureza instável, com o decorrer da reação oxidativa, eles começam a se decompor. Os íons metálicos, tais como ferro, cobalto, cobre e molibdênio, podem atuar como catalisadores dessa decomposição. Como resultados da decomposição dos hidroperóxidos, obtêm-se hidrocarbonetos e ácidos graxos de cadeia curta, radicais e compostos voláteis, como carbonilas (aldeídos e cetonas), responsáveis pelo odor de ranço. Na etapa de terminação ocorre redução da quantidade de ácidos graxos insaturados no sistema e os radicais ligam-se uns aos outros formando compostos estáveis. Os produtos finais da oxidação lipídica são derivados da decomposição dos hidroperóxidos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos, além de produtos de elevados pesos moleculares resultantes de reações de dimerização e polimerização. Este processo também é catalisado por traços de metais, principalmente cobre e ferro (JORGE, 2009).

Sabendo-se que a oxidação de lipídios é uma reação que não pode ser totalmente cessada e que, uma vez iniciada, ocorre em alta velocidade, o seu início pode ser retardado pela adição de antioxidantes. Além disso, para retardar o início da oxidação em óleos vegetais deve-se adotar alguns cuidados no seu processamento, como o uso de equipamentos em aço inox, embalagens herméticas, refrigeração e proteção contra raios ultravioletas. A diferença da

estabilidade entre os diversos tipos de óleos vegetais é decorrente principalmente da presença de ácidos graxos polinsaturados e da quantidade de γ - e δ -tocoferóis, além da adição de antioxidantes sintéticos. Antioxidantes, presentes naturalmente em óleos vegetais ou adicionados a estes, são substâncias inibidoras da oxidação lipídica, ou seja, ajudam na prevenção da deterioração que ocorre em óleos devido à reação de oxidação, causada por espécies reativas de oxigênio. O principal antioxidante natural encontrado em óleos vegetais é o tocoferol, podendo ocorrer em quatro formas diferentes: α , β -, γ - e δ -tocoferol. Estas substâncias apresentam alto valor nutricional, possuindo também atividade antioxidante (principalmente nas formas de γ - e δ - tocoferóis) e poder vitamínico E (em especial nas formas α - e β - tocoferóis) (TASAN e DEMIRCI, 2005).

A presença de metais também é um fator que contribui para a degradação lipídica. Pera *et al.* (2002) reportaram que a contaminação de óleo por metais pode ser devida tanto a fatores endógenos como exógenos. A presença destes metais no solo, na água e no metabolismo da planta representa fatores endógenos e as contaminações, através dos métodos de colheita, extração e procedimentos de acondicionamento do óleo, são fatores exógenos (LA PERA *et al.*, 2002). Os metais nos óleos vegetais podem ter fontes diferentes, como processos de tratamento (branqueamento, refino e desodorização), corrosão de equipamentos de processamento e moagem, procedimentos de armazenamento, resíduos fungicidas utilizados na agricultura, contaminação do solo ou metais emitidos por veículos e indústrias perto do local de cultivo (SAHAN, BASOGLU e GUCER, 2007). A determinação desses traços de metais é muito importante, porque eles podem catalisar processos de oxidação de cadeias de ácidos graxos, exercendo uma influência deletéria na vida de prateleira dos produtos (GARRIDO *et al.*, 1994). Uma amostra de óleo de boa qualidade deverá apresentar teor de Cu que pode variar entre 20 e 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (JIMÉNEZ *et al.*, 2003).

Alguns desses metais podem ser essenciais para o organismo de seres vivos, como o Zn; entretanto, outros são potencialmente tóxicos como Pb, Cd e Hg (ALLEN *et al.*, 1998). O chumbo é considerado um dos mais perigosos elementos para a vida humana, porque pode causar distúrbios no sistema nervoso. Pb e Cd, em particular, são venenos cumulativos. No entanto, os antioxidantes do óleo oferecem alguma proteção contra a toxicidade de Pb e Cd, reduzindo sua acumulação em tecidos animais (NWOKOCHA *et al.*, 2012). O cobre e o ferro têm ação biológica em doses baixas, mas pode ser tóxico em quantidades maiores. Ambos os metais são oligoelementos necessários encontrados em quase todos os seres vivos (GARRIDO *et al.*, 1994).

Os antioxidantes são compostos químicos que podem ser utilizados para melhorar a estabilidade oxidativa das gorduras e óleos interrompendo o mecanismo de radical de auto-oxidação. Antioxidantes sintéticos podem prontamente retardar a oxidação lipídica à temperatura ambiente, mas são facilmente degradáveis e podem perder suas atividades em temperaturas mais altas (ALADEDUNYE e PRZYBYLSKI, 2009a). Zambonin *et al.* (2008) demonstraram que os antioxidantes como as vitaminas A e E mostram efeitos "anti-isomerizantes". O termo genérico "vitamina E" é utilizado para designar oito diferentes compostos, nomeados α -, β -, γ - e δ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e tocotrienóis. No óleo de canola e soja o composto predominante é γ -tocoferol (GUINAZI *et al.*, 2009).

Assim sendo, a degradação lipídica através do processo de oxidação é muito comum em óleos e gorduras principalmente quando submetidos às condições favoráveis como por exemplo, presença de luz, metais e aquecimento. Desta forma, vê-se que, ácidos graxos polinsaturados possuem maior potencial de oxidação e são largamente utilizados em processos de frituras e preparo de alimentos. Sendo, portanto, importante o estudo sobre o uso de antioxidantes para retardar o início da etapa de iniciação, no entanto, estes devem ser avaliados quanto à sua concentração ideal, resistência térmica e aprovação pela Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA) como aditivo. Além disso, deve-se avaliar o processo de refino de óleos quanto ao uso dos coadjuvantes de tecnologia que podem agir como catalisadores se permanecerem no produto final, como por exemplo mistura à base de cromo, manganês e óxido de cobre e níquel.

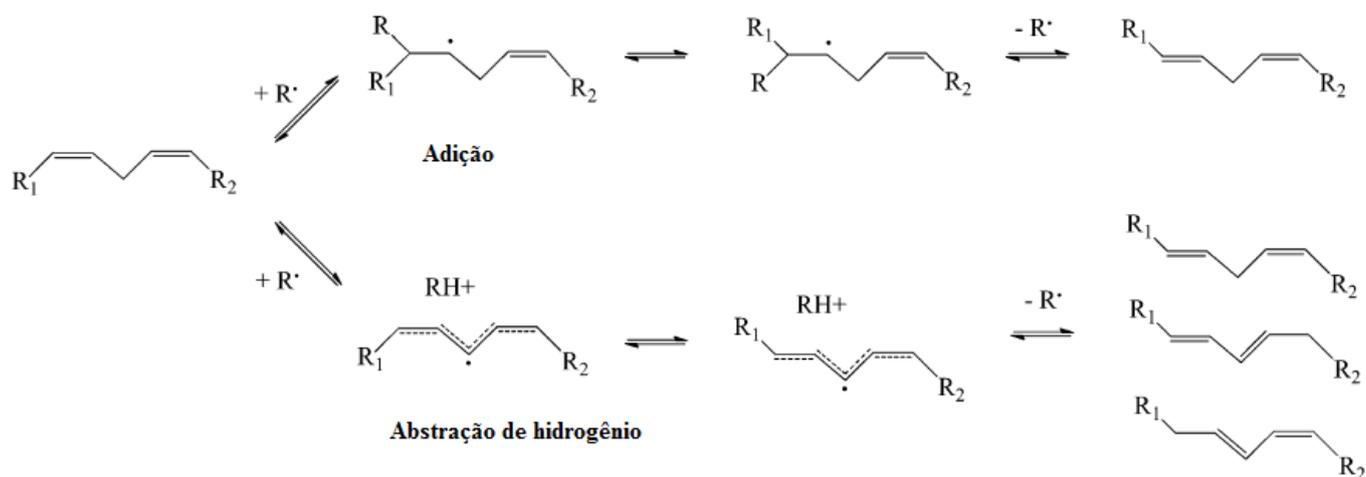
3.3 Ácidos graxos *trans*

Os ácidos graxos *trans* (AGT) são ácidos graxos insaturados (AGI) com átomos de carbono adjacentes às suas ligações duplas em lados opostos, o que gera uma configuração reta e torna o composto pastoso à temperatura ambiente. Podem ser classificados em naturais e industriais, dependendo da sua origem. Naturais são encontrados em carne, derivados e produtos lácteos de animais ruminantes. Industriais são formados a partir de uma reação de hidrogenação, que consiste na adição de átomos de hidrogênio na presença de um catalisador (ALBUQUERQUE *et al.*, 2011; ASCHERIO *et al.*, 1999; MOZAFFARIAN *et al.*, 2006).

Segundo Tzeng e Hu (2014), a isomerização do ácido graxo insaturado pode ocorrer por duas vias, ou seja, adição reversível por um radical catalisador ou abstração de hidrogênio, conforme Figura 3. Adicionalmente, as espécies de radicais catalíticos se somam às espécies de ligação simples C - C e há a rotação de ligação C - C. A dissociação do radical

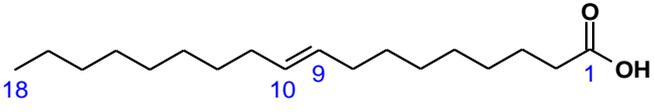
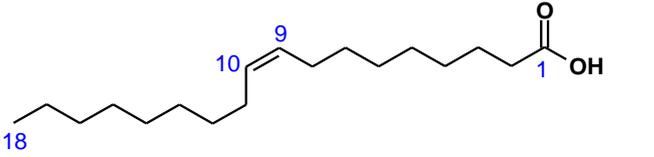
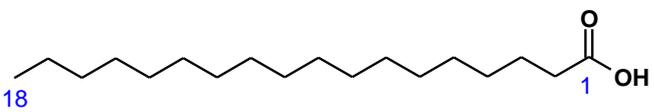
catalisador completa a isomerização. No mecanismo de abstração, um hidrogênio alílico é subtraído pelas espécies de radicais catalíticos, seguido da rotação da ligação C – C.

Figura 3. Vias de reação para isomerização iniciadas por radicais de ácidos graxos (TZENG e HU, 2014).



O número, a geometria e a posição das ligações duplas carbono-carbono interferem na temperatura de fusão (T_f) dos ácidos graxos. O ácido oleico (C18:1-9*c*) tem $T_f = 13^\circ\text{C}$, seu isômero, o ácido elaídico, (C18:1-9*t*) tem $T_f = 44^\circ\text{C}$, e o ácido esteárico (18:0) tem $T_f = 72^\circ\text{C}$ (Tabela 3) (ASCN/AIN, 1996; BHARDWAJ *et al.*, 2011; VALENZUELA e MORGADO, 1999). Por suas características estruturais, os ácidos graxos *trans* (AGT) têm temperaturas de fusão mais elevadas quando comparadas com seus isômeros *cis* correspondentes, mas inferior aos ácidos graxos saturados com mesmo número de átomos de carbono (O'BRIEN, 1998).

Tabela 3. Estrutura, nomenclatura e temperatura de fusão dos ácidos: elaídico, oléico e esteárico (adaptado de BHARDWAJ *et al.*, 2011).

| Estrutura | Nomenclatura | Temperatura de fusão (T _f), °C |
|---|---|--|
|  | Ácido elaídico (<i>trans</i>) C18:1 | 44 |
|  | Ácido oleico (<i>cis</i>) C18:1 | 13 |
|  | Ácido esteárico (saturado) C18:0 | 72 |

Os isômeros de ácido linoleico (AL) e ácido linolênico (ALO) presentes em gorduras não hidrogenadas ou em alimentos ricos em gorduras são resultados da exposição desses ácidos graxos polinsaturados a alguma forma de tratamento térmico, tais como desodorização a vapor ou degomagem durante o refino de óleos (ACKMAN *et al.*, 1974) ou aquecimento durante a fritura (GRANDGIRARD, S'EB'EDIO e FLEURY, 1984). Nestes processos, as ligações duplas não mudam de posição, mas são isomerizados de *cis* para *trans*, resultando na formação de pequenas quantidades de isômeros geométricos *trans* de AL e ALO. Na configuração *cis* da isomeria geométrica, os dois átomos de hidrogênio ligados aos carbonos da ligação dupla estão espacialmente no mesmo lado da cadeia de carbono enquanto que na configuração *trans*, estão diagonalmente opostos um ao outro (RATNAYAKE e GALLI, 2009).

A posição da ligação dupla nos isômeros *trans* C18:1, a partir do carbono carboxílico, geralmente varia entre $\Delta 4$ para $\Delta 16$. A distribuição dos isômeros *trans* em óleos vegetais parcialmente hidrogenados depende da composição dos ácidos graxos do óleo de origem. A extensão da hidrogenação é uma distribuição Gaussiana que gira em torno da dupla $\Delta 9$ ou $\Delta 10$ (RATNAYAKE, 2004; YOSHINAGA *et al.*, 2014). Entretanto, a distribuição de isômeros *trans* C18:1 em gorduras lácteas é diferente do que ocorre em óleos vegetais, pois o ácido vacênico (C18:1-11t) é sempre o principal isômero em gorduras de ruminantes (30-60% do total de t-18:1), enquanto os isômeros C18:1-9t e C18:1-10t ocorrem em níveis relativamente baixos (MENDIS *et al.*, 2008).

Os principais ácidos graxos *trans* polinsaturados encontrados em óleos vegetais e óleos de fritura são os C18:2-9*c*, 12*t* e o C18:2-9*t*, 12*c*, formados a partir do ácido linoleico (C18:2 9*c*,12*c*). Os isômeros do ácido α -linolênico (18:3-9*c*, 12*c*, 15*c*) são principalmente os 18:3-9*t*,12*c*,15*c*, 18:3-9*c*,12*c*,15*t* e 18:3-9*t*,12*c*,15*t* (CHARDIGNY *et al.*, 1997; LOI *et al.*, 2000; BRETILLON *et al.*, 1998).

Cerca de 80% dos ácidos graxos *trans* da dieta humana provêm das gorduras parcialmente hidrogenadas, obtidas em processo industrial de hidrogenação de óleos vegetais insaturados, como, por exemplo, o óleo de soja (MARTIN *et al.*, 2007; MAZOFFARIAN *et al.*, 2006). Entretanto, os ácidos graxos *trans* podem ocorrer naturalmente, em pequenas proporções, na gordura de animais ruminantes (leite e carne), sendo formada pelo processo de biohidrogenação no rúmen dos animais, por ação de enzimas bacterianas (MARTIN *et al.*, 2007; MAZOFFARIAN *et al.*, 2006).

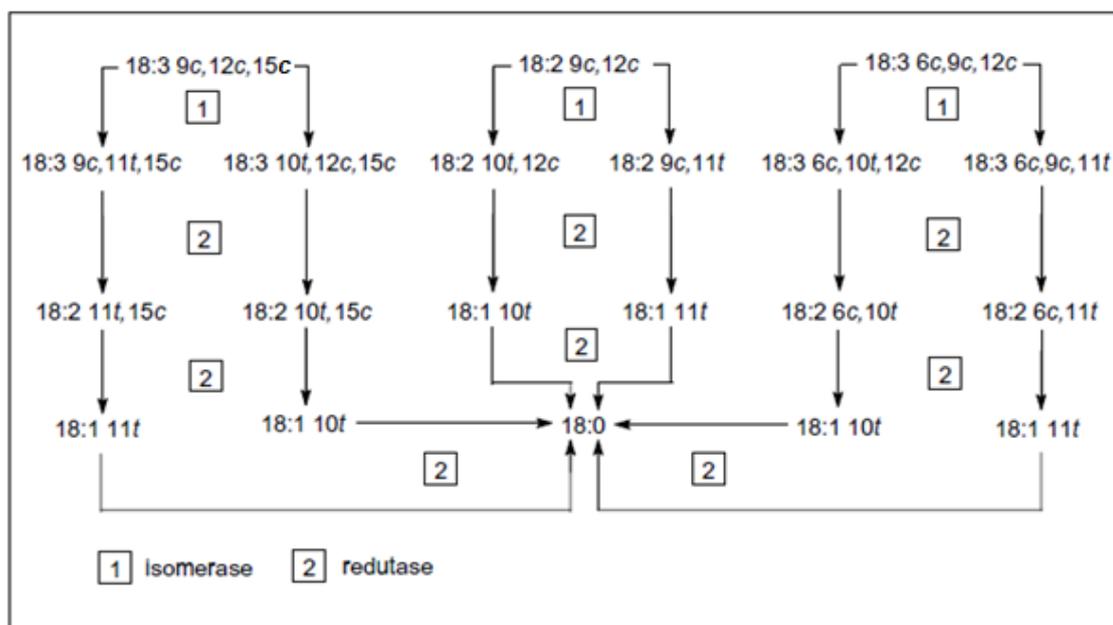
3.3.1 Ácidos graxos *trans* que ocorrem naturalmente

A lipólise é um pré-requisito para que ocorra a bio-hidrogenação. Os lipídios provenientes da dieta são hidrolisados extensivamente por lipases microbianas ruminais, que provocam a liberação de seus ácidos graxos constituintes (JENKIS, 1993).

Após a lipólise, com a oxidação dos triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol, a síntese do ácido linoleico conjugado (ALC) tem início, propriamente, com a isomerização dos ácidos graxos insaturados e posterior biohidrogenação pelas bactérias ruminais (os protozoários desempenham um papel secundário neste processo) (HOLANDA *et al.*, 2011).

Nos animais ruminantes, a ação de microrganismos presentes no rúmen, como *Butyrivibrio fibrisolvens* e *Megasphaera esldenii* provocam a isomerização e troca de posição de ligações duplas dos ácidos graxos poli-insaturados, resultando na formação dos isômeros C18:2-9*c*,11*t*, C18:2-10*t*, 12*c*, do ácido linoleico (Figura 4). Estes ácidos graxos são chamados de ácido linoleico conjugado (ALC) ou CLA em inglês, e podem ser absorvidos pelo animal ou ser bio-hidrogenados para formar ácidos C18:1-11*t* (ácido vacênico) e C18:1-10*t*, que também podem ser obtidos a partir de alfa linolênico (18:3-9*c*, 12*c*, 15*c*) (MARTIN *et al.*, 2007; MENDIS *et al.*, 2008; RATNAYAKE e GALLI, 2009).

Figura 4. Formação de ácidos C18:1-11t e C18:1-10t em ruminantes a partir de ácidos linoleico, alfa-linolênico e gama-linolênico (adaptado de KHANAL e DHIMAN, 2004).



Em seguida, estes ácidos graxos *trans* monoinsaturados podem ser absorvidos ou hidrogenados para formar o ácido esteárico (18:0). Quando absorvidos, esses ácidos são incorporados nos tecidos adiposo e muscular do animal. O ácido C18:2-9c, 11t pode ser formado a partir de ácido vacênico com a ação de enzima delta-9-dessaturase (KHANAL e DHIMAN, 2004). Ou seja, a maioria dos ácidos insaturados que tem 18 carbonos (C18:1, C18:2 e 18:3, respectivamente, oleico, linoleico e linolênico) ou 16 carbonos (16:1, o palmitoléico) serão convertidos, respectivamente, a ácido esteárico (18:0) e palmítico (16:0) (HOLANDA *et al.*, 2011).

CLA é um termo genérico utilizado para se referir a posições e geometria dos isômeros do ácido linoleico com uma ligação dupla conjugada. Os dois principais isômeros de CLA, o *cis*-9, o *trans*-11 e o *trans*-10, *cis*-12, são naturalmente encontrados em produtos lácteos e carnes de ruminantes, com o *cis*-9, *trans*-11 CLA, sendo o isômero mais abundante (aproximadamente 75 a 90% de *cis*-9, *trans*-11 CLA, 10 a 25% de *trans*-10, *cis*-12 CLA) (KIM *et al.*, 2009).

Os ácidos graxos polinsaturados são mais tóxicos para as bactérias que participam da bio-hidrogenação em relação aos ácidos graxos monoinsaturados. Quando ácidos graxos poli-insaturados são ingeridos por ruminantes, a bio-hidrogenação acontece para permitir a

sobrevivência da bactéria *Butyrivibrio fibrisolvens*, que é a maior responsável por este processo (MAIA *et al.*, 2007; MAIA *et al.*, 2010).

3.3.2 Ácidos graxos *trans* formados em processos industriais

Muitos estudos têm relatado que o conteúdo de ácidos graxos *trans* depende não só da origem e a qualidade da gordura, mas também dos processos que é submetida, como hidrogenação, tratamento térmico, desodorização e aeração (GERCA, 2003; MALHEIRO *et al.*, 2009; NGADI *et al.*, 2009; QUI'LEZ *et al.*, 2006; WEBER *et al.*, 2008; ZIAIIFAR *et al.*, 2010).

Gorduras ricas em ácidos graxos *trans* quando presentes nas formulações dos alimentos podem: (i) aumentar a sua estrutura e textura (isto é, aumenta a consistência, elasticidade, fragilidade, e mastigabilidade); (ii) aumentar a sua vida de prateleira; (iii) aumentar a sua estabilidade do sabor; (iv) diminuir a sua vulnerabilidade a oxidação; (v) aumentar a sua estabilidade durante o armazenamento à temperatura ambiente; (vi) a aumentar a sua estabilidade durante a fritura; e (vii) melhorar a estabilidade de emulsões (MENAA *et al.*, 2013).

3.3.2.1 Refino de óleo vegetal

Os principais fatores que aumentam os níveis de AGT nos óleos comestíveis são: 1) refino de óleo comestível, 2) hidrogenação de óleos vegetais, e 3) métodos de cozimento inadequados. Várias substâncias, como ácidos graxos livres, fosfolipídios, carboidratos e proteínas, que estão presentes em óleos vegetais, podem causar alterações na cor, aroma, e sabor dos óleos, que restringem as aplicações do óleo e reduzem a vida-de-prateleira. Portanto, os óleos devem ser refinados para remover essas substâncias (HUANG *et al.*, 2016).

O refino do óleo vegetal pode ser definido como um conjunto de processos que visam transformar os óleos brutos em óleos comestíveis, embora existam casos de consumo de óleos brutos, como o azeite de oliva e o azeite de dendê. As principais etapas do refino são: degomagem ou hidratação, neutralização ou desacidificação, branqueamento ou clarificação, desodorização. A finalidade do refino é melhorar a aparência, odor e sabor do óleo bruto, por meio da remoção dos seguintes componentes (BHARDWAJ, PASSI e MISRA, 2011; MANDARINO e ROESSING, 2001):

a) substâncias coloidais, proteínas, fosfatídeos e produtos de sua de composição;

- b) ácidos graxos livres e seus sais, ácidos graxos oxidados, lactonas, acetais e polímeros;
- c) substâncias coloridas como clorofila, xantofila, carotenóides, incluindo-se, neste caso, o caroteno ou pró-vitamina A;
- d) substâncias voláteis como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres de baixo peso molecular;
- e) substâncias inorgânicas como os sais de cálcio e de outros metais, silicatos, fosfatos, dentre outros minerais.

Óleos vegetais brutos são refinados por processos físicos ou químicos. No refino químico, os ácidos graxos livres são neutralizados com solução alcalina, usualmente o hidróxido de sódio, enquanto que no refino físico os ácidos graxos livres são removidos por destilação durante a desodorização (O'BRIEN, 2009).

Para tornar o processo de refino totalmente físico, a etapa de neutralização por álcalis deve ser substituída pela destilação dos ácidos graxos livres, tornando o processo essencialmente físico. Esta destilação elimina alguns aspectos desfavoráveis da neutralização alcalina: a saponificação e o arraste de óleo neutro causam perdas de óleos e dificuldade de tratar óleos com alta acidez. Esta destilação está baseada na considerável diferença entre os pontos de ebulição dos ácidos alifáticos e seus ésteres de glicerol (CERIANI e MEIRELLES, 2006; DUMONT e NARINE, 2007).

O refino químico é o método tradicionalmente utilizado, principalmente porque os custos energéticos são menores e o processo é mais flexível relativamente ao tipo e qualidade do óleo a processar (OLIVEIRA, 2012).

Os óleos vegetais brutos contêm quantidades mínimas de ácidos graxos *trans*, isto é, de 0,1 a 0,3% no total de ácidos graxos. Nas etapas de refino, prévias à desodorização, os níveis destes ácidos graxos permanecem baixos. Na desodorização, a temperatura atinge valor ao redor de 230°C e por conta disso os níveis de *trans* elevam-se de três a dez vezes. Os ácidos graxos *trans* formados são principalmente isômeros a partir daqueles com duas e três insaturações (C18:2 e 18:3), enquanto que os ácidos graxos monoinsaturados são os mais resistentes (DUCHATEAU *et al.*, 1996; VAN BRUGGEN *et al.*, 1998).

3.3.2.2 Fritura de alimentos

A fritura é um dos mais antigos métodos de preparação de alimentos com invenção atribuída aos chineses (ROSSELL, 2001). A alta temperatura usada na fritura gera diversas alterações químicas e físicas devido à decomposição térmica. A fritura tornou-se o método de cozimento de alimentos mais amplamente utilizado, sendo um dos responsáveis pela formação de AGT, dependendo das condições de processamento aplicadas, incluindo temperatura, tempo, tipo de óleo, composição de ácidos graxos e presença de antioxidantes (ALBUGUERQUE *et al.*, 2016). Durante a fritura, o óleo é continuamente exposto a temperaturas elevadas na presença de ar e pode sofrer hidrólise, oxidação e polimerização, resultando na deterioração da qualidade, provocando mudanças não apenas sensoriais, mas também as propriedades nutricionais (ZHANG *et al.*, 2012).

Alguns estudos sugerem que a acumulação considerável de ácidos graxos *trans* ocorre somente quando o óleo é sujeito a condições severas, como aquecimento a mais de 250°C (BANSAL *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2007). No entanto, na Tabela 4, estudos mostram que diferentes condições de fritura empregadas geram a formação de AGT na faixa de 150 a 220°C.

Baltacıođlu (2017) estudou a formação de AGT nos óleos de girassol e canola quando submetidos ao processo de fritura de batatas em 3 ciclos de 4 min com uso de duas temperaturas (160 e 190°C). As concentrações dos AGT, em %, antes da fritura, para óleo de girassol e canola, foram de $0,26 \pm 0,06$ e $0,28 \pm 0,04$, respectivamente. O teor total de AGT foi reduzido em 8,47% no óleo de girassol após a fritura, enquanto que, um aumento foi observado no óleo de canola. Uma das razões para esta diferença foi relacionada com o teor inicial menor de AGT no óleo de girassol e esse valor foi diminuído após a fritura. Neste aumento de AGT em óleo de canola, a maior quantidade observada foi de ácido eláídico (C18:1 *trans*) com um valor em % de $0,18 \pm 0,04$. Segundo Aladedunye e Przybylski (2009b), a oxidação térmica explica o aumento nos valores de AGT, além do tempo de fritura e presença de oxigênio.

Hou *et al.* (2012) também avaliaram a formação de AGT em diferentes tipos de óleos de soja quando submetidos ao processo de fritura de batatas a 180-185°C por 32 h. Os valores totais de AGT encontrados para os 3 tipos de óleo variaram de 1,12 a 1,79%.

Koh *et al.* (2008) relataram que o óleo de palma com adição de antioxidantes (incluindo BHT e BHA) comparado com o óleo sem os antioxidantes sintéticos e naturais adicionados, apresentaram uma maior proteção contra rancidez. O perfil de ácidos graxos

presentes no óleo vegetal afeta diretamente a estabilidade à oxidação. Aqueles com maior grau de insaturação são os mais susceptíveis às reações oxidativas (LIU *et al.*, 2002).

Chen *et al.* (2014) constataram que, em geral, pequenas alterações são observadas na composição de ácidos graxos e na formação de isômeros *trans* após 8 h de fritura em temperatura inferior a 200°C. No entanto, com o processo extremo de fritura, a degradação térmica e a formação de AGT's no óleo de fritura aumentam em proporção direta à temperatura e ao tempo de fritura. Segundo os autores, os maiores valores foram encontrados a 250°C (6% para 9c12t C18:2 e 9t12c C18:2 e 5,7% para 9t12t C18:2). Esses resultados sugerem que a fritura a baixas temperaturas (por exemplo, a 150°C) pode ser preferível não apenas para menor ingestão de AGT, mas também para o consumo de óleos menos deteriorados.

Conforme Tabela 4, em termos de avaliação da influência do tipo de material usado no recipiente de fritura para formação de ácidos graxos *trans*, Kala e Gurudutt (2012) realizaram um processo de fritura por até 12 h a 175–185°C com recipientes de vidro, ferro fundido, aço inox e uma liga de 5 metais (alumínio, magnésio, manganês, cromo e silício) usando óleo de castanha refinado (óleo 1), óleo de palma branqueado e desodorizado (óleo 2), gordura vegetal parcialmente hidrogenada com baixo teor de AGT (gordura 1) e gordura com alto teor de AGT (gordura 2). O estudo demonstrou que o recipiente de vidro apresentou a menor formação de C18:1t e atuou como uma superfície inerte não metálica no aquecimento. O recipiente de ferro acelerou o processo de oxidação para o óleo 2, aumentando o teor de C18:1t de 0 para 2%, devido a oxidação e polimerização do óleo tendo o ferro como catalisador.

O aquecimento de óleos ricos em ácido linolênico gera quatro isômeros de ácido linolênico. Os isômeros formados, 18:3 (9c, 12c, 15t) e o 18:3 (9t, 12c, 15c), representam cerca de 85-90% do total, enquanto para o 18:3 (9t, 12c, 15t) e o 18:3 (9c, 12t, 15c) os isômeros formados representam cerca de 10-15% (ACKMAN *et al.*, 1974; WOLFF, 1995). Proporções relativas destes quatro isômeros transparecem ser constantes e independentes do nível inicial em ácido linolênico. Eles podem representar até 3,5% do total de ácidos graxos (WOLFF, 1995).

Tabela 4. Estudos sobre o efeito do aquecimento de óleos e formação de ácidos graxos *trans*.

| Óleo | Tipo de aquecimento | % <i>trans</i> C18:1 | % <i>trans</i> C18:2 | % <i>trans</i> C18:3 | Total <i>trans</i> | Referência |
|---|---|---|----------------------|----------------------|--------------------|------------------------|
| Girassol | Fritura de batata a 160 ± 5°C – 3 ciclos de 4 min | 0,01; 0,01 e 0,02 | 0,22; 0,15; 0,12 | 0,00; 0,00; 0,00 | 0,23; 0,16; 0,14 | |
| Girassol | Fritura de batata a 190 ± 5°C – 3 ciclos de 4 min | 0,03; 0,02 e 0,02 | 0,09; 0,21; 0,22 | 0,00; 0,00; 0,00 | 0,12; 0,24 e 0,23 | Baltacıođlu, 2017 |
| Canola | Fritura de batata a 160 ± 5°C – 3 ciclos de 4 min | 0,00; 0,04 e 0,01 | 0,09; 0,11; 0,11 | 0,05; 0,09; 0,03 | 0,14; 0,24; 0,14 | |
| Canola | Fritura de batata a 190 ± 5°C – 3 ciclos de 4 min | 0,10; 0,01 e 0,18 | 0,09; 0,12; 0,12 | 0,02; 0,04; 0,13 | 0,21; 0,17 e 0,42 | |
| Amendoim duplamente filtrado | Aquecimento a 175–185°C por 6 e 12 h | Ferro fundido (0,14 – 6 h e 0,33 – 12 h) Aço inox (0,11 – 6 h e 0,3 – 12 h) Hindálio – liga de alumínio (0,17 – 6 h e 0,5 – 12 h) | - | - | - | Kala e Gurudutt (2012) |
| Palmoléina, refinado, branqueado e desodorizado | Aquecimento a 175–185°C por 6 e 12 h | Ferro fundido (0,8 – 6 h e 2 – 12 h) Aço inox (0,2 – 6 h e 0,3 – 12 h) Hindálio – liga de alumínio (0,2 – 6 h e 0,3 – 12 h) | - | - | - | |

| Óleo | Tipo de aquecimento | % <i>trans</i> C18:1 | % <i>trans</i> C18:2 | % <i>trans</i> C18:3 | Total <i>trans</i> | Referência |
|-----------------|--|----------------------|---|--|--|-------------------------------|
| Soja | Aquecimento a 180 e 220°C (2 ciclos de 30 min) | - | - | - | 0,60 e 2,18 – 180°C 1,62 e 3,70 – 220°C | Bhardwaj <i>et al.</i> (2016) |
| Azeite de oliva | Aquecimento a 180 e 220°C (2 ciclos de 30 min) | - | - | - | 0,40 e 1,10 – 180°C 0,9 e 3,70 – 220°C | |
| Soja | 180–185°C (0, 20 e 40 ciclos de 30 min – 20 h) | 0,04; 0,21 e 0,27 | *C18:2, 9t 12t – 0; 0,16 e 0,16. *C18:2, 9c 12t - 0,11; 0,39 e 0,46. *C18:2, 9t 12c - 0,07; 0,43 e 0,49 | *C18:3, 9c 12t 15t – 0,02; 0,22 e 0,26. *C18:3, 9c 12t 15c + *C18:3, 9t 12c 15c - 0,06; 0,16 e 0,15 | 0,29; 1,55 e 1,79 | Hou <i>et al.</i> (2012) |
| Palma | 150, 200 e 250°C – 8 h | - | *9c12t C18:2: 0,09 (150°C); 0,08 (200°C); 6 (250°C) *9t12c C18:2: 0,09 (150°C); 0,08 (200°C); 6 (250°C) *9t12t C18:2: 0,18 (150°C); 0,18 (200°C); 5,7 (250°C) | *9c12t15t C18 e 9c12c15t C18:3: 0,031 (250°C) *9t12c15c C18:3: 0,025 (250°C) | - | Chen <i>et al.</i> (2014) |

Através dos estudos da Tabela 4, há a indicação de que aumentando o número de ciclos de fritura a 180°C pode causar um aumento significativo de isômeros de AGT nos diferentes tipos de óleo com altos teores de ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados, a exemplo de soja, canola, girassol e oliva. Além disso, o aquecimento dos óleos em temperaturas acima de 180°C, gera uma maior formação de AGT pois acelera as reações de oxidação. O estudo de Bhardwaj *et al.* (2016) encontrou no primeiro ciclo de fritura a 180°C um valor total de AGT de 0,60% enquanto a 220° foi de 1,62%.

Em outro estudo, Tsuzuki, Matsuoka e Ushida (2010) verificaram que quando batatas cruas cortadas em fatias foram fritas em óleo de canola a 180°C, o teor de ácidos graxos *trans* foi maior quando comparado com óleo aquecido na mesma temperatura sem batatas. Song *et al.* (2015) demonstraram que entre os métodos de cozimento testados, o processo de fritura a 170 °C em óleo de milho, com agitação contínua podem acelerar as taxas de oxidação lipídica e a formação de ácidos graxos *trans*.

Em óleos e gorduras com alto teor de ácido oleico com ligação dupla na posição 9, pode ocorrer a isomerização durante o aquecimento por tempo prolongado. A quantidade total de AGT, especialmente para C18:1t foi aumentada conforme o aumento da temperatura e o tempo de aquecimento (XIAO *et al.*, 2010). Durante o aquecimento em temperaturas de fritura, a isomerização ocorreu e a formação de AGT foi observada (SANDHYA *et al.*, 2010; TYAGI *et al.*,1996;). O óleo de canola aquecido a 240°C por 10 h produziu isômeros *trans* dos ácidos linoleico e α -linolênico. No mesmo estudo, observou-se que AGT *trans* C18:2 e C18:3 foram produzidos em níveis muito mais baixos, quando o óleo foi aquecido a 200°C durante 10 h (GRANDGIRARD *et al.*, 1984).

A influência de metais comuns tais como ferro, cobre e alumínio (normalmente usados nas composições dos materiais dos recipientes usados na culinária doméstica) na hidrogenação de óleos vegetais não foi estudada, ou seja, como os íons metálicos podem catalisar reações de oxidação, hidrólise e polimerização (KALA e GURUDUTT, 2012; O'BRIEN, 2000; STAUFFER, 1996). Além disso, também não foi avaliada a influência dos metais ferro, cobre e alumínio, em diversas concentrações, em processos de aquecimentos e frituras usando óleos com altos teores de ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados.

O tipo de recipiente pode alterar a qualidade do óleo. No caso das panelas de ferro, por exemplo, sabe-se que elas recebem regularmente pintura com tinta escura atóxica e própria para contato com alimentos. Essa tinta, durante o uso da panela, sai gradualmente, expondo o metal ao oxigênio, umidade e ácidos próprios dos alimentos. Isso irá resultar na ferrugem (óxido de ferro) que habitualmente é vista nas panelas de ferro. Entretanto, além de alterar a

cor e o sabor do alimento, a sua ingestão em quantidade elevada poderá causar distúrbios gastrointestinais (QUINTAES *et al.*, 2004). Adicionalmente, sendo o ferro um catalisador na oxidação lipídica, a exposição do alimento sob aquecimento ao óxido de ferro pode acelerar processos de isomerização dos ácidos graxos.

Aladedunye e Przybylski (2009b) sugeriram técnicas diferentes desenvolvidas nos últimos anos para evitar formação de AGT durante a fritura, tais como: diluição do óleo, fritura sob atmosfera modificada, fritura hermética, filtração, tratamento adsorvente e adição de antioxidante em óleo. Sendo que em termos de uso doméstico alguns processos não são exequíveis. O antioxidante já é amplamente utilizado industrialmente, mas é necessário avaliar a sua resistência térmica e, portanto, sua atuação no processo de fritura.

3.3.3 Ácidos graxos *trans* e suas implicações na saúde

Há evidências consistentes de que os AGT geram efeitos adversos à saúde, particularmente nos perfis de lipoproteínas (ASCHERIO, 2006; MOZAFFARIAN *et al.* 2009; BENDSEN *et al.*, 2011), mais notadamente na razão das lipoproteínas LDL-colesterol (lipoproteína de baixa densidade) e HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidade) que é, provavelmente, o melhor marcador para estimar os efeitos destes ácidos graxos sobre a incidência de doenças cardiovasculares (ALLEN *et al.*, 2016; BROUWER, 2016). Além disso, os AGT aumentam a lipoproteína A (LPA) e os níveis de triacilgliceróis plasmáticos, que estão independentemente associados com o aumento do risco de doenças cardiovasculares (ARO *et al.*, 1997; ASCHERIO *et al.*, 1999). A proteína HDL tem propriedades antiaterogênicas atuando no transporte de colesterol da periferia dos tecidos para o fígado. Sendo assim, valores baixos de HDL e valores altos de LDL estão associados ao desenvolvimento de doenças coronárias (DC). Estudos epidemiológicos têm sugerido que o desenvolvimento de DC aumenta em indivíduos com menos de 40 mg/dL de HDL (YANAI *et al.*, 2015). Há proposições que evidenciam a associação entre o consumo de AGT e outras doenças como diabetes mellitus, câncer, asma, Alzheimer, depressão e infertilidade (CHAJÈS *et al.*, 2008; DE SOUZA *et al.*, 2015; LOTTENBERG *et al.*, 2012; WEILAND *et al.*, 1999).

O consumo de óleos oxidados, como verificado em frituras dos mais diversos tipos de alimentos, traz sérios riscos à saúde, pois alguns dos produtos formados pela oxidação têm atividade biológica (CHOE e MIN, 2007). Os compostos formados pela decomposição de ácidos graxos insaturados durante o processo de fritura afetam a disponibilidade dos ácidos graxos essenciais como linoleico e α -linolênico (KINSELLA, *et al.*, 1981; TYAGI e

VASISHTHA, 1996), responsáveis pela biossíntese dos ácidos araquidônico, eicosapentaenoico e do cosaexaenóico, na formação de prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, compostos que participam da regulação da pressão arterial, frequência cardíaca, resposta imunológica, dos processos da coagulação sanguínea e do funcionamento do sistema nervoso central (MANTZIORIS *et al*, 1994).

Os isômeros *cis* são mais rapidamente metabolizados como fonte de energia que os *trans*, e são preferencialmente incorporados em fosfolipídios estruturais e funcionais. Em humanos, a incorporação dos isômeros *trans* nos tecidos depende da quantidade ingerida, do tempo de consumo deste tipo de gordura, da quantidade de ácidos graxos essenciais consumidos, do tipo de tecido e do tipo de isômero (configuração e posição da ligação dupla na cadeia). Os teores de AGT encontrados em tecidos adiposos refletem o consumo por longo período de tempo, apresentando normalmente correlação com histórico de ingestão por mais de um ano (CHIARA *et al.*, 2002)

A baixa ingestão de AGT deve reduzir a incidência de doenças do coração. As estimativas de redução podem variar de 4%, com base em mudanças no plasma das concentrações de lipoproteínas de baixa densidade e lipoproteínas de alta densidade, para maior que 20%, baseada em associações epidemiológicas quando a ingestão de AGT é inferior a 2% de consumo de energia (5g/dia). Assim, a ingestão diária de AGT deve ser tão baixa quanto possível para minimizar os riscos à saúde (CRAIG-SCHMIDT, 2006; KATAN, 2006; STENDER *et al.*, 2006). Segundo BENDSEN *et al.* (2011), o aumento do consumo total de AGT, variando de 2,8 a 10 g por dia, foi associado com um aumento de 22% no risco de eventos coronarianos com um semelhante aumento do risco de doença coronária fatal.

Entre as pesquisas voltadas para a análise da ação dos AGT sobre a saúde do feto, encontrou-se que a concentração de AGT ou especialmente de C18:1 *trans* no sangue do cordão umbilical demonstra uma correlação inversa com as dimensões do feto, sugerindo um impacto negativo. Além disso, C18:1 *trans* pode interferir no metabolismo do ácido araquidônico que está diretamente relacionado ao crescimento e desenvolvimento pós-natal como relato comum o bloqueio e inibição da biossíntese dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, na fase fetal e após o nascimento (BOUWSTRA *et al.*, 2006; WADA *et al.*, 2017). O estudo de Koletzko e Muller (1990) demonstrou correlação inversamente proporcional e significativa entre o ácido linoleico e os AGT, devido possivelmente à inibição da enzima dessaturase. Portanto, os ácidos graxos *trans* deveriam apresentar prioridade nutricional secundária quando comparados aos ácidos graxos saturados, embora o consumo

destes últimos também provoque efeitos desfavoráveis à saúde e não deve ser negligenciado (VALENZUELA *et al.*, 1995).

De acordo com MOZAFFARIAN *et al.* (2006), evidências indicam que os AGT são pró-inflamatórios. Outras evidências apontam que os efeitos pró-inflamatórios são mais intensos para os isômeros *trans* do ácido linoleico (C18:2) e do ácido oleico (C18:1) do que para os do ácido palmitoleico (C16:1). Os mecanismos que descrevem esses efeitos ainda não estão estabelecidos, mas devem envolver a incorporação dos AGT a determinadas células que estão relacionadas à inflamação. Isso pode explicar as implicações dos AGT na ocorrência de doenças cardiovasculares. Segundo Katz (2006), os AGT podem modificar a função celular através da interação com regiões hidrofóbicas. Evidências mostraram que a configuração dos AGT influencia na interação entre membranas lipídicas e membranas proteicas, modificando o seu funcionamento, podendo acarretar em arritmias cardíacas.

3.3.4 Legislação sobre rotulagem dos ácidos graxos *trans*

A preocupação dos órgãos reguladores com a informação ao consumidor sobre o conteúdo dos AGT na alimentação remonta ao ano de 1995, quando a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou a ingestão moderada desse tipo de gordura. Em 1999, o FDA (*Food and Drug Administration*) recomendou que a quantidade de AGT fosse incluída na embalagem dos produtos junto com a informação de gordura saturada. A partir de janeiro de 2006, esta informação passou a ser obrigatória nos Estados Unidos, que exigiram que o conteúdo teria que ser informado quando o produto contivesse mais de 0,5g de AGT por porção (RIBEIRO *et al.*, 2007). Por definição do FDA, os AGT são a soma de todos os ácidos graxos insaturados que contém uma ou mais ligação dupla não conjugada na configuração *trans* (MOSS, 2006).

A ingestão média diária de ácidos graxos *trans*, na França, era de 3 g/dia em adultos, representando 1,3% do total de energia. Então, a Agência de Segurança Alimentar da França (AFSSA, *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments*) recomendou à população para diminuir o consumo de produtos de padaria em 30% e que o conteúdo de ácidos graxos *trans* nestes produtos não deveria exceder 1 g/100g (LERGER e RAZANAMAHEFA, 2005).

Já a Dinamarca foi pioneira no mundo em regulamentação de AGT em produtos industrializados. Em 1993, o governo dinamarquês iniciou ações para remover os AGT dos alimentos industrializados, culminando com a remoção total em 2003. Essa iniciativa foi decorrente de inúmeros trabalhos publicados sobre os efeitos maléficos dos AGT na saúde

(ASTRUP, 2006). A legislação da Dinamarca de 11 de março de 2003 estabeleceu que, nos produtos embalados como “livre de ácidos graxos *trans*”, o conteúdo destes ácidos deve ser menor que 2g/100g da gordura ou óleo. Foi concedido um período de transição de 01 de junho de 2003 a 01 de janeiro de 2004 para adequação das indústrias (LETH *et al.*, 2006; STENDER *et al.*, 2006).

Na Holanda, desde 1990, esforços têm sido feitos pelas indústrias para a redução de AGT em alimentos *fast-food*. A pressão da sociedade local ajudou na redução desse conteúdo em contraposição ao governo, cuja intervenção foi mínima. As batatas-fritas do McDonald's têm agora menos de 4% de AGT e 24% de ácidos graxos saturados em comparação com as dos Estados Unidos, que apresentam 21% de AGT e 21% de saturados (KATAN, 2006).

No Brasil, a Secretária de Vigilância Sanitária publicou em 17/10/1997 a Portaria nº 521, que determinava que os AGT deveriam ter seus teores somados com os dos ácidos graxos saturados (BRASIL, 1990). Somente em 2003, com a publicação da Resolução RDC 360, harmonizada no MERCOSUL, as empresas ficaram obrigadas a declarar o teor de AGT na rotulagem nutricional (Figura 5). De acordo com essa resolução, a informação nutricional para os AGT será expressa como “zero”, “0” ou “não contém” quando o alimento contiver quantidades menores ou iguais a 0,2 g por porção em g. Entretanto, o Código de Defesa do Consumidor Brasileiro, no artigo 31, determina que os produtos ofertados à população devem apresentar declarações corretas e objetivas a respeito de suas características quanto à qualidade, quantidade e composição, entre outras, além dos riscos que oferecem à saúde dos consumidores (ANVISA, 2014). A legislação brasileira não estabeleceu a quantidade recomendada para consumo de AGT que seja segura para a saúde, apenas que o consumo deve ser menor que 1% do valor energético diário, o que representa 2 g/dia, considerando-se uma dieta de 2.000 quilocalorias (BRASIL, 2014).

Figura 5. Informação nutricional obrigatória para alimentos com destaque para gordura *trans* (Ministério da Saúde, 2018).



A OMS e outras agências governamentais aumentaram os esforços para reduzir as quantidades de AGT's em alimentos processados ou até mesmo para eliminá-lo. Muitos países exigem que o conteúdo de AGT seja informado no rótulo nutricional dos produtos. Em junho de 2015, o FDA declarou que o óleo parcialmente hidrogenado é a principal fonte de ácidos graxos *trans* oriundos de produtos industrializados, não sendo mais, portanto, reconhecidos como seguros para o consumo. Atrelado a isto, estabeleceu um período de conformidade de três anos. Isso permitiu que as empresas reformulas-se os produtos sem a adição de óleos parcialmente hidrogenados ou solicitassem ao órgão que permitisse usos específicos (FDA, 2015; KHAN *et al.*, 2017).

3.3.5 Ocorrência dos ácidos graxos *trans* nos alimentos

Aued-Pimentel *et al.* (2009) estudaram a composição de ácidos graxos, principalmente *trans*, de óleos vegetais polinsaturados refinados, coletados no comércio do estado de São Paulo entre os anos de 2005 e 2007. Foram analisadas 34 amostras de óleo de soja, 7 de girassol, 2 de canola e 6 de milho. Destas, 47% das amostras de óleo de soja, 100% das amostras de canola e 57% das amostras de girassol apresentaram níveis de ácidos graxos *trans* acima de 2,0% (m/m de ésteres metílicos). Segundo os autores, a melhoria no processo de refino dos óleos vegetais insaturados como soja, canola e girassol, pelo controle das temperaturas de desodorização, poderá contribuir para atender às recomendações da

Organização Mundial de Saúde, no sentido de minimizar os níveis de ácidos graxos *trans* dos alimentos preservando a saúde da população. Ainda neste trabalho publicado analisaram-se por cromatografia em fase gasosa 22 amostras de salgadinhos, batatas fritas, sorvetes, produtos de panificação, bebida láctea, creme vegetal e macarrão instantâneo, com a alegação nos rótulos de “0% de gordura *trans*”, os resultados indicaram desacordo em quatro amostras, ou seja, os valores obtidos variaram de 0,3 g/porção a 1,8 g/porção, contrariando o limite de até 0,2 g/porção. Os autores ainda destacam que somente uma amostra apresentou claramente na lista de ingredientes descrita no rótulo a presença de gordura vegetal parcialmente hidrogenada.

Badolato (2007) estudou os aspectos analíticos da determinação de ácidos graxos *trans* em 19 amostras de gorduras vegetais hidrogenadas, 14 margarinas comercializadas no Brasil e 16 amostras de margarinas comercializadas no exterior. Os teores de ácidos graxos *trans* nas gorduras vegetais hidrogenadas variaram de 0 a 20,5%, tendo o C18:1t como principal isômero, variando de 1,7 a 13,22%. Seis margarinas brasileiras não apresentaram ácidos graxos *trans*. O C18:2 t foi observado em 4 amostras, variando de 0,23 a 4,81% e os isômeros C18:3 t variaram de 0,17 a 1,11% em 5 amostras. Duas margarinas importadas apresentaram teores de ácidos graxos *trans* variando de 2,21 a 7,81%, o 18:1 t de 1,76 a 7,81%.

Chiara *et al.* (2003) avaliaram os teores de ácidos graxos *trans* de batatas tipo *chips*, batatas de redes de *fast food*, biscoito *cream cracker* e sorvetes, consumidos na cidade do Rio de Janeiro. O valor médio de ácidos graxos *trans* para as batatas tipo “*chips*” foi zero e para as batatas de *fast food* foi de 4,74 g/100g de alimentos. Nos sorvetes variou de 0,04 a 1,41 g/100 g e nos biscoitos *cream cracker* de 2,81 a 5,60 g/100g.

Martin *et al.* (2005) analisaram doze marcas de biscoitos *cream cracker* por cromatografia em fase gasosa e observaram níveis de ácidos graxos *trans* de 12,2 até 31,2% do total de ácidos graxos com valor médio foi de 20,1%. Isômeros do C18:1 t foram o principal grupo de ácidos graxos *trans* presentes, representando 83,2% do total de isômeros *trans*. Os resultados indicaram que os biscoitos *cream cracker* continham consideráveis proporções de ácidos graxos *trans*.

HUANG *et al.* (2016) analisaram nove diferentes tipos de óleos comestíveis de 7 cidades da China: óleo de colza, óleo de chá, óleo de soja, óleo de amendoim, óleo de salada, óleo de milho, banha, óleo de palma e um mix de diversos óleos. Os teores de ácidos graxos *trans* (AGT) em óleos comestíveis foram determinados e foi feita uma avaliação de risco através da identificação do perigo, avaliação de resposta, avaliação de exposição e caracterização de risco. O conteúdo total de AGT variou de $0,075 \pm 0,011$ a $2,243 \pm 0,770$ g/100 g de óleo, com

um teor médio de 0,66 g/100 g de óleo. Os conteúdos de AGT diferiram entre diferentes tipos de óleos e entre diferentes cidades. De um modo geral, amostras de óleo das áreas do norte da China continham mais AGT, e a banha geralmente tinha níveis mais elevados de AGT. Uma avaliação da exposição mostrou que a ingestão diária estimada de AGT a partir de óleos comestíveis chineses era baixa e uma avaliação de risco indicava que havia um baixo risco de consumo de AGT em óleos comestíveis chineses.

Apesar dos estudos citados anteriormente demonstrarem a ocorrência de ácidos graxos *trans* em diversos tipos de alimentos ao longo dos anos, há uma atual tendência de utilização de ingredientes com propriedades funcionais e uma constante busca por alimentos mais saudáveis, incluindo a redução no consumo de ácidos graxos *trans* na dieta, por exemplo, no trabalho de Rios e Lannes (2014) determinaram o efeito da substituição de gordura vegetal hidrogenada por outros lipídios como: gordura de palma, óleo de soja, óleo de castanha do Brasil e óleo de coco e extrato de aveia. Os resultados da análise sensorial demonstraram ótimo padrão de qualidade dos bolos elaborados com a substituição da gordura vegetal hidrogenada, podendo assim apontar outras opções de ingredientes para o consumidor e para a indústria de alimentos com agregação de valor nutricional.

Um método alternativo em substituição à hidrogenação dos óleos vegetais é a interesterificação: processo que não promove a isomerização de ligações duplas dos ácidos graxos, não afeta o grau de saturação e produz uma gordura semi-sólida com propriedade física desejável como modificação da temperatura de fusão e plasticidade (FÁRFAN *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2010). E, portanto, é considerado um método indicado para a produção de gorduras saudáveis (DOGAN, JAVIDIPOUR e AKAN, 2007). Na reação de interesterificação os ácidos graxos permanecem inalterados, mas ocorre a redistribuição dos mesmos nas moléculas dos triacilgliceróis, resultando na modificação da composição triacilglicerídica, cuja característica final é totalmente determinada pela composição total em ácidos graxos das matérias-primas iniciais (ROZENDAAL e MACRAE, 1997).

Recentemente, o FDA revogou o status considerado seguro para óleos parcialmente hidrogenados, que se tornou a principal fonte de ácidos graxos *trans* da dieta. Assim, a interesterificação tem recebido muita atenção na indústria do óleo comestível como substituto da hidrogenação. Sendo uma reação de rearranjo na molécula de glicerol sem alterar o perfil de ácidos graxos. Os dois tipos de interesterificação são: química e enzimática (RASHID, KAMARULZAMAN e OMAR, 2018).

Ao contrário do que ocorre na hidrogenação, a interesterificação não promove a isomerização dos ácidos graxos *cis* para *trans*, pois os ácidos graxos não são modificados, mas sim redistribuídos nas ligações éster do glicerol, criando novas estruturas. Desta forma, a interesterificação é uma alternativa à hidrogenação parcial para obter produtos livres de ácidos graxos *trans*, com aplicações em margarinas e substitutos de manteiga de cacau (LIU e LAMPERT, 1999; SONNTAG, 1982). Podendo ser aplicada por diversas razões: para influenciar o comportamento de fusão, fornecendo consistência desejada a temperaturas ambiente e de refrigeração, para melhorar ou modificar o comportamento cristalino, de forma a facilitar os processos de produção e para diminuir a tendência à recristalização durante a vida útil do produto (ROZENAAL, 1992).

A interesterificação enzimática de um processo catalisado por lipase tem várias vantagens sobre a química. Este processo é mais específico, especialmente com o uso de lipase 1,3-específica, resultando em gorduras personalizadas que têm propriedades físicas e nutricionais desejadas. A interesterificação química é normalmente realizada na faixa de temperatura entre 70 e 120°C enquanto a enzimática é realizada a baixas temperaturas (55 a 70°C), o que gera redução de custos e de energia. Além disso, gera uma maior estabilidade do ácido graxo à oxidação. Assim, interesterificação enzimática é mais aceitável para os consumidores preocupados com a saúde (NOOR *et al.*, 2015). Além disso, as enzimas não são perigosas para o ambiente nem perigoso manusear em comparação com produtos químicos (Chen *et al.*, 2007).

3.4 Quantificação dos ácidos graxos *trans*

Devido a relevância do teor de AGT, a sua determinação de maneira rápida e confiável é altamente relevante e de grande importância para a caracterização química e controle de qualidade de alimentos processados. O método versátil e oficial e clássico para análise de ácidos graxos é a cromatografia em fase gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID). O GC-FID é amplamente utilizado devido à sua precisão, conveniência e sensibilidade (DODDS *et al.*, 2005; DOWNS, THOW e LEEDER, 2013; FDA, 2015; KHAN, HASSAN e RAUF, 2017; ROBERTS *et al.*, 2008).

Diferentes áreas da ciência têm utilizado as avaliações qualitativas e quantitativas de ésteres de ácidos graxos (EAG) em estudos de diferentes componentes lipídicos. A formação destes EAG ocorre, comumente, da reação entre óleos e gorduras (lipídios) com monoalcoóis de cadeia curta, como o metanol ou o etanol, os quais fornecem respectivamente o grupo metil

e etila, Quando a reação é com o metanol, formam-se os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG). Quando a reação é com o e etanol, formam-se os ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG) (SUAREZ, 2007a; SUAREZ, 2007b).

Os ácidos graxos têm polaridade relativamente alta, sendo geralmente derivados em EMAG correspondentes, que são derivados não-polares (RUIZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2010). As amostras podem ser usadas diretamente ou após a extração de gordura. Devido a sua elevada reatividade e polaridade do produto final os EMAG's são preferidos em detrimento aos EEAG's nas determinações químicas. A rota de produção dos EMAG's a partir dos componentes lipídicos pode ser de diferentes tipos, todavia, devido aos baixos custos são prioritariamente utilizadas aqueles que fazem uso de ácidos e bases de Bronsted-Lowry. A esterificação é realizada na maioria das vezes com hidróxido de sódio metanólico (RICHTER *et al.*, 2009; WAGNER *et al.*, 2008) ou metóxido de sódio metanólico (também chamado metilato de sódio), embora o hidróxido de potássio metanólico também tenha sido utilizado (SAUNDERS *et al.*, 2008).

3.4.1 Preparo da amostra

A determinação quantitativa de AGT em níveis muito baixos, como nos óleos vegetais, não é um procedimento simples. As concentrações destes ácidos estão, normalmente, abaixo de 2% e os teores obtidos são, muitas vezes, utilizados na avaliação do processamento ou como critério de rejeição de produto nas transações comerciais. A determinação do AGT por cromatografia em fase gasosa requer a otimização dos parâmetros analíticos como: tipo e temperatura da coluna; quantidade de amostra injetada; bem como, parâmetros de processamento dos picos (VAN BRUGGEN *et al.*, 1998).

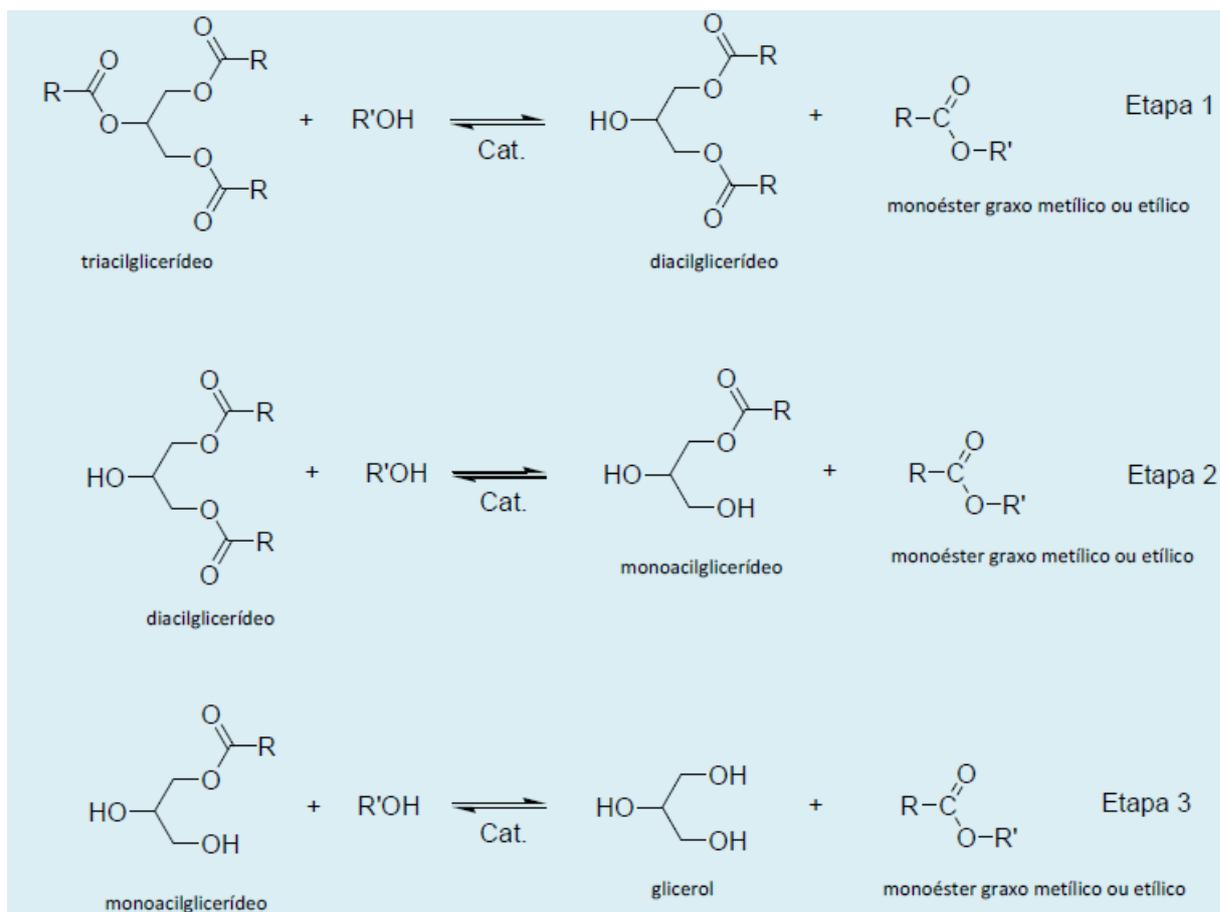
A análise de ácidos graxos em alimentos por cromatografia em fase gasosa requer o uso de procedimentos de preparo de amostras. O que envolve o uso da extração lipídica seguida da obtenção dos ésteres metílicos a partir dos triglicerídeos por reações de esterificação e/ou transesterificação, isto se faz necessário, devido às altas temperaturas de ebulição das substâncias envolvidas (ácidos graxos, triacilgliceróis, fosfolipídios entre outros) (EDER, 1995; ULBERTH e SCHRAMMEL, 1995; SEPPÄNEN *et al.*, 2002). Após a conversão destes compostos para ésteres metílicos, há a redução no ponto de ebulição, o que promove sua volatilização, permitindo a resolução cromatográfica (RUIZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2010). Vários aspectos, incluindo o tipo de catalisador (alcalino ou ácido), razão molar álcool/óleo vegetal, temperatura, pureza dos reagentes (principalmente teor de água) e

conteúdo de ácidos graxos livres tem influência sobre a transesterificação (FREEDMAN, BUTTERFIELD e PRYDE, 1986).

Métodos de esterificação são geralmente divididos em duas categorias: catálise ácida e de catálise básica. Os reagentes mais usados na esterificação por catálise ácida são: ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico (H₂SO₄) e trifluoreto de boro (BF₃) em metanol (CH₃OH) (METCALFE e WANG, 1981; MEHER *et al*, 2006). Normalmente, a transesterificação por catálise básica dos triacilglicerídeos é realizada em presença de metanol como agente de alcoólise, pois a reação ocorre com maior eficácia na presença desse álcool (MENEGHETTI *et al.*, 2009). A transesterificação catalisada por base em óleos vegetais é mais rápida que a reação catalisada por ácido (FREEDMAN, BUTTERFIELD e PRYDE, 1986).

O mecanismo da reação de transesterificação ocorre em três etapas consecutivas e reversíveis, nas quais são formados os ésteres, diacilglicerídeos e monoacilglicerídeos como intermediários (Figura 6). Apesar da estequiometria geral da reação requerer três mols do álcool para cada mol de triacilglicerídeo, a reversibilidade das reações envolvidas faz com que seja necessário o emprego de um excesso de álcool ao meio reacional para promover um aumento no rendimento em ésteres (AUED-PIMENTEL, 2007; MENEGHETTI, MENEGHETTI e BRITO, 2013).

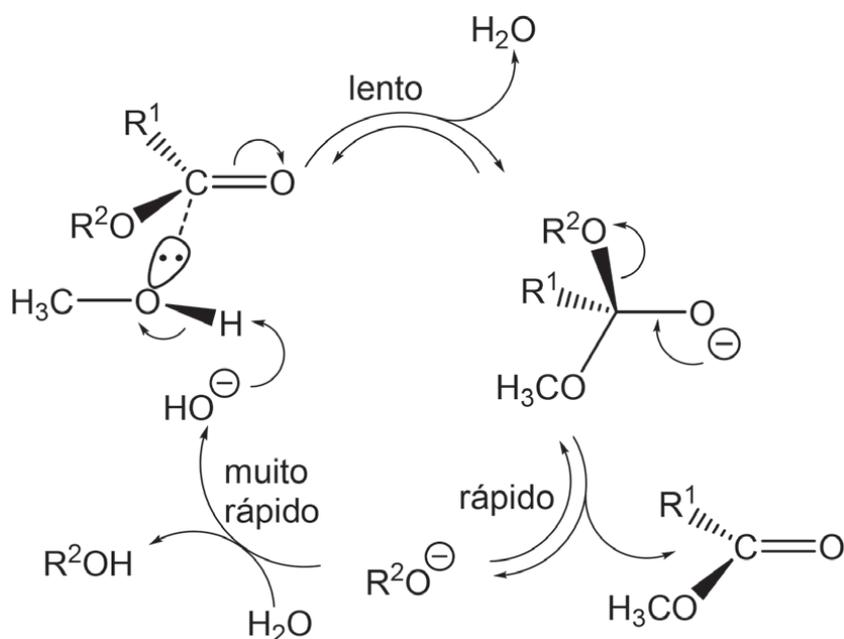
Figura 6. Etapas reacionais envolvidas na transesterificação de triacilglicerídeos (MENEGETTI, MENEGETTI e BRITO, 2013).



A transesterificação em meio básico ocorre em condições de temperaturas mais amenas e tempo reduzido. Além disso, ocorre satisfatoriamente com excesso de álcool e na ausência de água (AUED-PIMENTEL, 2007). A escolha do procedimento depende de características como porcentagem de acidez e umidade. Para lipídios com menor acidez e umidade máxima de 1%, metodologias de catálise alcalina são recomendadas, pois são mais rápidas, mais econômicas e não utilizam aquecimento (ISO, 2000).

No mecanismo da substituição nucleofílica em derivados de ácidos carboxílicos é bem conhecido que a formação do intermediário tetraédrico é a etapa lenta da reação em duas etapas (adição e eliminação) conforme apresentado na Figura 7. Assim, uma primeira etapa concertada de pseudo primeira ordem opera no ciclo catalítico onde o álcool é o solvente da reação, com a participação do catalisador HO^- , e exclui a participação de metóxido como nucleófilo. Ou seja, na catálise básica, o nucleófilo que ataca a carbonila é o próprio metanol, que atua como o solvente da reação com a participação do catalisador HO^- (Cunha *et al.*, 2018).

Figura 7. Ciclo catalítico do mecanismo da transesterificação com CH₃OH como solvente e catálise básica por hidróxido (Cunha *et al.*, 2018).



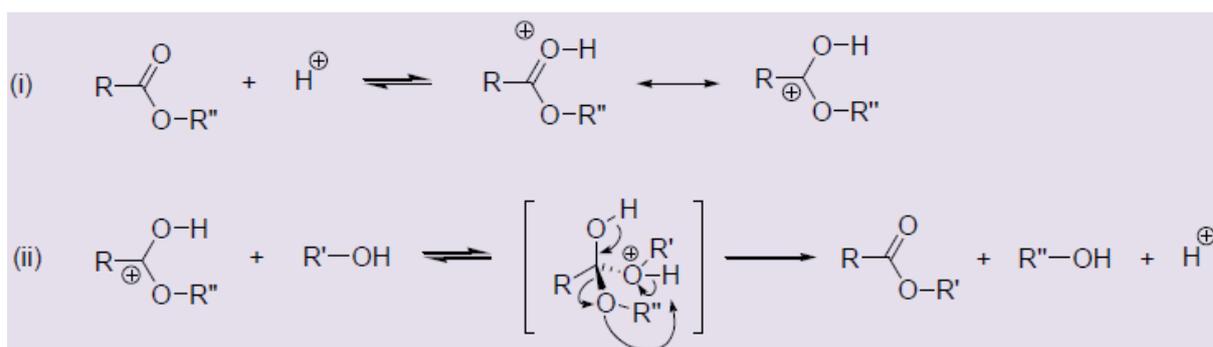
A esterificação/transesterificação proposta por Hartman e Lago (1973), modificada posteriormente por Maia e Amaya (1993), é amplamente utilizada e propõe o uso de reações de saponificação com ácidos graxos (catálise alcalina), seguidas de esterificação/transesterificação (catalase ácida). No entanto, este procedimento tem a limitação de que as amostras de ácidos graxos polinsaturados podem facilmente sofrer degradação lipídica, principalmente devido ao uso de altas temperaturas (PÉREZ-PALACIOS *et al.*, 2008; KEBEDE *et al.*, 2013). Além disso, pode ocorrer isomerização de ácidos graxos insaturados, principalmente os conjugados, quebra de grupamentos reativos como os grupos ciclopropenídicos (CHRISTIE, 1993; CHRISTOPHERSON e GLASS, 1969; KRAMER *et al.*, 1997).

Os reagentes mais utilizados na esterificação de ácidos graxos por catálise básica são soluções metanólicas de metóxido de sódio (NaOCH₃), hidróxido de potássio (KOH) e hidróxido de sódio (NaOH). Os métodos básicos de catálise de esterificação são rápidos e podem ser realizados à temperatura ambiente, reduzindo do risco de decomposição de ácidos graxos polinsaturados (BANNON *et al.*, 1982b; GLASS, 1971; GUTNIKOV, 1995).

Na Figura 8, é mostrado o mecanismo aceito para a reação de transesterificação de triacilgliceróis com alcoóis em meio ácido. Uma carbonila, por exemplo, de um triacilglicerídeo, sofre um ataque eletrofílico do H⁺, conforme a reação (i), formando um

carbocátion. A seguir, este carbocátion sofre um ataque nucleofílico de uma molécula do álcool, formando um intermediário tetraédrico. Então, ocorre a formação de, neste caso, um diacilglicerídeo e um éster graxo, juntamente com a regeneração da espécie H^+ . Por processos semelhantes serão formados os monoacilglicerídeos e glicerol (MENEGHETTI, MENEGHETTI e BRITO, 2013; SCHUCHARDT, SERCHELI e VARGAS, 1998).

Figura 8. Mecanismo de transesterificação de triglicerídeos em meio ácido (MENEGHETTI, MENEGHETTI e BRITO, 2013).



Os procedimentos oficiais para preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, recomendados pela AOAC e AOCS (AOAC, 2005; AOCS, 2005) utilizam como catalisador BF_3 em metanol, que apresenta a desvantagem de ser tóxico, instável e pode provocar a formação de produtos secundários, além da reação necessitar de aquecimento (CHRISTIE, 1993).

O método IUPAC 2.301 e o método alternativo de esterificação da AOCS Ce 2-66, que emprega KOH metanólico como reagente de esterificação (IUPAC, 1987; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), apresentam restrições para sua aplicação na análise da gordura dos alimentos, pois não esterifica ácidos graxos livres; também, pode levar à formação destes ácidos por hidrólise, além de não esterificar a gordura de amostras com elevado teor de acidez (CHRISTIE, 1993; CHRISTOPHERSON e GLASS, 1969; KRAMER *et al.*, 1997). Contudo, para amostras de óleos vegetais refinados, que contêm essencialmente triacilgliceróis e são praticamente isentas de ácidos graxos livres, fosfolipídios e outros lipídios polares, a transesterificação alcalina tem sido recomendada devido à simplicidade e rapidez (CHRISTOPHERSON e GLASS, 1969; RATNAYAKE, 2004).

MILINSK *et al* (2011) efetuaram a comparação dos diferentes métodos de esterificação que envolvem catálises ácidas e básicas na determinação quantitativa de EMAGs em azeite de oliva. Os métodos selecionados foram descritos por Metcalfe, 1966 (MET);

Bannon, 1982 (BAN); Joseph e Ackman, 1992 (JAC); Hartman e Lago, 1973 (HLA). Os resultados mostraram a eficiência dos métodos de esterificações para os principais ácidos graxos saturados presentes no azeite de oliva analisado. Os métodos mais eficientes para a esterificação de ácidos graxos insaturados nos óleos analisados foram JAC, ISO e BBA. O método ISO é o mais simples e menos tóxico. Trata-se de uma catálise básica com uso de NaOH e n-heptano.

Um ponto importante a se considerar é a toxicidade dos solventes que são empregados nos métodos convencionais de extração de gordura e transesterificação. As legislações de proteção ambiental e de biossegurança têm previsto a redução na utilização de solventes tóxicos e exigido o descarte adequado (Ministério da Saúde, 2004). A Tabela 5 apresenta algumas constantes físicas destes solventes e aspectos sobre toxicidade.

Tabela 5. Propriedades físicas e aspectos de toxicidade de alguns solventes orgânicos empregados na extração de lipídios dos alimentos.

| Solvente | PE, °C^b | Constante dielétrica (25°C) | Toxicidade^{a,b} |
|-----------------|---------------------------|------------------------------------|--|
| n-hexano | 69 | 1,89 | Alta Irritante para vias áreas superiores, pele e olhos. Possivelmente carcinogênico para o homem, podendo também causar defeitos genéticos ^c . |
| n-heptano | 97 | 1,90 | Baixa Irritante para vias áreas superiores e pele. |
| Tolueno | 111 | 2,38 | Alta Irritante para olhos e pele. Depressor do sistema nervoso central (SNC). |
| Éter etílico | 35 | 4,33 | Média Irritante para os olhos e sistema respiratório. Pode afetar SNC. |
| Clorofórmio | 61,7 | 4,81 | Alta Nocivo quando inalado, ingerido ou em contato com a pele. Possivelmente carcinogênico para o homem ^c . |

| | | | | |
|------------|------|-------|-------|---|
| Iso-octano | 99 | 1,94 | Média | Irritante para a pele e olhos. Pode ser mortal por ingestão e penetração nas vias respiratórias. |
| Acetona | 56,5 | 20,7 | Baixa | Levemente irritante para olhos, nariz e garganta. A inalação pode causar tontura, narcose e coma. |
| Metanol | 65 | 32,63 | Alta | Nocivo quando inalado, ingerido ou em contato com a pele. Afeta SNC. |

^aOMS, 2004; ^bThe Merck Index, 1996; Carpenter *et al* (1993); IARC, 2006.

Uma análise da Tabela 5, demonstra que, apesar da maioria dos solventes apresentarem elevada toxicidade, no caso do metanol o mesmo é utilizado para as reações de transesterificação e ainda é o mais utilizado por apresentar maior rendimento químico. Os solventes n-heptano e n-hexano podem atuar na recuperação dos ésteres metílicos em função do seu caráter apolar.

3.4.2 Cromatografia em fase gasosa

A base para a separação dos analitos na cromatografia em fase gasosa é a partição da amostra no estado de vapor entre duas fases, uma fase estacionária (FE) (sólida ou líquida) e uma fase gasosa móvel. Na separação de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) haverá diferentes afinidades com a FE, de acordo com a estrutura química de cada componente, isto é, número de insaturações, polaridade, presença de isomeria (geométrica ou de posição) ou de grupamentos na cadeia carbônica. Para esta separação, as fases estacionárias mais adequadas são de polímeros polares como poliésteres (Carbowax 20M) e cianossiliconas (SP 2340, SP 2560). Os componentes terão tempos de eluição da coluna, ou tempos de retenção diferenciados. O tempo de retenção é característico para determinado composto em uma FE, em condições padronizadas de análise (AUED-PIMENTEL, 2007).

Após a separação, na coluna cromatográfica, os componentes são direcionados ao sistema de detecção. Na análise de EMAG, normalmente, é empregado um detector de ionização de chama. Os componentes da amostra são queimados originando uma corrente de íons os quais são coletados e transformados em sinais elétricos e registrados como picos. Estes detectores emitem sinais para compostos orgânicos voláteis. O sistema de cromatografia

em fase gasosa emprega N₂, H₂ ou He como gás de arraste; possuem alta sensibilidade e ampla faixa de resposta linear (LANÇAS, 2009).

Métodos de cromatografia em fase gasosa têm progredido graças à evolução das colunas analíticas. A evolução das colunas de vidro para as colunas capilares contribuiu para uma excelente resolução de sinais, especialmente no que se refere à separação dos isômeros *cis/trans* (ALBUQUERQUE *et al.*, 2011). Sébédio e Ratnayake (2008) desenvolveram vários métodos melhorados de CG em colunas altamente polares, como a CPSil 88 de 100m ou equivalente, no entanto, uma separação completa dos sete isômeros geométricos do ácido linolênico ainda não pode ser alcançada. Na verdade, a separação individual de cada isômero é essencial para uma quantificação ótima de AGT em vários alimentos e para prevenir qualquer risco de sub ou superestimação devido ao método. Portanto, desenvolvimentos futuros para simplificar e melhorar o atual procedimento de CG terá grande necessidade para atender à diversidade de produtos alimentares.

A análise dos isômeros *cis* e *trans* originam, em geral, os melhores resultados quando realizada usando colunas capilares de 100 m (KIM *et al.*, 2008; LEE *et al.*, 2008; SANDERS *et al.*, 2008; WIJESUNDERA *et al.*, 2007), flexíveis de sílica fundida tendo como fase estacionária o cianopolisiloxane altamente polar, visto que são capazes de separar isômeros geométrico e posicional de AGT. A utilização de colunas mais longas reduz o risco de sobreposição de isômeros (DIJKSTRA *et al.*, 2008).

A separação de EMAG por cromatografia em fase gasosa é realizada com base no comprimento da cadeia de ácido graxo, número de ligações duplas e sua configuração geométrica *cis* e *trans* (MOSSOBA e KRAMER, 2009). As separações cromatográficas são otimizadas através de estudos das condições da temperatura do forno (isoterma ou programa de temperatura), fluxo e natureza do gás de arraste (H₂ ou He), tipo, fase estacionária e comprimento da coluna capilar. Fases estacionárias polares como cianopropilsiloxano (CPS) são comumente usadas para a separação da maioria dos isômeros posicionais e geométricos dos EMAG, sendo encontradas no mercado como SP-2560 (SUPELCO, Bellefonte, PA, Estados Unidos) e CP-Sil 88 (Agilent J&W, Santa Clara, CA, Estados Unidos) (AHMAD, 2017).

Conforme Tabela 6, o método AOCS ce 1h-05 da American Oil Chemists' Society (AOCS) para a determinação dos isômeros *trans* de AG em óleos e gorduras requer o uso de coluna de 100 m SP-2560 (SupelcoInc.) ou coluna capilar CP-Sil 88 (VarianInc.) operando isotermicamente a 180°C. Estas condições maximizam a resolução de isômeros de C18:1, C18:2 e C18:3 que, geralmente, se encontram em óleo vegetal parcialmente hidrogenados

com uso de padrão interno (IS) 21:00 para fins quantitativos (RATNAYAKE *et al*, 2006). No entanto, apesar do sucesso da coluna altamente polar de 100 m com fase de cianopropilsiloxano para a separação de AGT, existem limitações relacionadas a co-eluições e dificuldades de separação para ácidos graxos C16:1, C18:1, C18:2, C20:1 e C18:3 (KRAMER *et al*, 2008).

Tabela 6. Métodos oficiais para análise de ácidos graxos *trans* por GC-FID.

| Método Oficial | Matrizes aplicáveis | Coluna GC | Programação de temperatura | Gás de arraste |
|----------------|--|--|--|----------------------|
| AOAC 996.01 | Cereais | Coluna capilar (100% dimetilpolisiloxano), 30 m x 0,25 mm ID, Rtx 233 | 120°C por 4 min, rampa de 5°C.min ⁻¹ até 230°C, manter por 5 min | He |
| AOAC 996.06 | Alimentos em geral | Coluna de sílica fundida CPS 100 m x 0,25 mm ID, filme de 0,2µm, SP-2560 | 100°C por 4 min, rampa de 3° C.min ⁻¹ até 240°C, manter por 15 min | He |
| AOAC 2012.13 | Produtos lácteos, fórmulas infantis, fórmula nutricional adulto e pediátrica | Coluna de sílica fundida CPS 100 m x 0,25 mm ID, filme de 0,2µm, SP-2560 e CP-Sil 88 | 60°C por 5 min, rampa de 15° C.min ⁻¹ até 165°C, manter por 1 min. Rampa de 2° C.min ⁻¹ até 225°C, manter por 20 min | He ou H ₂ |
| AOCS ce 1h-05 | Óleos e gorduras vegetais, fontes não-ruminantes | Coluna de sílica fundida CPS 100 m x 0,25 mm ID, filme de 0,2µm, SP-2560 e CP-Sil 88 | Isoterma 180°C por 65 min | He ou H ₂ |
| AOCS ce 1i-07 | Óleos marinhos e outros contendo ácidos graxos polinsaturados | Coluna de sílica fundida PEG 30 m x 0,25 mm ID, filme de 0,2µm, Suplecowax-10, FAMEWAX, HP-INNOWax, CP-Wax, Carbowax 20M, Omagawax 320 | 170°C por 5 min, rampa de 1° C.min ⁻¹ até 225°C, manter em 225°C é usado para EMAG de cadeia longa (>C25:0) | He ou H ₂ |
| AOCS ce 1j-07 | Gorduras extraídas | Coluna de sílica fundida CPS 100 m x 0,25 mm ID, filme de 0,2µm, SP-2560 e CP-Sil 88 | Isoterma 180°C por 32 min. Rampa de 20° C.min ⁻¹ até 215°C. Manter por 31 min. | He ou H ₂ |

Tabela 7. Métodos Cromatográficos para determinação de ácidos graxos *trans*.

| Analito | Transesterificação | Condições de Análise | LQ | Referência |
|---|--|--|---|---------------------------------|
| Ácidos graxos <i>cis</i> e <i>trans</i> | Uso de metóxido de sódio e n-hexano | GC-FID. Coluna: capilar sílica fundida BPX-70 - 30 m Programação: 100°C, a 10°C.min ⁻¹ até 160°C e a 3°C.min ⁻¹ até 220°C por 5 min, 10° C.min ⁻¹ até 260°C por 5 min. Injetor e Detector: 260 e 280°C, gás carreador: He (1 mL.min ⁻¹). Split 30:1. | 0,10 a 0,20 µg/mL (C18:1, C18:2 e C18:3) | Salimon <i>et al.</i> (2017) |
| Ácidos graxos <i>cis</i> e <i>trans</i> | Uso de metóxido de sódio e n-hexano | GC-FID. Coluna: capilar CP-Sil88 - 100 m Programação: 45°C por 4 min, 13°C/min para 175°C, 4°C/min a 215°C. Injetor e Detector: 250°C, gases: H ₂ , ar e N ₂ foram 30,0 m/ min. | Não declarado | Huang <i>et al.</i> (2016) |
| Ácido oléico e ácido elaídico | AOCS Ce 1j-07 (BF ₃ 14% em metanol) | GC-FID. Coluna: capilar SP-2560, 100 m Programação: 180°C por 32 min, aumento para 240°C a 20°C/min. Por fim 240°C por 31,25 min. Injetor e Detector: 235 e 325°C, gás carreador: He (2 mL.min ⁻¹). Split 100:1. | Não declarado | Gotoh <i>et al.</i> (2018) |
| Ácidos graxos <i>trans</i> | ISO 12966-2 (2011) – KOH 2M em metanol | GC-FID. Coluna: CB - 50 m Programação: 140°C a 200°C por 40 min. Injetor e Detector: 250 e 270°C, gás carreador: He (1 mL.min ⁻¹). Split 100:1. | Não declarado | Costa <i>et al.</i> (2016) |

AHMAD (2017).

Conforme Tabela 7, Salimon *et al.* (2017) efetuaram a extração de lipídios nas amostras de alimentos combinado à derivatização utilizando NaOCH₃ e n-hexano. A quantificação dos AGT's foi realizada em GC-FID com coluna capilar de sílica fundida de 30 m. Os autores obtiveram resultados satisfatórios com este método de derivatização e produziu adequada preparação de EMAG para análise em GC, incluindo AGT's, sem ter que fazer separações auxiliares. DELMONTE *et al.* (2011) avaliaram a coluna capilar SLB-IL111 (Supelco Inc.) comparando com as colunas de siloxanocianopropilo altamente polares, atualmente recomendadas para a separação dos isômeros *cis* e *trans* de ácidos graxos e comercializadas como SP-2560 e CP-Sil 88. A coluna foi SLB - IL111 operada em modo isotérmico a 168°C, com hidrogênio como gás de arraste a vazão de 1,0 mL/min proporcionou uma melhor separação dos ácidos graxos *trans*.

Weatherly *et al.* (2016) testaram quatro colunas líquidas iônicas (IL), SLB-IL59, SLB-IL60, SLB-IL65 e SLB-IL111, para avaliar qual a análise mais rápida para quantificação de ésteres metílicos de ácidos graxos como omega-3, omega-6, isômeros posicionais adicionais e misturas de éster e ácidos graxos isômeros encontrados no óleo de peixe, óleo de linhaça e composições potencialmente mais complexas. As colunas IL estruturalmente distintas proporcionaram tempos de retenção mais curtos e picos simétricos para os ésteres etílicos ou metílicos de ácidos graxos, do que uma coluna convencional de polietileno glicol (PEG). A resolução de ésteres de ácidos graxos é importante para alimentos e suplementos complexos, onde diferentes formas de ácidos graxos podem ser incorporadas. As eficiências médias dos modelos SLB-IL60 e SLB-IL111 são maiores que as demais estudadas, esta última mantendo a eficiência mesmo com seus tempos de retenção consideravelmente menores. Neste mesmo trabalho, além do estudo da eficiência da coluna, os autores determinaram através dos detectores de ionização de chama (FID) e o de detector de absorção na região do ultravioleta à vácuo (UV) forneceram uma sistemática melhoria da resolução possibilitando determinar misturas altamente complexas, ou seja, os isômeros (*isômeros cis e trans*).

O método oficial 996.06 da AOAC, conforme Tabela 6, envolve a extração de gordura do alimento por hidrólise tipo Monjonier, que causa uma completa quebra da matriz do alimento, seguida da extração etérea, transesterificação do ácido graxo para os seus ésteres metílicos, usando BF₃ em metanol e quantificação por cromatografia em fase gasosa capilar. Para laticínios é feita a hidrólise alcalina com hidróxido de amônio, para queijos hidrólise alcalina e hidrólise ácida. Para os demais tipos de alimentos utiliza-se a hidrólise ácida com HCl. Ácidos graxos individuais são calculados em relação ao padrão interno (C11:0) e cada

ácido graxo é convertido para seu triglicerídeo equivalente e somados para dar o total de gordura (AOAC, 2005a).

AUED-PIMENTEL (2007) analisou diversos alimentos utilizando diferentes procedimentos para a determinação de lipídios ou gordura total (GT), ácidos graxos saturados (AGS), polinsaturados (AGP) e *trans* (AGT). O teor de GT dos alimentos foi também determinado a partir da composição de ácidos graxos obtida por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) conforme método AOAC 996.06 (ou 996.01), com modificações. A autora concluiu que o método AOAC 996.06, para extração e quantificação de GT, AGS e AGT por GC-FID, revelou exatidão e precisão satisfatórias (CV <5% para analitos em concentração acima de 1%), rapidez e emprego de solventes de baixa toxicidade e em menor volume, sendo uma metodologia viável a ser adotada no Brasil para fins de rotulagem nutricional.

Os estudos mais recentes revelam que os reagentes mais utilizados na esterificação de ácidos graxos por catálise básica são soluções de hidróxido de potássio e metóxido de sódio. Os métodos podem ser realizados à temperatura ambiente, reduzindo o risco de decomposição de ácidos graxos polinsaturados e evitando o uso de um agente antioxidante. Em termos de métodos de cromatografia gasosa com utilização de detector de ionização de chama, a evolução na análise de ácidos graxos em alimentos se deve muito às inovações das colunas analíticas, principalmente quanto aos tipos de fases estacionárias que estão diretamente relacionadas com a melhoria no poder de separação.

A análise dos isômeros *cis* e *trans*, geralmente, demonstra melhores resultados quando realizada em colunas de 100 m (LEE *et al.*, 2008; SAUNDERS *et al.*, 2008; WIJESUNDERA *et al.*, 2007), flexíveis, do tipo capilar de sílica fundida revestidas com fases estacionárias de cianopolissiloxano altamente polares, uma vez que eles são capazes de separar os isômeros geométricos e posicionais de ácidos graxos. O uso de colunas mais longas reduz o risco de sobreposição de isômeros (DIJKSTRA *et al.*, 2008). De acordo com RATNAYAKE, HANSEN e KENNEDY (2006), o uso de hidrogênio reduz o tempo de execução, origina uma melhor resolução dos isômeros *trans* e picos mais nítidos, quando comparado ao hélio.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais

4.1.1 Amostras

As amostras dos óleos de canola e soja foram adquiridas das marcas: Liza®, Salada®, Soya® e Purilev®, em mercados locais e foram coletadas de maneira aleatória em Salvador, Bahia, sendo os vasilhames retirados do fundo das gôndolas visando minimizar a influência da luz no estudo, visto que este é também um fator importante na oxidação lipídica. Com o intuito de minimizar a heterogeneidade natural existente entre as diferentes marcas de óleo, foram preparadas amostras compostas de cada óleo a partir de três marcas comerciais, na mesma proporção e foram armazenadas em frascos de vidro âmbar com tampa rosqueável. A cada abertura do frasco, fazia-se passar nitrogênio puro sobre a superfície do óleo contido no frasco, a fim de remover o ar. Ao final foram preparadas 12 amostras compostas de cada tipo de óleo.

4.1.2 Solventes, reagentes e padrões

Os reagentes utilizados para a transesterificação foram: hidróxido de potássio, PA (Merck, $\geq 99,9\%$), cloreto de sódio, PA (Merck, 99%). Os solventes utilizados foram: n-hexano, grau HPLC (Merck, Lichrosolv, $\geq 98\%$), n-heptano, grau HPLC (Merck, Lichrosolv, $> 99\%$), Iso-octano, grau HPLC (Merck, $\geq 99,8\%$), metanol, PA (Panreac, 99,96%) e álcool etílico, PA (Synth, 99%). Os sais dos metais utilizados no aquecimento: cloreto de ferro III, PA (Synth, 98%), cloreto de cobre II, PA (Synth, 98%). Para a análise de metais utilizou-se HNO_3 65%, m m⁻¹ (Merck, Alemanha), purificado em destilador de ácidos (Milestone, sub-boiling distillation), peróxido de hidrogênio, H_2O_2 30% v v⁻¹ (Merck, Alemanha), água deionizada, com resistividade específica de 18,2 M Ω cm⁻¹, de um sistema de purificação Milli-Q (ELGA, Purelab, Option- Q).

Para as análises de cobre e ferro foram utilizadas: solução padrão de Ferro 1000 mg L⁻¹ (997 mg L⁻¹ \pm 5 mg L⁻¹) – SPECSOL, Campinas, Brasil e solução padrão de Cobre 1000 mg L⁻¹ (1000 mg L⁻¹ \pm 4 mg L⁻¹) – SPECSOL, Campinas, Brasil

Padrões individuais e misturas com teores certificados de EMAG foram utilizados para identificar os componentes das amostras e determinar os fatores de correção de resposta do detector de ionização de chama. Os materiais de referência certificados foram os seguintes:

- Padrão com mistura de 14 EMAG, variando de 8:0 a 24:0 (Supelco 18918), com concentrações certificadas de cada componente (Tabela 8).

Tabela 8. Padrão com mistura de 14 EMAG variando de 4:0 a 24:0, com percentuais em massa aproximadas de cada isômero.

| Componente | EMAG | % massa |
|--|------------------------------|---------|
| Palmitato de metila | (C16:0) | 11 |
| Octanoato de metila | (C8:0) | 8 |
| Decanoato de metila | (C10:0) | 8 |
| Dodecanoato de metila | (C12:0) | 8 |
| Miristato de metila | (C14:0) | 8 |
| Estearato de metila | (C18:0) | 8 |
| Araquidato de metila | (C20:0) | 8 |
| Behenato de metila | (C22:0) | 8 |
| Tetracosanoato de metila | (C24:0) | 8 |
| Palmitoleato de metila | (C16:1, <i>cis</i> -9) | 5 |
| Oleato de metila | (C18:1, <i>cis</i> -9) | 5 |
| <i>Cis-cis</i> -Linoleato de metila | (C18:2, <i>cis</i> -9,12) | 5 |
| <i>Cis-cis-cis</i> -Linolenato de metila | (C18:3, <i>cis</i> -9,12,15) | 5 |
| <i>cis</i> -13-docosenoato de metila | (C22:1, <i>cis</i> -13) | 5 |

- Padrão com mistura de 14 EMAG isômeros *cis-trans* do ácido linoleico (C18:2) (Sigma-Aldrich 47791) – 10 mg mL⁻¹, com a concentrações mostradas na Tabela 9;

Tabela 9. Padrão com mistura de 14 EMAG de ésteres metílicos de isômeros *cis(c)/trans(t)* do ácido linoleico (C18:2), com percentuais em massa aproximadas de cada isômero.

| Componente | EMAG | % massa |
|---|----------------------------------|---------|
| <i>Trans-trans</i> -linoleato de metila | (C18:2 9 <i>t</i> ,12 <i>t</i>) | 50 |
| <i>Cis-trans</i> -linoleato de metila | (C18:2 9 <i>c</i> ,12 <i>t</i>) | 20 |
| <i>Trans-cis</i> -linoleato de metila | (C18:2 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i>) | 20 |
| <i>Cis-cis</i> -linoleato de metila | (C18:2 9 <i>c</i> ,12 <i>c</i>) | 10 |

- Padrão com mistura de 14 EMAG isômeros *cis-trans* do ácido linolênico (18:3) (Sigma-Aldrich 47792) – 10 mg L⁻¹ conforme Tabela 10;

Tabela 10. Padrão com mistura de 14 EMAG isômeros *cis* (c)/*trans* (t) do ácido linolênico (C18:3) (Sigma-Aldrich 47792), com percentuais em massa aproximadas de cada isômero.

| Componente | EMAG | % massa |
|---|-------------------|---------|
| <i>Trans-trans-trans</i> linolenato de metila | (18:3 9t,12t,15t) | 30 |
| <i>Trans-trans-cis</i> -linolenato de metila | (18:3 9t,12t,15c) | 15 |
| <i>Trans-cis-trans</i> -linolenato de metila | (18:3 9t,12c,15t) | 15 |
| <i>Cis-cis-trans</i> -linolenato de metila | (18:3 9c,12c,15t) | 15 |
| <i>Cis-trans-trans</i> -linolenato de metila | (18:3 9c,12t,15t) | 7 |
| <i>Cis-trans-cis</i> -linolenato de metila | (18:3 9c,12t,15c) | 7 |
| <i>Trans-cis-cis</i> -linolenato de metila | (18:3 9t,12c,15c) | 7 |
| <i>Cis-cis-cis</i> -linolenato de metila | (18:3 9c,12c,15c) | 3 |

Padrões individuais (Sigma-Aldrich, com pureza ≥99%):

- Oleato de metila (C18:1, 9c 18918 – SUPELCO) (C18:1) - 46902-U a 10 mg/mL;
- *Trans*-elaidato de metila (C18:1, 9t 46903 – SIGMA) (C18:1 9t) – 46903 a 10 mg/mL;
- Ácido linoleico puro (SIGMA L1376) com pureza ≥99%.

As preparações das soluções padrão para a calibração foram feitas a partir de diluições dos padrões: mistura de 14 EMAG's, variando com cadeia de 8 a 24 carbonos (Supelco 18918), mistura de EMAG isômeros *cis-trans* do ácido linoleico (C18:2) (Sigma-Aldrich 47791), mistura de EMAG isômeros *cis-trans* do ácido linolênico (18:3) (Sigma-Aldrich 47792) e *trans*-9-ac. Octadecenóico metil éster (ácido elaídico) (C18:1 9t) – 46903 a 10 mg/mL

Para a mistura de 14 EMAG (Supelco 18918) foi preparada uma solução estoque de cada padrão a 1000 mg L⁻¹ a partir da dissolução de 0,050 g do padrão de alta pureza em n-hexano e ajuste do volume final para 50 mL em balão volumétrico e armazenada em freezer.

Para a mistura de EMAG isômeros *cis-trans* do ácido linoleico (C18:2) (Sigma-Aldrich 47791), mistura de EMAG isômeros *cis-trans* do ácido linolênico (18:3) (Sigma-Aldrich 47792) e *trans*-9-ac. Octadecenóico metil éster (ácido elaídico) (C18:1 9t) – 46903 a 10 mg mL⁻¹ o conteúdo de cada ampola (10 mg mL⁻¹) foi transferido, cuidadosamente, para vial de

1,5 mL para efetuar as diluições para preparo de curva de calibração com o solvente n-hexano.

Todas as soluções estoque preparadas foram armazenadas em balões volumétricos previamente condicionados com n-hexano e posteriormente vedados com tampa de vidro e fita teflon.

As soluções dos íons metálicos para acrescentar em 200 mL de óleo foram preparadas através da utilização dos sais: FeCl_3 e CuCl_2 . Foi preparada uma solução-mãe para cada íon na concentração de $0,5 \text{ g mL}^{-1}$ em etanol. Para Ferro, foi necessário pesar 1,45 g do reagente FeCl_3 PA e ajuste do volume final para 1000 mL em balão volumétrico. Para cobre, foi necessário pesar 1,06 g do reagente CuCl_2 PA e ajuste do volume final para 1000 mL em balão volumétrico.

Para análise dos metais utilizou-se dois padrões individuais de Cu e Fe: solução padrão de Ferro 1000 mg L^{-1} ($997 \text{ mg L}^{-1} \pm 5 \text{ mg L}^{-1}$) – SPECSOL, Campinas, Brasil e solução padrão de Cobre 1000 mg L^{-1} ($1000 \text{ mg L}^{-1} \pm 4 \text{ mg L}^{-1}$) – SPECSOL, Campinas, Brasil. A partir de cada solução padrão de metal a 1000 mg L^{-1} foi preparado cada ponto da curva de calibração de 0,1 a $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ diluindo em balões volumétricos de 100mL com HNO_3 0,2%.

É importante levar em consideração o grau de pureza oferecido por cada padrão e a forma correta de armazenamento, de modo a manter a confiabilidade dos resultados adquiridos.

4.1.3 Equipamentos e acessórios

No procedimento de análise das amostras de óleo de soja e canola foi utilizado Cromatógrafo a gás Varian modelo 450-G, acoplado com detector de ionização de chamas (FID), módulo EFC11, equipado com injetor *split/splitless* e sistema de aquisição de dados GALAXIE Versão 1.X (California, USA). A coluna instalada no cromatógrafo durante a realização das análises foi uma coluna capilar polar SLB-IL111, fase estacionária 1,5-di (2,3-dimetilimidazólio) pentano ($100 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$, $0,2 \mu\text{m}$), marca Supelco, Bellefonte, PA. O gás de arraste utilizado foi hidrogênio (99,9999%) da White Martins (Brasil). No procedimento de agitação foi utilizado Vortex Lab Dancer IKA (Brasil). A água ultrapura foi obtida do purificador Milli-Q modelo RiOS da Merck Millipore (Alemanha). Na preparação das soluções padrão utilizou-se balança analítica modelo AUW-220 da marca Shimadzu (Japão). Para análise dos metais foi utilizado forno de micro-ondas com cavidade (Microwave Digestion Labstation - ETHOS EZ - Milestone), com capacidade para 10 frascos de 100 mL

fabricados em TFM (PTFE modificado) e espectrômetro de Absorção Atômica com Chama (FAAS), modelo: Varian AA 220FS (Mulgrave, Victoria, Austrália).

4.2 Procedimento de otimização da transesterificação (preparo dos ésteres metílicos)

O método oficial de transesterificação - 055/IV Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos – Método 2, do guia de métodos físico-químicos para análise de alimentos do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008) foi adaptado de modo a se otimizar a concentração da solução de KOH, tempo de agitação, volume da solução saturada de NaCl e solvente n-heptano. A otimização foi feita de maneira univariada e utilizou-se as áreas dos picos de cada composto como respostas. As análises foram feitas em triplicata e com diluição de 1:100 depois da esterificação. Os analitos alvos foram os ésteres metílicos de ácido oleico, linoleico e linolênico do óleo de soja.

Para seleção da concentração da solução de KOH, foram preparadas soluções de KOH 1, 2 e 3 mol L⁻¹ em metanol para realização da transesterificação alcalina. Foram realizados experimentos com o objetivo de testar o efeito do tempo de agitação após a adição da solução de KOH e solvente para verificar variação nas áreas dos picos cromatográficos dos analitos. Os tempos de agitação testados foram 20, 30 e 40 s. A influência do efeito *salting-out* foi verificada testando-se a adição de 2,0, 3,0 e 4,0 mL de uma solução aquosa saturada em NaCl. Também se testou diferentes solventes orgânicos, considerando as indicações de métodos oficiais para esterificação: n-hexano (IAL), n-heptano (AOCS - American Oil Chemists Society - AOCS Official Method Ch 1-91 – 7ª edição - 2017), e iso-octano (Bannon *et al.*, 1982b). O volume de 2,0 mL de solvente, indicado no método padrão (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008) foi mantido.

O procedimento consistiu em: pesar cerca de 100 mg da amostra de óleo em tubo de centrifuga de 20 mL com tampa. Seguido da adição de 2 mL de n-hexano e 0,2 mL de solução metanólica de KOH 2 mol L⁻¹. Fechar o tubo e agitar no vórtex por 30 segundos. Adicionar 3 mL de solução saturada de cloreto de sódio. Deixar separar as fases e utilizar a fase superior para a análise por cromatografia em fase gasosa. Os ésteres metílicos foram analisados o mais rápido possível, evitando assim a perda dos ésteres mais voláteis.

4.3 Método cromatográfico e quantificação dos ácidos graxos

As condições a seguir de separação no cromatógrafo em fase gasosa, foram utilizadas conforme DELMONT *et al.* (2011):

- Rampa de aquecimento do forno da coluna: isoterma a 180°C por 35 min;
- Temperatura do injetor e detector: 250°C (Split – 1/100)
- Tipo de gás de arraste: H₂
- Vazão do gás de arraste: 1 mL/min
- Tempo de análise: 35 min.
- Volume de injeção: 1 µL.

A identificação dos picos foi realizada pela comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras com o tempo de retenção dos materiais de referência de ésteres metílicos de ácidos graxos ácidos graxos monoinsaturados e polinsaturados. A quantificação foi realizada por normalização da área e os resultados expressos em g/100 g, utilizando também o fator de diluição das amostras e fator de conversão de ésteres metílicos para ácidos graxos (Tabela 11).

O objetivo da análise quantitativa determinar seletivamente cada espécie presente na amostra analisada. Desta forma, a área do componente obtida no cromatograma foi relacionada com a concentração (AUED-PIMENTEL, 2007). Utilizou-se o método de calibração externa, através da injeção de soluções de várias concentrações de ésteres metílicos de ácido graxos e construiu-se gráficos relacionando concentração (mg L⁻¹) e área. Para expressão do resultado final, levou-se em conta o volume de sobrenadante da etapa de esterificação, fator de diluição e fator de conversão conforme Tabela 11 abaixo.

Tabela 11. Fatores de conversão de éster metílico de ácido graxo para ácido graxo (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

| Ácidos graxos | Fator de Conversão |
|-------------------------------------|---------------------------|
| C16:1 (ácido palmitoléico) | 0,948 |
| C17:0 (ácido margárico) | 0,951 |
| 17:1 (ácido heptadecenóico) | 0,950 |
| C18:0 (ácido esteárico) | 0,953 |
| C18:1 <i>cis</i> (ácido oleico) | 0,953 |
| C18:1 <i>trans</i> (ácido elaídico) | 0,953 |

| | |
|---|-------|
| C18:2 <i>cis</i> (ácido linoleico) | 0,952 |
| C18:2 <i>trans</i> (ácido linolelaídico) | 0,952 |
| C18:3 <i>cis</i> (ácido linolênico) | 0,952 |
| C18:3 <i>trans</i> (ácido linolênico <i>trans</i>) | 0,952 |

Vale salientar que, todos os valores atingiram conversão de éster metílico superiores a 94% e ressalta-se que os componentes C18 apresentaram conversão relativamente superiores aos C16 e C17.

4.4 Análise do teor de metais nos óleos de soja e canola

Neste tópico serão tratados os processos para determinação dos íons presentes nos óleos de soja e canola. Vale ressaltar que, a análise dos metais, bem como, a determinação das espécies orgânicas obedeceu aos mais rigorosos critérios previstos nas figuras de mérito deste trabalho.

4.4.1 Decomposição das amostras para análise de Fe e Cu

As etapas de decomposição das amostras foram realizadas em forno de microndas com cavidade (Microwave Digestion Labstation - ETHOS EZ - Milestone) com capacidade para 10 frascos de 100 mL fabricados em TFM (PTFE modificado). O equipamento foi acoplado com sensores de temperatura e pressão visando garantir uma maior confiabilidade nos resultados.

Os metais foram quantificados empregando Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama, modelo AA 220FS (Varian, Mulgrave, Victoria, Austrália). Equipado com corretor de fundo com lâmpada de deutério e chama ar/acetileno. Os pontos da curva analítica de calibração, bem como as amostras estavam em meio aquoso.

As amostras de óleo de canola e soja foram realizadas em triplicata. O procedimento de decomposição consistiu em pesar cerca de 0,25 g de cada amostra de óleo em tubo de teflon utilizado no forno de micro-ondas, em seguida foram adicionados os seguintes reagentes: 5 mL de HNO₃ 65% m m⁻¹ e 2,0 mL de H₂O₂ 30% v v⁻¹, e os frascos foram devidamente fechados e inseridos no forno e o programa de aquecimento era acionado no equipamento (Tabela 12).

Tabela 12. Rampa de aquecimento para decomposição de amostras de óleos de soja e canola assistida por radiação de micro-ondas, em forno com cavidade (PINELLI, 2017).

| Tempo, min | Potência, W | Temperatura, °C |
|-------------------|--------------------|------------------------|
| 3 | 600 | 120 |
| 2 | 600 | 120 |
| 10 | 850 | 220 |
| 15 | 850 | 220 |

Após finalização do programa, as amostras digeridas foram esfriadas a temperatura ambiente e transferidas para frascos de Falcon e diluídas para volume de 20,0 mL com água deionizada.

4.4.2 Determinação elementar de Fe e Cu

Para a determinação de Fe e Cu foi empregado um espectrômetro de Absorção Atômica com Chama, modelo: Varian AA 220FS (Mulgrave, Victoria, Austrália). Equipado com correção de fundo de deutério e chama ar-acetileno. As condições de operação encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13. Condições de operação para análise de ferro e cobre por FAAS (BARAN e YASAR, 2010).

| Parâmetros | Cu | Fe |
|---------------------------------|-----------|-----------|
| Comprimento de onda (nm) | 324,8 | 248,3 |
| Largura da faixa espectral (nm) | 0,5 | 0,2 |
| Corrente da lâmpada (mA) | 3,5 | 5,0 |
| Fluxo (L min ⁻¹) | 0,70 | 0,70 |
| Altura da chama (mm) | 13 | 13 |

4.5 Figuras de mérito consideradas na validação do método analítico

A validação de um método analítico é confirmação por exame e fornecimento de evidência objetiva de que os requisitos específicos para um determinado uso pretendido são

atendidos (INMETRO, 2017). Dessa forma, o método validado deve produzir resultados que atendam às necessidades do problema analítico em questão.

De acordo com o ICH (The International Conference on Harmonisation), os parâmetros empregados na validação dependerão da natureza da análise. Logo, o objetivo do procedimento analítico deve ser claramente entendido, pois este irá direcionar as características de desempenho que precisarão ser avaliadas (ICH, 2005). Os principais parâmetros de desempenho que devem ser considerados na validação são abordados a seguir.

4.5.1 Linearidade

Linearidade de um procedimento analítico é a sua habilidade (dentro de uma dada faixa) em obter resultados os quais são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra (ICH, 2005).

Faixa de trabalho de um procedimento analítico é o intervalo entre a menor concentração e a maior concentração de analito na amostra para o qual se demonstrou que o procedimento analítico tem um nível aceitável de precisão, exatidão e linearidade (ICH, 2005).

A verificação da linearidade do método desenvolvido para os analitos foi realizada numa faixa de concentração entre 0,5 e 10 mg L⁻¹.

4.5.2 Precisão

A precisão pode ser definida como a expressão da concordância entre vários resultados analíticos obtidos para uma mesma amostra (LANÇAS, 2009). Normalmente, a precisão é determinada para circunstâncias específicas de medição e as três maneiras mais comuns de expressá-la são por meio da repetibilidade, precisão intermediária e da reprodutibilidade, sendo usualmente expressas pelo desvio padrão e coeficiente de variação (INMETRO, 2017). O coeficiente de variação (CV, usualmente expresso em %), também conhecido como desvio padrão relativo (DPR), é calculado da seguinte forma (INMETRO, 2017):

$$CV = DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) * 100$$

Sendo:

DP: desvio padrão;

CMD: concentração média determinada.

A avaliação da precisão do método foi realizada através de experimentos de precisão intradia e precisão interdia. A precisão intradia foi avaliada realizando-se triplicatas das análises consecutivas do padrão de ácido linoleico puro – L1376 SIGMA no mesmo dia em três concentrações diferentes: 5, 10 e 25 mg L⁻¹.

A precisão interdia foi realizada por um período de dois dias consecutivos onde, em cada dia, foram realizadas triplicatas das análises consecutivas do padrão de ácido linoleico puro – L1376 SIGMA (5, 10 e 25 mg L⁻¹), utilizando o mesmo procedimento otimizado já descrito.

4.5.3 Exatidão

A exatidão reflete a proximidade entre o valor medido e um valor de referência considerado verdadeiro, e relaciona-se com o erro absoluto de uma medida (ICH, 1996). A exatidão é avaliada numericamente por meio da tendência. Os processos normalmente utilizados para avaliar a tendência de um método são, entre outros: uso de materiais de referência certificados (MRC), participação em comparações interlaboratoriais, comparação com método de referência (ou método validado) e realização de ensaios de recuperação. A tendência, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos. A determinação da tendência com relação aos valores de referência apropriados é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos (INMETRO, 2017).

A recuperação (R) pode ser expressa como recuperação analítica, definida como:

$$R = \frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}} \times 100$$

A exatidão do método foi avaliada realizando-se o estudo das recuperações relativas para o padrão puro na análise e para a fortificação de amostra de óleo de soja.

Para a análise do padrão puro, as recuperações relativas foram avaliadas em três níveis do material de referência do ácido linoleico puro: 5, 10 e 25 mg L⁻¹. Isto porque para avaliar a

eficiência da transesterificação e, portanto, a formação dos ésteres metílicos de ácidos graxos pelo método de catálise básica avaliado neste estudo foi necessária a utilização de ácido graxo.

Para obtenção das concentrações de ésteres metílicos de ácido graxo foi necessário adicionar 1 mg de ácido linoleico puro. Considerando 2 mL do sobrenadante na análise de transesterificação, temos a concentração de 500 ppm na fase, a partir daí foi retirada alíquotas para diluição de 1 para 100, 1 para 50 e 1 para 20, seguida da injeção de 1 μL . Utilizando a curva analítica foi possível obter a concentração.

Para a fortificação do óleo de soja, o padrão de ácido linoleico puro – L1376 SIGMA ($\geq 99\%$) foi submetido à transesterificação em triplicata para 3 concentrações: 5, 40 e 70 mg L^{-1} , utilizando o método otimizado conforme descrito no item 4.2. Inicialmente, realizou-se a análise de óleo de soja puro sem o padrão adicionado, e quantificou-se o teor de ácido linoleico. Em seguida, a amostra de óleo de soja foi fortificada com o padrão de ácido linoleico, de modo que a concentração final (fortificação + teor presente no óleo puro) estivesse em 3 faixas: 5, 40 e 70 mg L^{-1} .

Para o cálculo da concentração do padrão adicionado, foi considerada a massa acrescentada em relação ao volume do sobrenadante transesterificado. Foi realizada a diluição do sobrenadante e realizada a injeção de 1 μL . A quantificação foi realizada através da curva analítica para *cis*-9, *cis*-12-ácido octadecadienóico metil éster (ácido linoleico).

4.5.4 Limites de detecção e quantificação

Em termos gerais, o limite de detecção (LD) é a menor quantidade ou concentração do analito na amostra de teste, que pode ser distinguida do zero, com segurança (IUPAC, 2002).

Limite de detecção (LD) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade de analito na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada sob as condições estabelecidas para o ensaio (ICH, 2005).

Limite de quantificação (LQ) de um procedimento analítico individual é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2005).

Limite de quantificação é útil para indicar a concentração abaixo da qual o método analítico não pode operar com uma precisão aceitável. Com frequência essa precisão é arbitrariamente definida como 10% do desvio padrão relativo (DPR) ou o limite é tomado arbitrariamente como sendo igual a um múltiplo do limite de detecção (IUPAC, 2002).

Os limites de detecção e quantificação foram determinados pelo método visual através de análises cromatográficas de diluição seriada do padrão até o menor nível detectado. Para os cálculos foram utilizadas as equações abaixo:

O limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) podem ser estimados pelas equações (INMETRO, 2017):

$$LD = 3,3 \frac{s}{b}$$

$$LQ = 10 \frac{s}{b}$$

Onde,

s = desvio padrão da resposta no menor nível da curva analítica (10 replicatas);

b = inclinação (coeficiente angular) da curva analítica.

4.6 Aquecimento dos óleos de soja e canola

Uma vez estabelecidos os métodos para as análises de ácidos graxos *trans* e metais procedeu-se as etapas de aquecimento dos óleos na ausência e presença de metais para posterior quantificação. Abaixo são elencados os procedimentos utilizados para alcançar este objetivo.

4.6.1 Aquecimento sem metais

O sistema experimental usado é mostrado na Figura 9, e consistia de um balão de vidro de três vias de 250 mL de fundo redondo, aquecido por uma manta a uma temperatura de $180 \pm 5^\circ\text{C}$, contendo agitador mecânico com haste de vidro e um termopar para registrar a temperatura. O processo de aquecimento foi realizado durante 24 horas com um volume de 200 mL de óleo. As amostras para análise foram coletadas em 4, 8, 12, 16 e 24 horas de aquecimento, em uma relação superfície/volume de $0,43 \text{ cm}^{-1}$, condições previamente testadas (BASTOS e PEREIRA, 2010; DA SILVA e PEREIRA, 2008).

Figura 9. Sistema de aquecimento do óleo.
Fonte: Próprio autor.



4.6.2 Aquecimento com adição de Cu^{2+} e Fe^{3+}

As amostras coletadas e armazenadas em frasco âmbar foram submetidas ao aquecimento com adição de metais para avaliar a influência dos íons metálicos na isomerização dos ácidos graxos.

No estudo da influência dos íons metálicos, foram utilizadas soluções de cloreto férrico e cloreto cúprico em etanol na concentração de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. No início do aquecimento, um volume da solução do íon metálico, a ser estudado, era adicionado ao óleo com o uso de micropipetas calibradas para as faixas de $2\text{-}20 \mu\text{L}$ e de $10\text{-}100 \mu\text{L}$. Assim, para o Fe (III) eram adicionados volumes de $19,6 \mu\text{L}$; $58,7 \mu\text{L}$; e $97,8 \mu\text{L}$ para concentração final $10,0$; $30,0$ e $50,0 \mu\text{g kg}^{-1}$ do íon metálico em óleo, respectivamente; para o Cu (II) foram

usados volumes de 10,8 µL; 32,5 µL e 54,3 µL para concentração final 10,0; 30,0 e 50,0 µg kg⁻¹ do íon metálico em óleo, respectivamente. Condições adotadas por Bastos (2014) para quantificação de compostos carbonílicos em óleo.

Em seguida, o aquecimento foi realizado por intervalos de tempos correspondentes a 4, 8, 12, 16 e 24 h, com retirada de uma alíquota da amostra para análise em cada intervalo de tempo.

4.7 Análises Estatísticas

Cada um dos experimentos de aquecimento foi realizado em triplicata sob cada condição experimental. Os dados foram descritos como média ± desvio padrão e avaliados pela análise de variância (ANOVA) para verificar se há diferença significativa com 95% de confiança, para cada composto (ácido graxo *trans*) nos óleos aquecidos com e sem a presença de metais em diferentes concentrações. Após a constatação de diferença significativa na distribuição global dos dados pela ANOVA, foi realizado o teste de Tukey para verificar em quais grupos de resultados (pares de tratamentos) a diferença foi significativa. Para estes tratamentos foram utilizados os softwares Statistica 11 e Excel 2016.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Otimização do preparo dos ésteres metílicos por transesterificação

5.1.1 Concentração da solução de KOH

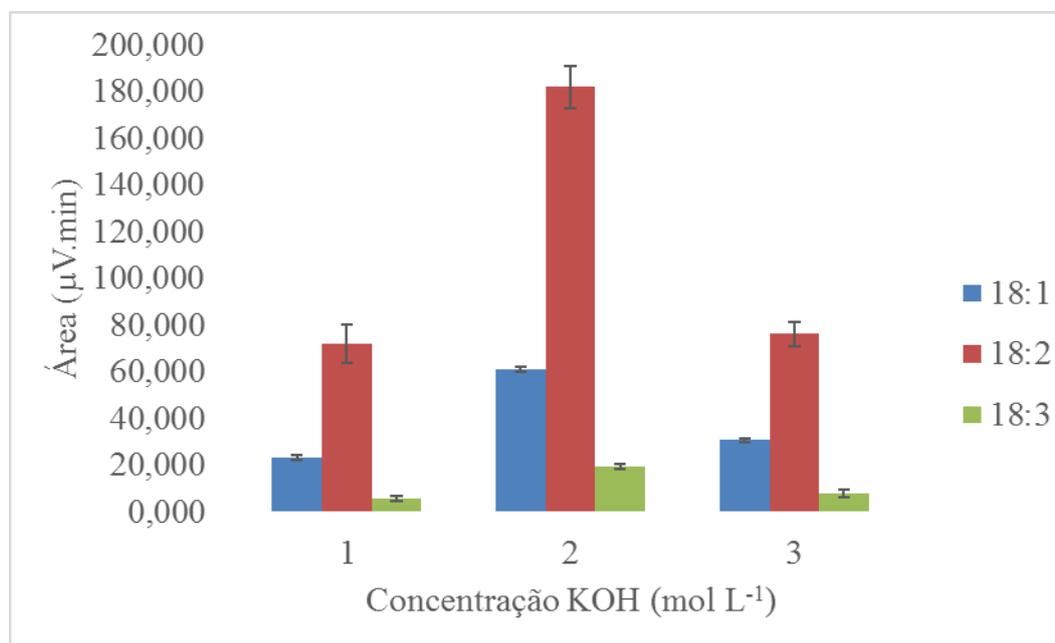
O primeiro parâmetro otimizado no procedimento de transesterificação foi a concentração da solução metanólica de KOH. O método do Instituto Adolf Lutz estabelece uma concentração de 2 mol L^{-1} para a solução de KOH. No presente trabalho, estabeleceu-se 2 mol L^{-1} como ponto central e demais pontos foram 1 mol L^{-1} e 3 mol L^{-1} .

Moura *et al.* (2006) verificaram que a concentração de NaOH, dentro da faixa avaliada (0,93 a 1,27%) para otimização das condições de produção de ésteres etílicos a partir de óleo de peixe, não apresentou influência significativa no rendimento em ésteres etílicos, permitindo a escolha da menor concentração de NaOH testada sem perdas na taxa de conversão em ésteres.

Verifica-se na literatura que a concentração de catalisadores alcalinos utilizados tem variado de 0,4 a 2,0% (m/m) de óleo. A grande variação nas concentrações utilizadas pode ser atribuída às diferenças existentes nos diversos sistemas reacionais utilizados, tais como tipo e razão molar do álcool utilizado, configuração do reator e matéria-prima (MEHER *et al.*, 2006)

Conforme figura 10 a seguir, a melhor concentração foi de $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ que é o valor do método do Instituto Adolfo Lutz (2008), que caracteriza a melhor razão estequiométrica para alcoólise.

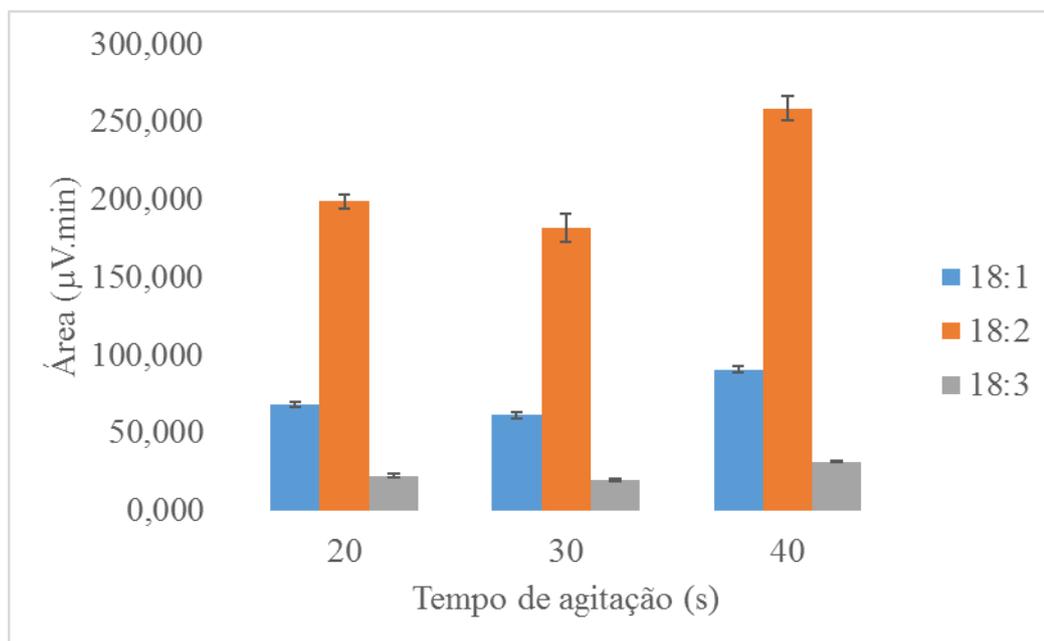
Figura 10. Efeito da concentração do KOH sob as condições experimentais: tempo de agitação de 30 s; volume do solvente n-hexano 2 mL; volume da solução de NaCl saturado 3 mL.



5.1.2 Tempo de agitação

O tempo de agitação no vórtex, após a etapa de adição de 0,2 mL de KOH 2 mol L^{-1} foi avaliado em 20, 30 e 40 s. O melhor resultado foi a agitação de 40 s (Figura 11), mostrando uma diferença do tempo estabelecido pelo método padrão (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008) que é de 30 s. O maior tempo de agitação facilitou a reação e aumentou o contato entre os reagentes. O tempo de agitação relativamente inferior do método padrão possivelmente deve-se a faixa de otimização adotada diferente. Vale salientar, que o tipo impelidores, velocidade de agitação são fatores imprescindíveis no processo de transferência de massa. Como foram obtidos tempos relativamente inferiores com conversões satisfatórias não foram investigados outros dados. Ressalta-se que, apesar deste tópico ser relevante, não foi objeto de estudo mais aprofundado por este trabalho

Figura 11. Efeito do tempo de agitação sob as condições experimentais: 0,2 mL de KOH 2 mol L⁻¹; volume do solvente n-hexano 2 mL; volume da solução de NaCl saturado 3 mL.

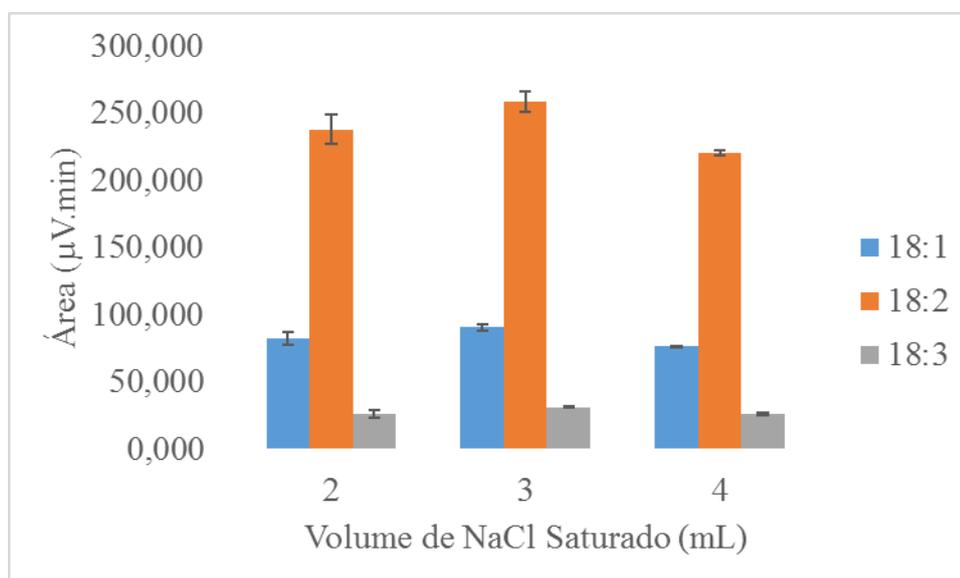


5.1.3 Efeito *salting-out*

Foram adicionados diferentes volumes da solução saturada de cloreto de sódio saturado para avaliar a influência do efeito *salting-out* nas áreas dos picos cromatográficos. Os resultados obtidos para esse experimento são mostrados na figura 12.

Os resultados revelaram semelhanças entre as áreas nos volumes de adição de sal, sendo 3 mL, que é volume do método padrão, o valor escolhido.

Figura 12. Efeito do volume de NaCl saturado sob as condições experimentais: tempo de agitação de 40 s, 0,2 mL de KOH 2 mol L⁻¹; volume do solvente n-hexano 2 mL.



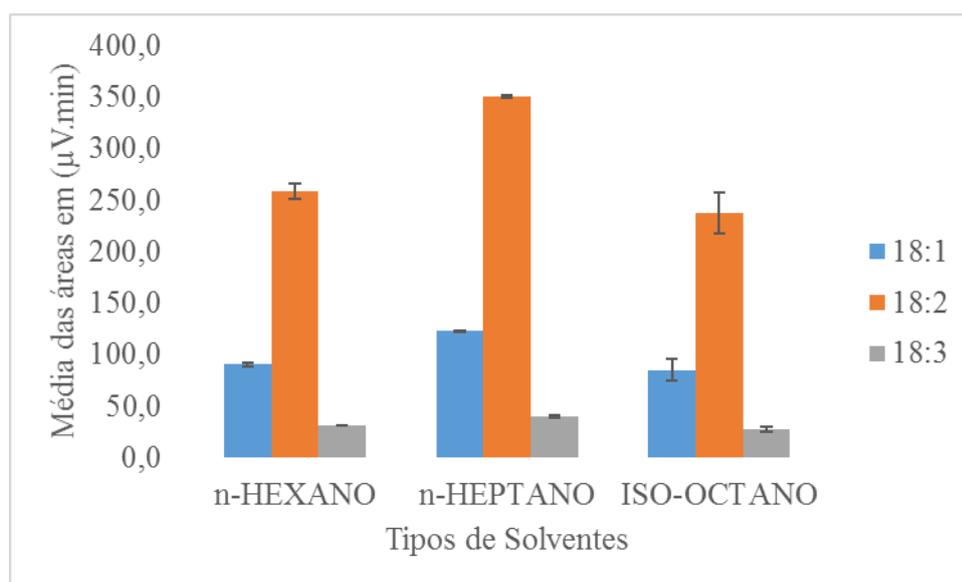
A influência da força iônica, efeito *salting-out* influencia na separação das fases de modo que o aumento na concentração de NaCl aumenta o volume de fase sedimentada, devido à diminuição da solubilidade do solvente extrator na presença de um sal. Esta influência será de acordo com as características de cada analito, sendo adotada uma grande variação da adição de NaCl, desde a não utilização até a adição de 0,5 a 30% (ZANG *et al.*, 2009).

5.1.4 Tipo de solvente

A quantificação dos lipídios dos alimentos é realizada, tradicionalmente, por extração com solventes orgânicos e determinação gravimétrica. A recuperação dos vários componentes dos lipídios varia com o solvente de extração. Diferentes tipos de ligações e energias envolvem as moléculas que deverão ser extraídas (LUTHEIA, 2004). Importante considerar a toxicidade dos solventes que são empregados nos métodos convencionais de extração de gordura. As legislações de proteção ambiental e de biossegurança têm previsto a redução na utilização de solventes tóxicos e exigido o descarte adequado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Nesta etapa, os solventes foram selecionados para o teste a partir das avaliações de Milinsk *et al.* (2011) sobre os tipos de métodos de transesterificação.

Figura 13. Efeito do tipo de solvente sob as condições experimentais: tempo de agitação de 40 s, 0,2 mL de KOH 2 mol L⁻¹; volume da solução de NaCl saturado 3 mL.



O melhor resultado foi obtido com o n-heptano, diferindo do método padrão (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008) e também sendo superior ao iso-octano, conforme Figura 13. Vale ressaltar que, o n-heptano possui uma cadeia linear mais longa, o que gera uma característica apolar maior da substância em relação ao n-hexano e iso-octano o que influencia positivamente a afinidade na extração, visto que os EMAG são apolares. Atrelado ao fator da elevada apolaridade no n-heptano, junta-se ao fato de que este solvente possui menor grau de toxicidade em relação ao n-hexano, o que está compatível com os princípios da química verde.

Após a otimização dos parâmetros mais importantes da transesterificação, definiu-se as condições recomendadas para a realização do procedimento, como a seguir:

- Concentração do KOH: 2,0 mol L⁻¹;
- Tempo de agitação: 40 s;
- Volume da solução saturada de NaCl: 3,0 mL;
- Solvente: n-heptano.

5.2 Validação do método analítico

A condição cromatográfica final para análise foi baseada no estudo de DELMONT *et al.*, 2011 utilizando a coluna SLB-IL111, com teste também para isoterma a 168 e 180°C. Seguido de testes com os métodos citados em Milinsk *et al.* (2011), Kramer *et al.* (2002) e AOCS ce 1h-05 (2005).

Quanto a eluição dos isômeros *cis/trans* dos derivados dos ésteres metílicos do ácido linoléico e linolênico, o método cromatográfico baseado no estudo de DELMONT *et al.*, 2011 promoveu a resolução dos isômeros C18:2 (Figura 15); entretanto, nenhuma das programações propiciou a resolução completa para os isômeros *cis/trans* do C18:3 (Figura 14), assim como não foi verificada a resolução completa isômeros *cis/trans* do C18:3 em nenhum artigo pesquisado e nem no catálogo do fabricante. Paralelamente, foram feitos também testes com rampa de fluxo para tentar separar ainda mais os isômeros, mas sem sucesso. Dentre as diferentes condições cromatográficas avaliadas, a selecionada para utilização na determinação dos ácidos graxos C18:1, C18:2 e C18:3 foi conforme descrito abaixo:

- Cromatógrafo a gás Modelo: Varian 450-GC
- Coluna capilar: SLB-IL 1111, 100 m, 0,25 mm, 0,2 μm , SIGMA-ALDRICH, Sílica fundida, extremamente polar;
- Detector de ionização de chama - FID;
- Gas de arraste: H_2 ;
- Gases auxiliares para FID: nitrogênio/ar sintético (livre de hidrocarbonetos);
- Fluxo: constante de 1mL/min com a velocidade linear de 26 cm/s;
- Temperatura do detector: 250°C;
- Temperatura do injetor: 250°C;
- Rampa de aquecimento: Isoterma 180°C por 35 min;
- Split: 1/100.

As Figuras 14, 15 e 16 mostram as separações dos padrões de ésteres metílicos de ácido linolênico, linoleico, oléico e elaídico, respectivamente, obtida no sistema GC-FID.

Figura 14. Mix de isômeros geométricos do linolenato de metila ($\text{C}_{18:3}$, 47792 – SIGMA) a 100 mg L^{-1} . Coluna capilar SLB-IL111 (100 m x 0,25 mm x 0,2 μm). Volume injetado 1 μL .

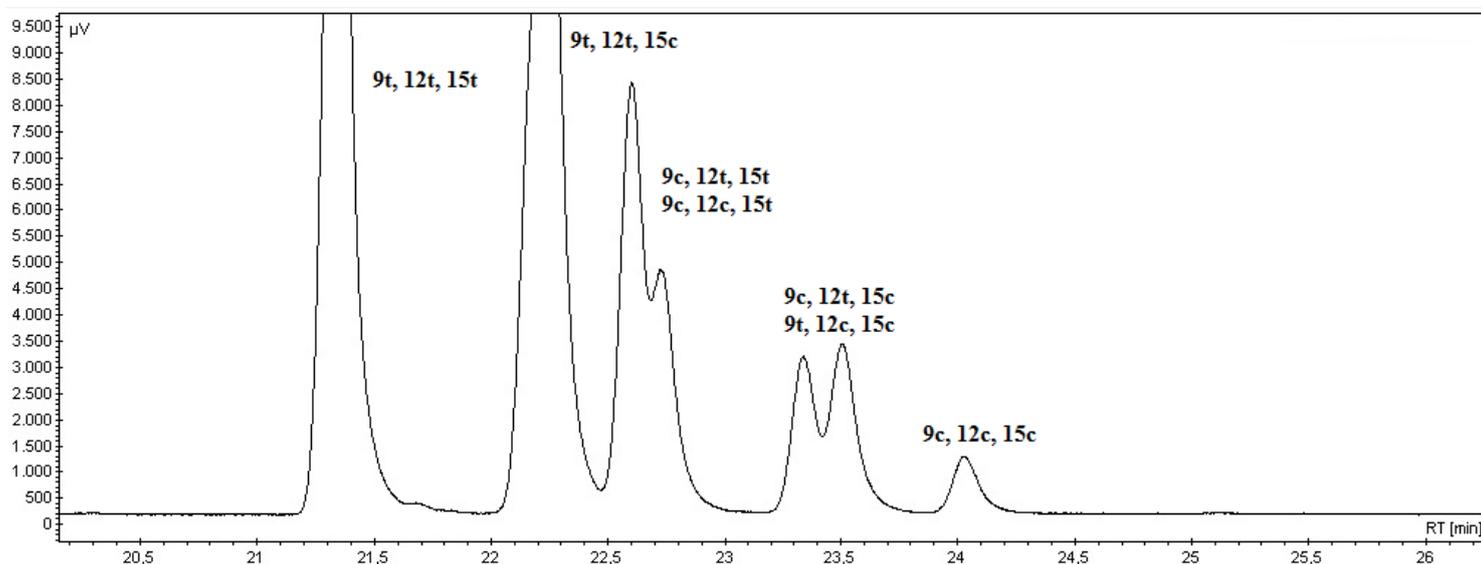


Figura 15. Mix de isômeros geométricos do linoleato de metila (C18:2, 47791 – SIGMA) a 100 mg L⁻¹. Coluna capilar SLB-IL111 (100 m x 0,25 mm x 0,2 µm). Volume injetado 1 µL.

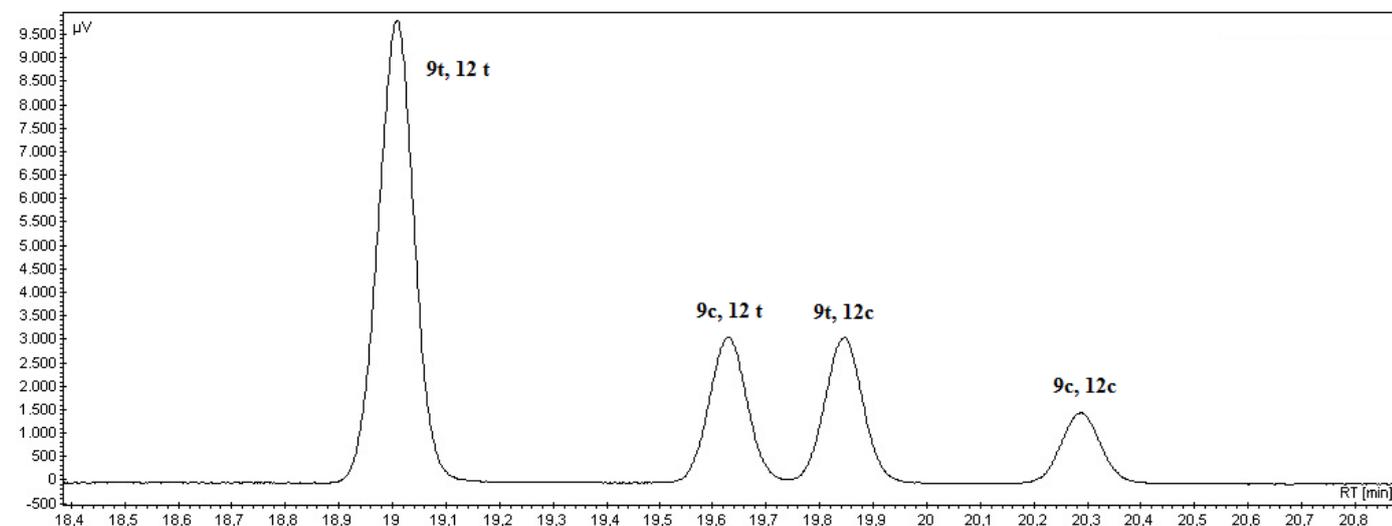
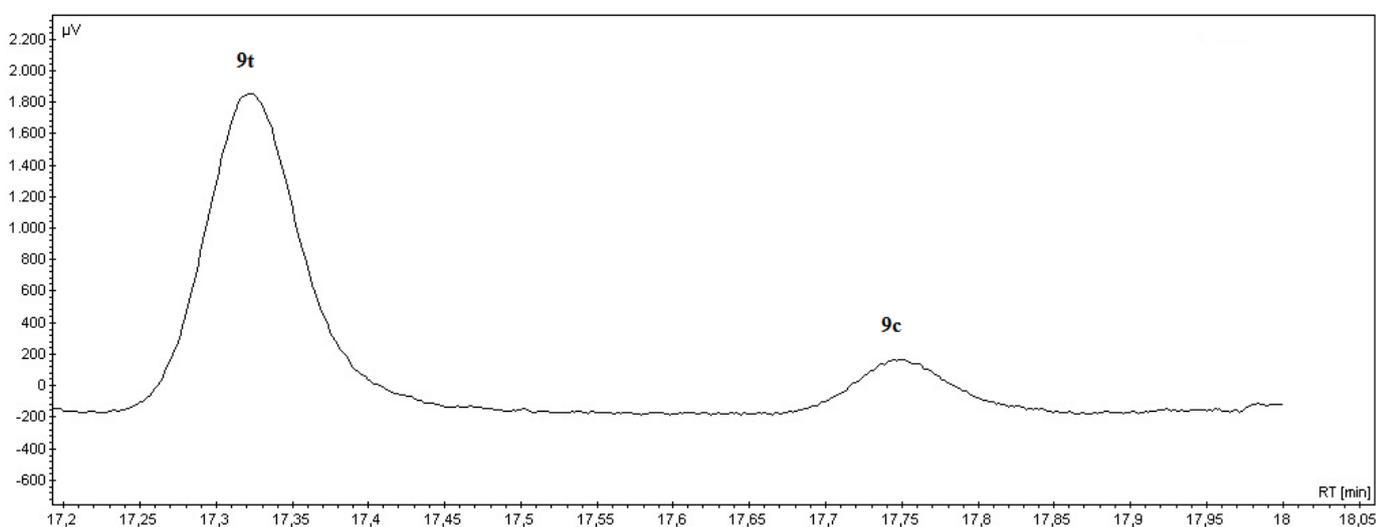


Figura 16. Mix de isômeros geométricos do *trans*-elaidato de metila (C18:1, 9t 46903 – SIGMA) e oleato de metila (C18:1, 9c 18918 – SUPELCO) a 100 mg L⁻¹. Coluna capilar SLB-IL111 (100 m x 0,25 mm x 0,2 µm). Volume injetado 1 µL.



Os cromatogramas foram fundamentados de acordo com a literatura (DELMONT *et al.*, 2011; Milinsk *et al.* (2011); Kramer *et al* (2002) e AOCS ce 1h-05 (2005)). Ressalta-se que a coluna cromatográfica utilizada neste procedimento possui natureza química similar a utilizada pelas literaturas citadas. Apesar dos cromatogramas do padrão mix de isômeros de ésteres metílicos de: ácido linolênico (47792 – SIGMA) apresentar baixa resolução, coeluição

dentre outros. Não há na literatura trabalhos com uma boa separação dos ésteres metílicos. Sugere-se que seja necessário usar fases estacionárias mais seletivas e diminuir o número de pratos teóricos da coluna. Vale ressaltar que o software apresenta recursos de integração para picos coeluidos em forma de “vale” e “ombro”.

5.2.1 Limites de detecção e quantificação

Para o método otimizado, os limites de detecção e quantificação foram determinados pelo método visual, ou seja, através de análises cromatográficas do padrão Supelco 18918, com concentrações conhecidas e decrescentes até o menor nível detectado. Posteriormente, no menor nível de concentração detectado foram realizadas 10 réplicas. Os valores obtidos experimentalmente são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14. Valores de limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ) para o método.

| Analito | LD, mg L⁻¹ | LQ, mg L⁻¹ |
|---|------------------------------|------------------------------|
| Oleato de metila | 1,26 | 3,82 |
| <i>trans</i> -elaidato de metila | 0,89 | 2,35 |
| <i>cis-cis</i> -linoleato de metila | 0,69 | 2,09 |
| <i>cis-trans</i> -linoleato de metila | 0,78 | 2,34 |
| <i>trans-cis</i> -linoleato de metila | 0,92 | 2,78 |
| <i>trans-trans</i> -linoleato de metila | 0,41 | 1,25 |
| <i>cis-cis-cis</i> -linolenato de metila | 1,78 | 5,40 |
| <i>trans-trans-cis</i> -linolenato de metila + <i>trans-cis-trans</i> -linolenato de metila + <i>Cis-trans-trans</i> -linolenato de metila + <i>Cis-cis-trans</i> -linolenato de metila + <i>Cis-trans-cis</i> -linolenato de metila + <i>Trans-cis-cis</i> -linolenato de metila | 1,52 | 4,63 |
| <i>trans-trans-trans</i> -linolenato de metila | 1,69 | 5,14 |

Chen *et al.* (2014), ao empregarem GC-FID para avaliarem óleo de palma após fritura, encontraram para os mesmos compostos, valores de LD entre 0,75 a 1,50 mg L⁻¹ e LQ

variando de 1,25 a 5,38 mg L⁻¹. Como mostrado na Tabela 14, os valores de LD estavam entre 0,41 e 1,78 mg L⁻¹ e os LQs estavam entre 1,25 e 5,14 mg L⁻¹, respectivamente.

De forma simplificada pode-se afirmar que os componentes que apresentam maior número de insaturações no mesmo tamanho de cadeia carbônica poderão ter maior interação física e química com a fase estacionária da coluna cromatográfica implicando em maior tempo de retenção e maiores limites de detecção.

5.2.2 Linearidade

A linearidade do método foi avaliada a partir das curvas analítica (tabela 13) construídas utilizando materiais de referência certificados com ISO/IEC 17025 e ISO GUIA 34. Os coeficientes de determinação (R²) obtidos variaram de 0,9962 a 0,9995, o que demonstrou uma forte correlação linear entre a concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos analisados e as áreas dos picos, permitindo a quantificação em amostras de óleo transesterificado.

Para calcular os coeficientes de regressão (a e b) e também o coeficiente de determinação (R²) foi utilizado o método matemático de regressão linear. Os resultados obtidos para cada curva analítica estão apresentados na Tabela 15.

Tabela 15. Equações das curvas analíticas, coeficientes de determinação (R²) e faixas de trabalho para cada composto analisado, para o método de determinação empregado.

| Ácidos graxos | Equação de regressão linear | R ² | Faixa de mg L ⁻¹ |
|---|-----------------------------|----------------|-----------------------------|
| Oleato de metila | $y = 0,6695 x + 0,1098$ | 0,9998 | 4-100 |
| <i>trans</i> -elaidato de metila | $y = 0,7197 x - 0,4742$ | 0,9986 | 2-100 |
| <i>cis-cis</i> -linoleato de metila | $y = 0,7546 x + 0,7907$ | 0,9962 | 2-80 |
| <i>cis-trans</i> -linoleato de metila | $y = 0,5811 x + 0,3559$ | 0,9982 | 2-80 |
| <i>trans-cis</i> -linoleato de metila | $y = 0,6451 x - 0,0386$ | 0,9988 | 2-80 |
| <i>trans-trans</i> -linoleato de metila | $y = 0,7821 x - 0,2124$ | 0,9985 | 1-100 |

| | | | |
|---|-------------------------|--------|-------|
| <i>cis-cis-cis</i> -linolenato de metila | $y = 0,3239x - 0,272$ | 0,9979 | 5-80 |
| <i>trans-trans-cis</i> -linolenato de metila + <i>trans-cis-trans</i> -linolenato de metila + <i>cis-trans-trans</i> -linolenato de metila + <i>cis-cis-trans</i> -linolenato de metila + <i>Cis-trans-cis</i> -linolenato de metila + <i>trans-cis-cis</i> -linolenato de metila | $y = 0,5132x + 1,2483$ | 0,9985 | 4-100 |
| <i>trans-trans-trans</i> -linolenato de metila | $y = 0,9427 x - 1,6715$ | 0,9983 | 5-100 |

A ANVISA e o INMETRO recomendam que o coeficiente de determinação deve assumir valores acima de 0,99 e 0,90, respectivamente. Sendo assim, é possível concluir que o modelo de regressão linear obtido a partir das curvas analíticas está de acordo com a literatura e o mesmo é adequado para as determinações analíticas desse estudo (RIBANI *et al.*, 2004).

Todos os coeficientes de determinação obtidos foram superiores a 0,99, confirmando a linearidade do método de acordo com as normas da ANVISA e do INMETRO. O método da padronização externa foi aplicado para a quantificação dos ácidos graxos.

Para os ésteres metílicos (C18:3), listados a seguir, foi realizada uma única curva analítica em função da dificuldade de separação de todos individualmente e o próprio padrão considera para estes o equivalente a 66% do total em peso contidos no padrão, já que no próprio certificado de análise do padrão há co-eluição também em pelo menos 2 picos:

- *trans-trans-cis*-linolenato de metila;
- *trans-cis-trans*-linolenato de metila;
- *cis-trans-trans*-linolenato de metila;
- *cis-cis-trans*-linolenato de metila;
- *cis-trans-cis*-linolenato de metila;
- *trans-cis-cis*-linolenato de metila.

Para a quantificação do teor de metais nos óleos antes do aquecimento, obteve-se as seguintes informações sobre o método adotado:

- Ferro ($\mu\text{g g}^{-1}$): $y = 0,076913x - 0,001624$ ($R^2 = 0,9995$; LQ = $0,08 \mu\text{g g}^{-1}$).
- Cobre ($\mu\text{g g}^{-1}$): $y = 0,21826x - 0,000665$ ($R^2 = 0,9990$; LQ = $0,017 \mu\text{g g}^{-1}$).

5.2.3 Precisão e Exatidão

A precisão do método analítico foi avaliada através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD %) referente às análises realizadas intradia e interdia, para o ácido graxo puro disponível, ácido linoleico, que foi submetido à transesterificação da mesma maneira que o óleo. Os resultados obtidos para precisão e exatidão se encontram nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16. Resultados da recuperação e desvios padrão relativos para 3 níveis de concentração realizada intra-dia para o analito ácido linoleico.

| Nível de fortificação, mg L ⁻¹ | Recuperação, % (n = 3) | RSD, % |
|---|------------------------|--------|
| 5 | 87,20% | 4,87 |
| 10 | 89,71% | 5,20 |
| 25 | 96,46% | 3,67 |

Tabela 17. Resultados da recuperação (%) e desvios padrão relativos (% RSD) para 3 níveis de concentração realizada inter-dia para o analito ácido linoleico.

| Nível de fortificação, mg L ⁻¹ | Recuperação, % (n = 3) | RSD, % |
|---|------------------------|--------|
| 5 | 85,50% | 3,89 |
| 10 | 82,30% | 4,55 |
| 25 | 90,05% | 2,80 |

Vale ressaltar que, foi necessário usar o fator de conversão de EMAG para AG (ácido graxo), que para ácido linoleico (C18:2) é de 0,9524.

É importante que os laboratórios estabeleçam critérios de aceitação para recuperação, de preferência seguindo as orientações normativas da legislação aplicável às áreas de atividades. Normalmente, os critérios estão atrelados ao nível de concentração. Os intervalos aceitáveis de recuperação em se tratando de analitos em concentrações na ordem de 1 a 10 ppm, geralmente se encontram entre 80 e 110%. Para 100 ppm, os valores estão entre 90 e 107% (INMETRO, 2017). Para este trabalho, considerando as concentrações na ordem de 1 a 10 ppm, observa-se que as recuperações estão dentro do limite recomendável.

A precisão do método foi adequada e aceitável para análise de ácidos graxos utilizando a transesterificação otimizada, visto que os desvios padrão relativos (RSD) obtidos apresentaram valores abaixo de 20% de acordo com o recomendado na literatura (RIBANI *et al.*, 2004).

Para análises onde extração, digestão e derivatização são etapas normalmente requeridas, um dos principais desafios é quantificar o analito presente originalmente na amostra com pequenas perdas (BRASIL, 2004).

Tabela 18. Resultados da recuperação (%) e desvios padrão relativos (% RSD) para 3 níveis de fortificação em óleo de soja realizada para o analito ácido linoleico.

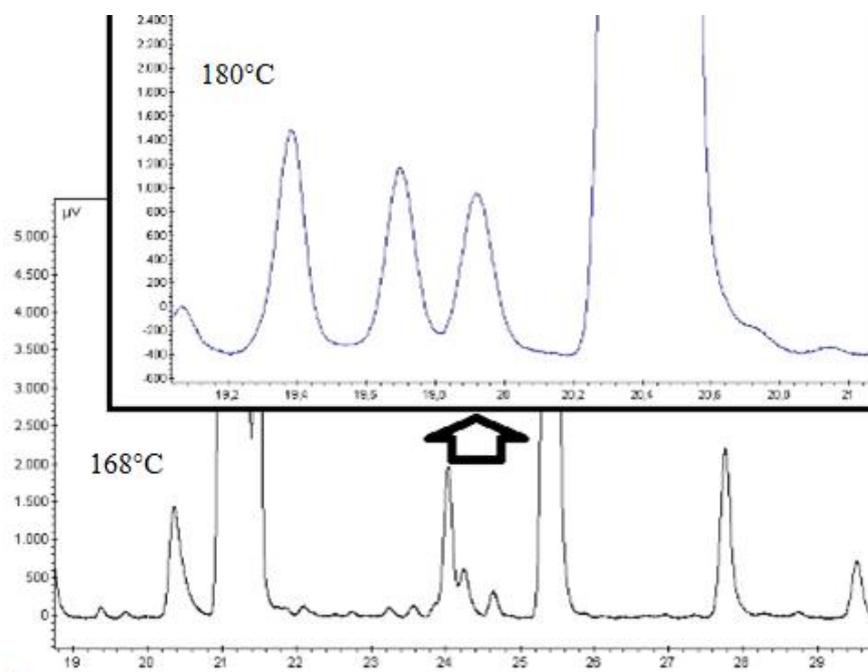
| Nível de fortificação, ppm | Recuperação, % (n = 3) | RSD, % |
|----------------------------|------------------------|--------|
| 5 | 80,10% | 2,76 |
| 40 | 82,03% | 4,92 |
| 70 | 80,60% | 5,45 |

KONING *et al* (2001) relataram um método GC para a separação de ácidos graxos no óleo de peixe, em que o RSD (%) estavam na faixa de 1,5% e 11%. Chen *et al.* (2014) avaliaram as recuperações de 13 padrões de EMAGs e encontraram valores na faixa de 89,84% e 115,72%. Vale ressaltar que neste caso, o autor avaliou a recuperação em função das condições cromatográficas e não da transesterificação. De acordo com a literatura relatada por Cajak *et al.* (2008), a faixa aceitável para a recuperação percentual foi deve ser de 70% e 120% com um RSD<20%. No presente trabalho os valores encontrados na tabela 18 foram abaixo de 20%, sendo confiável para quantificação de ácidos graxos *trans* em óleo polinsaturado. Vale salientar que, os valores de recuperação obtidos encontram-se dentro da faixa aceitável das referências supracitadas.

5.3 Teor de metais e aquecimento do óleo

Conforme citado por Delmont *et al.* (2011), há uma coeluição entre *cis*-9, *trans*-12-ácido linoleico e ácido araquídico (C20:0) em óleos e gorduras, sendo confirmada nesta pesquisa quando comparada com a condição de isoterma de 168°C, conforme Figura 17. Para Ratnayake *et al.* (2006), condições de isoterma a 180°C maximizam a resolução dos isômeros de C18:1, C18:2 e C18:3. Por conta disto, a temperatura de 180°C foi adotada como condição cromatográfica do presente trabalho.

Figura 17. Cromatograma (GC-FID) de aquecimento com isoterma de 168 e 180°C, de amostras derivadas de óleo de soja com expansão nos isômeros de ácido linoleico.



As composições detalhadas dos ácidos graxos dos óleos de soja e canola estão apresentadas na Tabela 19 abaixo. Observa-se, que os valores da composição em ácidos graxos *cis*, para os óleos analisados no presente estudo, estão bem próximos aos apresentados por GUNSTONE *et al.* (1994) que encontraram, para os óleos de soja, valores de 23,5 – 31 g/100g para C18:1, 49 – 51,5 g/100g para C18:2 e 2 – 10,5 g/100g para C18:3. O mesmo se aplica ao óleo de canola, no qual os valores encontrados pelos autores foram: 13 – 38 g/100g para C18:1, 9,5 – 22 g/100g para C18:2 e 2 – 10,5 g/100g para C18:3. Song *et al.* (2015) encontraram em óleo de soja um alto teor de ácido linoleico (48,50 g/100 g), seguido por ácido oleico (27,03 g/100 g) e ácido linolênico (6,09 g/100 g).

Tabela 19. Composição de ácidos graxos 18:1, C18:2 e 18:3 *cis/trans* do óleo de soja e canola antes da fritura.

| Ácidos graxos | Óleo de soja (g/100 g) | Óleo de canola (g/100 g) |
|---|---------------------------|-----------------------------|
| C18:1, 9t | <0,005 | <0,005 |
| C18:1, 9c | 21,30±3,4 | 52,40±2,8 |
| C18:2, 9c 12c | 48,50±1,1 | 21,98±1,7 |
| C18:2, 9c 12t | <0,005 | <0,005 |
| C18:2, 9t 12c | <0,005 | <0,005 |
| C18:3, 9c 12c 15c | 10,20±0,55 | 9,20±1,8 |
| C18:3, 9t 12t 15c + C18:3, 9t 12c 15t + C18:3 9c 12t 15t + C18:2 9c 12c 15t + C18:3 9c 12t 15c + C18:3 9t 12c 15c | <0,02 | <0,02 |

* Os valores são expressos como média ± desvio padrão de três repetições (<X = < Limite de Quantificação).

Nos experimentos de aquecimento a 180°C do óleo de soja e canola (sem adição de metais), após 4 h, não foi encontrada a formação de ácido graxo *trans* (Tabela 21), enquanto Tsuzuki (2012), quando fez o aquecimento de 1 g de óleo de canola a 180°C por 4 h em tubo de ensaio aberto encontrou os seguintes valores para os ácidos graxos *trans* C18:1, C18:2 e C18:3, respectivamente: 0,06; 0,14 e 0,89 g/100 g. No óleo estudado pelo autor, antes do aquecimento já existiam ácidos graxos *trans* pré-formados, C18:1, C18:2 e C18:3, respectivamente: 0,04; 0,13; 0,99. Vale ressaltar que diversos fatores estão relacionados com a isomerização, neste caso a temperatura, composição dos óleos, condições de refino do óleo e antioxidantes adicionados (tipo e concentração).

Os fatores de formação dos ácidos graxos *trans* podem estar relacionados às composições químicas e físicas do grão de origem do óleo, presença de antioxidantes naturais, aditivos e contaminantes. Todas as amostras analisadas possuem ácido cítrico e/ou BHT (butil-hidroxi-tolueno) como antioxidantes declarados no rótulo do produto. Não foi possível quantificar os teores de ácido cítrico e BHT para relacionar com o teor de metais, mas pode-se questionar a sua eficácia nas condições de aquecimento do estudo. Segundo pesquisa de Santos (2012), alguns antioxidantes volatilizam-se ou decompõem-se a temperaturas bastante

inferiores à de fritura. Ou seja, no caso dos antioxidantes sintéticos, ocorre a seguinte ordem de maior resistência térmica: PG (propil galato) > TBHQ (terc-butilhidroquinona) > BHA (butil-hidroxi-anisol) > BHT (butil-hidroxi-tolueno). O BHT, BHA e TBHQ apresentaram temperatura inicial de decomposição térmica menor que 110°C e a 250°C apresentaram total volatilização/decomposição. Para o BHT, especificamente, o tempo necessário para que toda a amostra volatilizasse foi de 90 min. Com relação aos compostos com propriedades quelantes, apresentam a seguinte ordem de estabilidade térmica: ácido ascórbico > ácido cítrico > EDTA. Os antioxidantes naturais tiveram boa resistência térmica: α -tocoferol > ácido caféico > ácido ferúlico > ácido gálico. No caso específico do α -tocoferol, a temperatura inicial de perda de massa foi a 199°C. Contrariando Gonçalves, Março e Valderrama (2014) que afirmam que com o aquecimento térmico do óleo de soja, o tocoferol sofre degradação a partir de 50°C, favorecendo a formação de produtos de oxidação.

Em função destes resultados, sugere-se que o tocoferol, ácido cítrico e o BHT presentes nos óleos devem ter sido degradados na temperatura de fritura de 180°C.

No presente estudo, não foram adicionados alimentos ao óleo durante o aquecimento, embora a maioria dos estudos existentes na literatura apresente condições de fritura com batatas, frango etc. Por exemplo, Tsuzuki, Matsuoka e Ushida (2010) verificaram que quando batatas cruas cortadas em fatias foram fritas em óleo de canola a 180°C, o óleo da fritura teve maior teor de ácidos graxos *trans* do que o óleo com a mesma temperatura de aquecimento sem fritura de batata. Isto porque fatores como ácidos graxos *trans* pré-formados, atividade de água do produto e superfície de contato do alimento com o óleo, interferem diretamente no processo de oxidação do óleo. Song *et al.* (2015) demonstraram que entre os métodos de cozimento testados, o processo de aquecimento a 170 °C em óleo de milho por 2 min, com agitação contínua podem acelerar as taxas de oxidação lipídica e a formação de ácidos graxos *trans*.

Hou *et al.* (2012) realizaram as frituras de batatas em óleo de soja a 180–185°C por 10 e 20 h e encontraram valores de ácidos graxos *trans* de respectivamente; 0,21 e 0,27% para C18:1 9t, 0,16 e 0,16% para C18:2, 9t 12t, 0,43 e 0,49 para C18:2, 9t 12c e 0,39 e 0,46 % para C18:2, 9c 12t, para *trans* C18:3 achou valores variando de 0,38 a 0,41. No presente estudo, também foi encontrada a formação dos isômeros semelhantes de C18:1 9t, C18:2 9c 12t, C18:2 9t 12c e C18:3t para óleo de soja após 24 h de aquecimento de, respectivamente: 0,10±0,02; 0,38±0,01; 0,36±0,02 e 0,92±0,01 g/100g.

Sanibal e Mancini-Filho (2004) avaliaram as alterações dos ácidos graxos e a formação de isômeros *trans* durante o aquecimento de óleo de soja e gordura parcialmente

hidrogenada de soja. Para o óleo de soja, observou-se uma maior formação de isômeros *trans* com um total de 2,8% após 24 h sem metal, e no caso do óleo de canola, um total formado de 1,45% após 24 h. No presente trabalho, para o óleo de soja, o total de *trans* após 24 h foi de 1,76 % e para canola foi 2,03%.

Nem todos os trabalhos demonstraram formação de ácidos graxos *trans* em óleo sob aquecimento. Liu *et al* (2007) efetuaram o aquecimento de óleo de soja a 160, 180 e 200°C e nenhuma formação de ácidos graxos *trans* foi observada mesmo após o aquecimento extensivo de óleo de soja não hidrogenada e hidrogenada por 24 h. Um possível fator atribuído e citado pelo autor é a reposição constante do óleo durante o aquecimento. No presente trabalho, não foi efetuada a reposição do óleo ao longo de todo aquecimento, o que gera acúmulo de radicais livres e peróxidos para prosseguimento e aceleração das etapas de iniciação, propagação e terminação da oxidação lipídica.

Os teores encontrados de cobre e ferro antes do aquecimento estão expressos na Tabela 20, e estão compatíveis com outros estudos. Nunes *et al.* (2011) encontraram em óleo de soja, para os metais cobre e ferro, respectivamente: 1,17; 2,26 mg kg⁻¹. Almeida *et al.* (2019) encontraram os seguintes teores de Fe em óleo de canola: <0,02 e 0,78 ± 0,07 µg g⁻¹ e para óleo de soja 0,11 ± 0,02; 1,21 ± 0,07 µg g⁻¹. Lima (2016) encontrou os seguintes teores de cobre em óleos de soja: 0,60 ± 0,01; 0,77 ± 0,07; 0,71 ± 0,06 mg kg⁻¹.

Tabela 20. Determinação de metais (µg g⁻¹) nas amostras de óleo de soja e canola antes do aquecimento (n=3).

| Analito | Óleo de soja | Óleo de canola |
|---------|--------------|----------------|
| Ferro | 0,69 ± 0,05 | 0,58 ± 0,01 |
| Cobre | 0,08 ± 0,03 | 0,05 ± 0,02 |

Pequenas quantidades de metais como Fe e Ni, podem catalisar e aumentar o processo de oxidação de óleos vegetais, alterando suas características e propriedades (BARAN e YASAR, 2010; SHAHIDI, 2005). Os íons de metais de transição podem contribuir para a ocorrência da etapa de iniciação por uma variedade de mecanismos, tais como decomposição de hidroperóxidos e/ou peróxido de hidrogênio para gerar os radicais alcóxila, peróxila e hidroxila (YOSHIDA, FURUTA E NIKI, 1993).

Com relação a avaliação do aquecimento com adição de metais, verificou-se que para o óleo de soja, através da avaliação estatística usando ANOVA e teste de Tukey com nível de confiança de 95% (Tabela 21), há diferença significativa para formação de *trans* C18:1, *trans*

C18:2 e *trans* C18:3, comparando os experimentos com aquecimento com cloreto de ferro III e cloreto de cobre II.

Figura 18. Concentração de C18:1, 9t em óleo de soja durante 24 h de aquecimento, nas seguintes condições: sem adição de metal, com adição de Cloreto de ferro III ($50 \mu\text{g.kg}^{-1}$) (Fe 50) e Cloreto de cobre II ($50 \mu\text{g.kg}^{-1}$) (Cu 50).

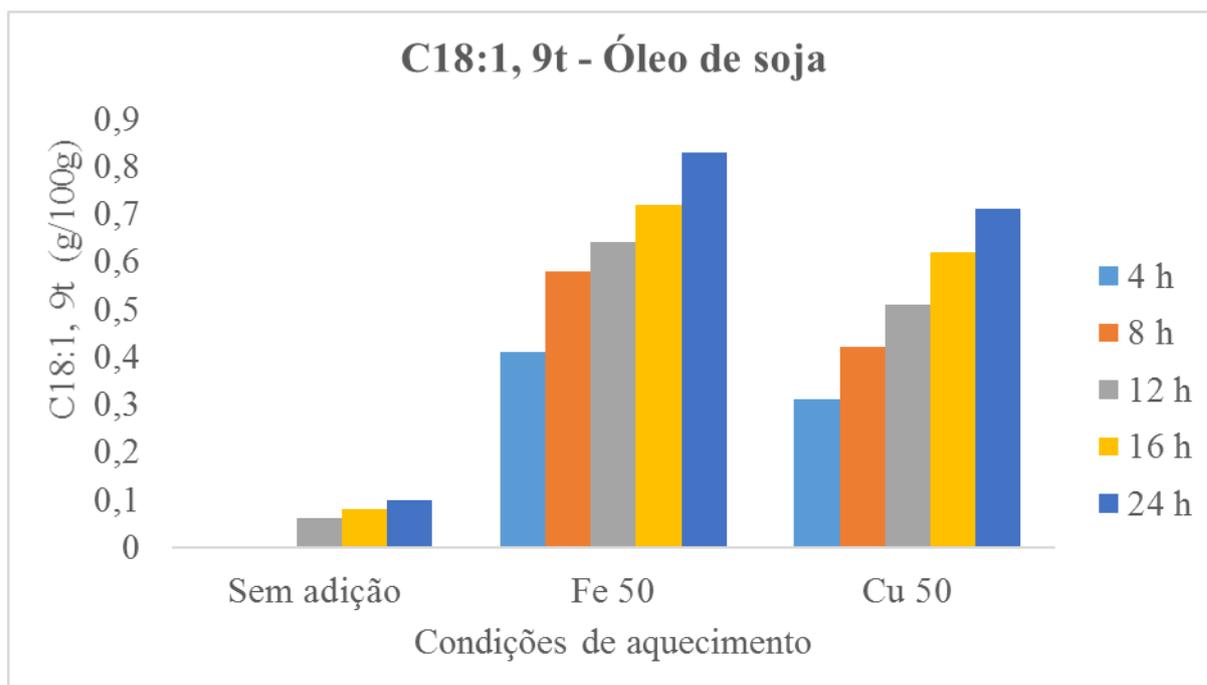
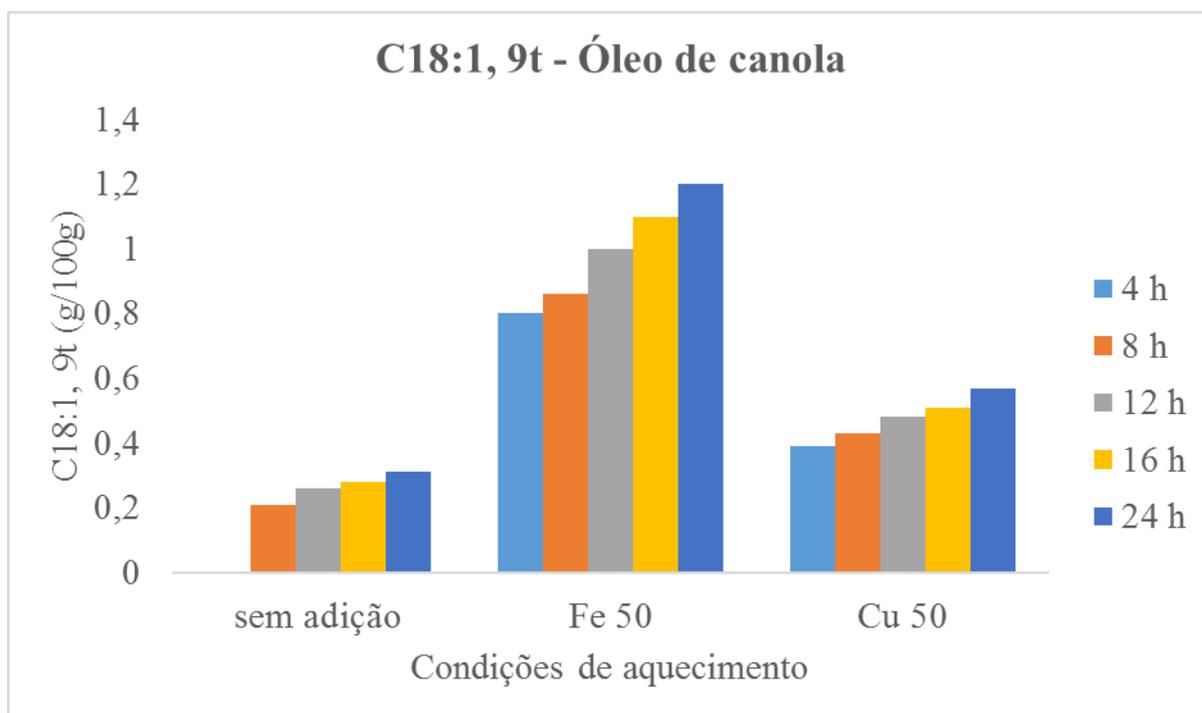


Figura 19. Concentração de C18:1, 9t em óleo de canola durante 24 h de aquecimento: sem adição de metal, com adição de Cloreto de ferro III ($50 \mu\text{g.kg}^{-1}$) (Fe 50) e Cloreto de cobre II ($50 \mu\text{g.kg}^{-1}$) (Cu 50).



As figuras 18 e 19 acima, demonstram uma maior formação do *trans* C18:1 quando o aquecimento foi realizado com metais. Para aquecimento com cloreto de ferro III a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, resultou em $0,71 \pm 0,01 \text{ g/100 g}$ no óleo de soja e $1,20 \pm 0,09 \text{ g/100 g}$ no óleo de canola. Vale ressaltar que o óleo de canola possui um teor 2,6 vezes maior de ácido oleico (C18:1 *cis*), o que justifica nas condições do experimento uma maior formação. Baltacıođlu (2017) quando realizou o processo de fritura de batatas em 3 ciclos de 4 min com uso de duas temperaturas (160 e 190°C) observou um aumento de AGT em óleo de canola, sendo a maior conversão observada para o ácido elaídico (C18:1 *trans*) com um valor de $0,18 \pm 0,04\%$.

Ghisi (2011) avaliou a influência dos metais Cu e Fe sobre a estabilidade oxidativa do biodiesel de soja pelo método Rancimat através do período de indução, os metais Cu^{+2} e Fe^{+3} foram adicionados nas amostras de biodiesel na forma de seus sais, e foram avaliados diferentes tempos de armazenamento das amostras. Devido ao efeito catalítico destes metais, a estabilidade oxidativa das amostras foi reduzida mesmo na presença de baixas concentrações dos metais. O efeito do Fe^{+3} sobre a estabilidade do biodiesel foi significativamente maior quando comparada ao Cu^{+2} .

Kala *et al.* (2012) confirmaram o poder catalisador do ferro, através do estudo da formação de ácido elaídico em óleos vegetais aquecidos a 175–185°C em três recipientes metálicos, visto que foi encontrada a seguinte ordem decrescente de formação: ferro fundido > Hindálio > aço inoxidável. O hindálio é um nome comercial da empresa Hindustan Aluminium Corporation Limited (Uttar Pradesh, Índia) e trata-se de uma liga de alumínio, magnésio, manganês, cromo e silício.

No presente estudo, o aquecimento do óleo de soja e canola a temperatura de 180°C formou os ácidos graxos *trans* a partir de 8 h sem a presença de alimentos, sendo que com a presença de ferro e cobre no óleo ocorreu em 4 h.

No entanto, não se pode afirmar que este aumento de concentração esteja somente relacionada com a ação catalisadora dos metais de transição adicionados, visto que a taxa de iniciação da oxidação lipídica é um processo multifatorial e depende de outros fatores além do tipo de metal como, por exemplo: ação de antioxidantes, estado de oxidação, potencial redox, disponibilidade de oxigênio, presença de hidroperóxidos, tipo de complexo formado, entre outros, fatores estes que muitas vezes não podem ser totalmente quantificados no experimento para uma completa rastreabilidade e correlação dos resultados.

Figura 20. Concentração de C18:2, 9c 12t e C18:2, 9t 12c em óleo de soja durante 24 h de aquecimento: sem adição de metal, com adição de Cloreto de ferro III (50 µg.kg-1) (Fe 50) e Cloreto de cobre II (50 µg.kg-1) (Cu 50).

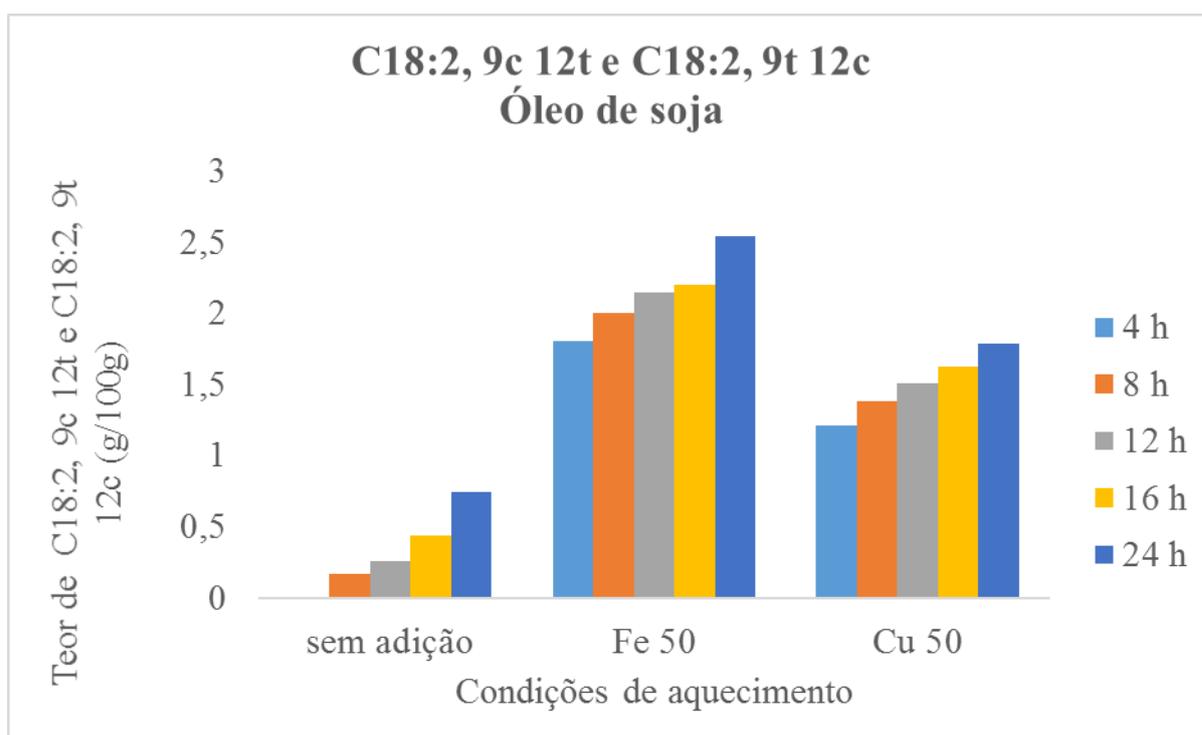
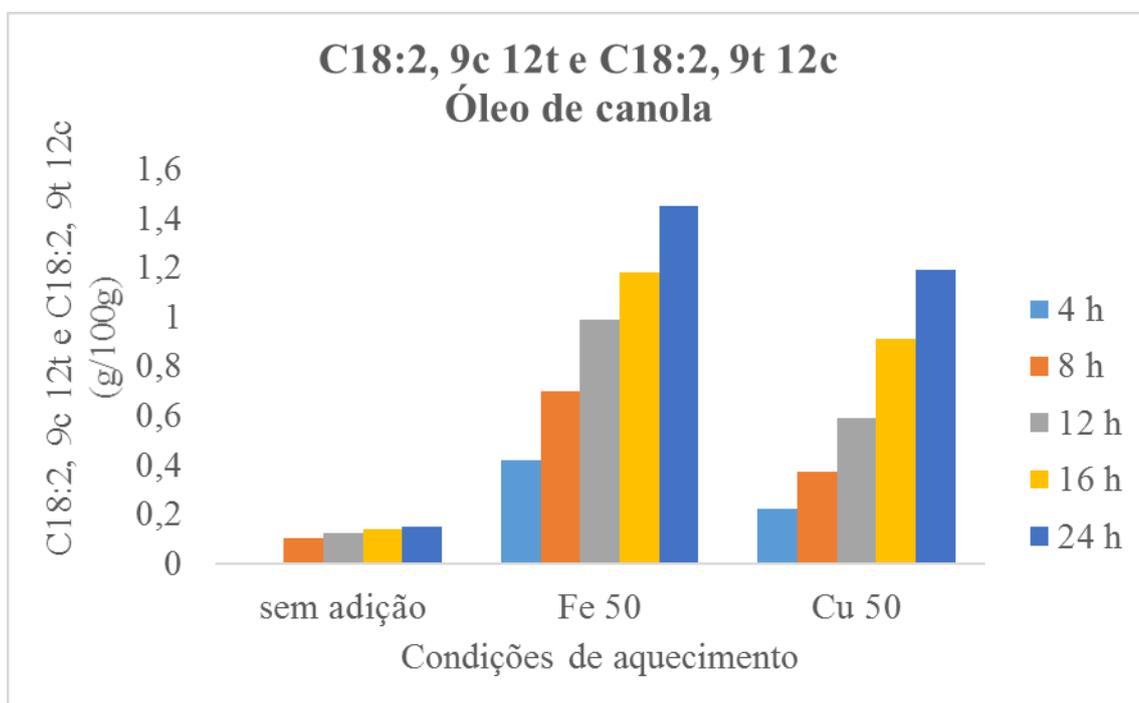


Figura 21. Concentração de C18:2, 9c 12t e C18:2, 9t 12c em óleo de canola durante 24 h de aquecimento: sem adição de metal, com adição de Cloreto de ferro III (50 µg.kg⁻¹) (Fe 50) e Cloreto de cobre II (50 µg.kg⁻¹) (Cu 50).



Para o óleo de soja foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) a partir da concentração de 30 µg.kg⁻¹ para C18:2, 9c 12t e C18:2, 9t 12c (Tabela 21). Para o óleo de canola, não foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) para *trans* C18:2 para os experimentos feitos nas mesmas concentrações dos diferentes metais (Tabela 22). Os cromatogramas das Figuras 16 e 17 demonstram esses resultados.

A figuras 20 e 21 demonstram que os aquecimentos com presença de metais geraram uma maior concentração dos ácidos graxos *trans* para os dois tipos de óleos, revelando a ação catalisadora, aumentando gradativamente conforme o aumento da concentração de metal. Segundo Shahidi (2005), os metais de transição têm habilidade de catalisar a formação de radicais livres, como na auto-oxidação de radicais livres. Estas moléculas contêm hidrogênio alílico que pode formar radicais livres, os quais reagem com oxigênio para formar hidroperóxidos. Ou seja, os íons metálicos que oxidam pela transferência de um elétron podem ser catalisadores ativos, que incluem: cobalto, ferro, cobre, manganês e vanádio.

O ferro demonstrou maior reatividade na oxidação lipídica com maior formação de *trans*. Alguns aspectos relacionados a isto são citados por Miller, Buettner e Aust (1990) que

informam que como a geometria de compostos de coordenação de Cu (I) e Cu (II) são tetraédricos e plana, respectivamente, pode ocorrer um impedimento cinético em reações redox envolvendo cobre. No caso do ferro, a geometria é normalmente octaédrica para os dois estados de valência. O efeito catalítico de cada metal é distinto e depende de fatores como estado de oxidação, potencial redox, tipo de solventes, disponibilidade de oxigênio, presença de hidroperóxidos e tipo de complexo formado.

O mecanismo mais simples para a catálise de metal envolve a transferência de elétrons de uma ligação de lipídios para um metal, levando à formação do radical. Em alguns casos, a formação de complexos ativados com O₂ pode ocorrer (SANTOS, 2012). Como as taxas de iniciação da oxidação lipídica é um processo multifatorial, resultados distintos podem ser encontrados entre experimentos de aquecimentos ou frituras de óleos comestíveis. Por exemplo, segundo Shahidi (2005), as reações que acontecem na etapa de iniciação da oxidação lipídica por metais redutores (Co²⁺, Fe²⁺, V²⁺, Cr²⁺, Cu⁺, Mn²⁺) ocorre por dois mecanismos diferentes, dependendo da disponibilidade de oxigênio no sistema e dos níveis de hidroperóxidos.

Figura 22. Concentração de C18:3 *trans* em óleo de soja durante 24 h de aquecimento: sem adição de metal, com adição de Cloreto de ferro III (50 µg.kg⁻¹) (Fe 50) e Cloreto de cobre II (50 µg.kg⁻¹) (Cu 50).

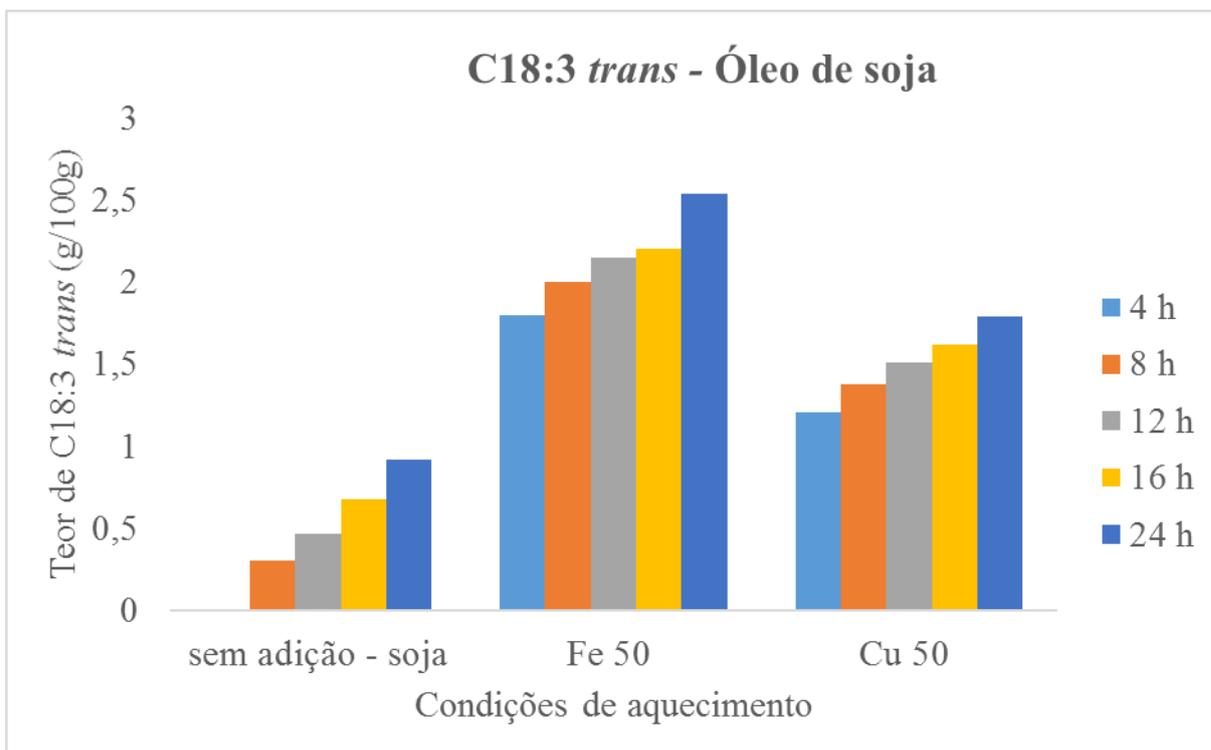
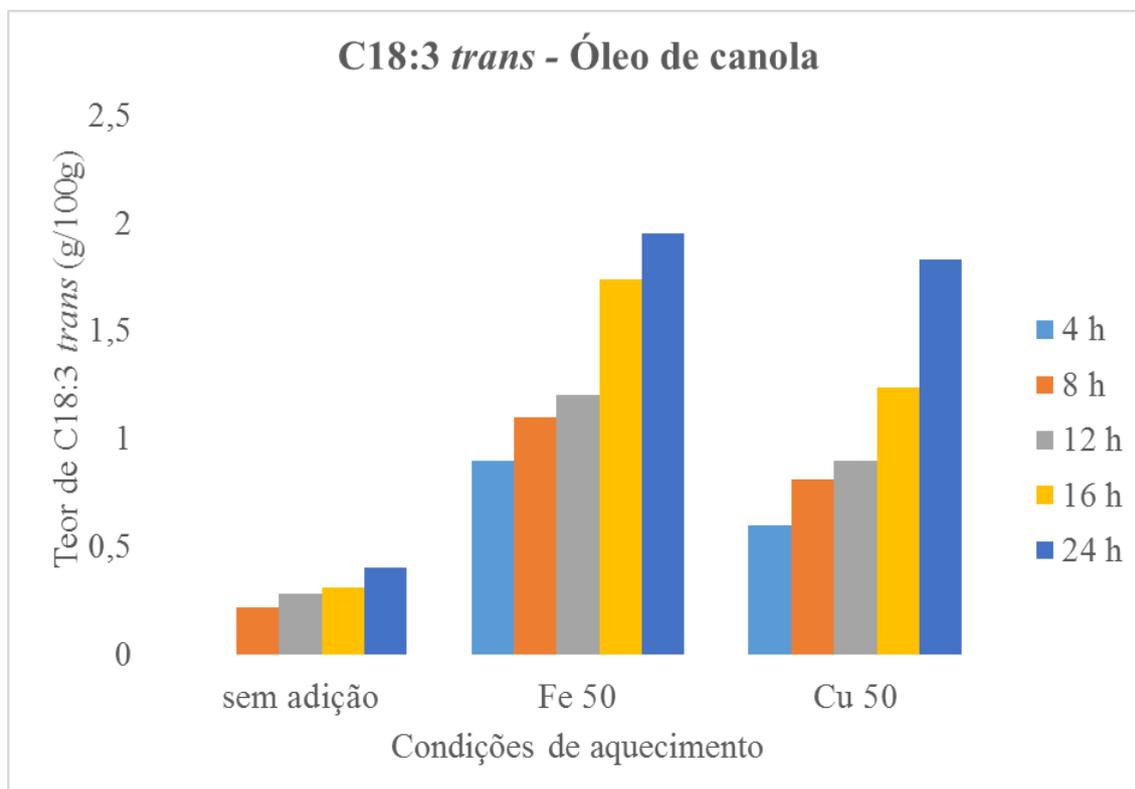


Figura 23. Concentração de C18:3 *trans* em óleo de soja durante 24 h de aquecimento: sem adição de metal, com adição de Cloreto de ferro III (50 µg.kg-1) (Fe 50) e Cloreto de cobre II (50 µg.kg-1) (Cu 50).



Com relação a formação de C18:3 *trans*, as figuras 22 e 23 demonstram a maior formação para o aquecimento com metais. Os teores foram maiores no óleo de soja ($2,54 \pm 0,08$ g/100g) do que canola ($1,95 \pm 0,04$ g/100g) para cloreto de ferro III a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, enquanto para cloreto de cobre II a $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, a maior formação foi para óleo de canola ($1,83 \pm 0,12$ g/100g). Vale ressaltar que os metais de transição, como Fe, Cu, Co e Mn que possuem dois ou mais estados de valência, afetam tanto a velocidade da oxidação quanto a direção da quebra dos hidroperóxidos formados durante a oxidação (PAZ e MOLERO, 2000; BOBBIO e BOBBIO, 2003; BASTOS e PEREIRA, 2010).

Em termos totais de ácidos graxos *trans* (g/100 g de óleo) formados no óleo submetido ao aquecimento com adição de metais, observa-se que há uma maior formação no óleo de soja em relação ao de canola. O que demonstra uma maior suscetibilidade do óleo de soja quando exposto a metal de transição.

Tabela 21. Composição de ácidos graxos *trans* em g/100 g durante aquecimento de óleo de soja a 180°C, com e sem a adição de metais.

| | Tempo (h) | Ácidos graxos <i>trans</i> (g/100 g de óleo) | | | | Total |
|---|-----------|--|------------------------|------------------------|------------------------|--------|
| | | C18:1, 9t | C18:2, 9c 12t | C18:2, 9t 12c | C18:3 <i>trans</i> | |
| Sem adição de metal | 0 | <0,005 | <0,005 | <0,005 | <0,02 | <0,035 |
| | 4 | <0,005 | <0,005 | <0,005 | <0,02 | <0,035 |
| | 8 | <0,005 | 0,09±0,01 ^b | 0,08±0,01 ^b | 0,30±0,05 ^c | 0,47 |
| | 12 | 0,06±0,01 ^c | 0,12±0,01 ^b | 0,14±0,01 ^b | 0,47±0,01 ^c | 0,79 |
| | 16 | 0,08±0,02 ^c | 0,21±0,01 ^b | 0,23±0,02 ^b | 0,68±0,02 ^c | 1,20 |
| | 24 | 0,10±0,02 ^c | 0,38±0,02 ^b | 0,36±0,02 ^b | 0,92±0,01 ^c | 1,76 |
| Cloreto de ferro III (10 µg.kg ⁻¹) | 4 | 0,25±0,05 ^b | 0,31±0,01 ^a | 0,30±0,02 ^a | 1,43±0,13 ^b | 2,29 |
| | 8 | 0,31±0,02 ^b | 0,46±0,01 ^a | 0,41±0,01 ^a | 1,62±0,18 ^b | 2,80 |
| | 12 | 0,41±0,03 ^b | 0,61±0,08 ^a | 0,52±0,03 ^a | 1,71±0,17 ^b | 3,25 |
| | 16 | 0,56±0,01 ^b | 0,71±0,05 ^a | 0,61±0,02 ^a | 1,78±0,11 ^b | 3,66 |
| | 24 | 0,71±0,05 ^b | 0,83±0,07 ^a | 0,77±0,04 ^a | 1,90±0,15 ^b | 4,21 |
| Cloreto de cobre II (10 µg.kg ⁻¹) | 4 | 0,18±0,01 ^a | 0,21±0,01 ^a | 0,18±0,01 ^a | 1,01±0,01 ^a | 1,58 |
| | 8 | 0,24±0,01 ^a | 0,28±0,02 ^a | 0,25±0,01 ^a | 1,21±0,02 ^a | 1,98 |
| | 12 | 0,32±0,01 ^a | 0,41±0,02 ^a | 0,31±0,02 ^a | 1,31±0,04 ^a | 2,35 |
| | 16 | 0,45±0,05 ^a | 0,58±0,03 ^a | 0,42±0,01 ^a | 1,45±0,03 ^a | 2,90 |
| | 24 | 0,61±0,01 ^a | 0,63±0,04 ^a | 0,54±0,05 ^a | 1,51±0,02 ^a | 3,29 |
| Cloreto de ferro III (30 µg.kg ⁻¹) | 4 | 0,28±0,06 ^b | 0,38±0,01 ^b | 0,32±0,02 ^b | 1,50±0,12 ^b | 2,48 |
| | 8 | 0,37±0,04 ^b | 0,49±0,01 ^b | 0,46±0,01 ^b | 1,70±0,10 ^b | 3,02 |
| | 12 | 0,51±0,08 ^b | 0,75±0,05 ^b | 0,72±0,01 ^b | 1,80±0,05 ^b | 3,78 |
| | 16 | 0,67±0,03 ^b | 0,89±0,02 ^b | 0,81±0,02 ^b | 1,90±0,08 ^b | 4,27 |
| | 24 | 0,72±0,05 ^b | 0,92±0,05 ^b | 0,88±0,03 ^b | 2,00±0,01 ^b | 4,52 |

| | Tempo (h) | Ácidos graxos <i>trans</i> (g/100 g de óleo) | | | | Total |
|---|-----------|--|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| | | C18:1, 9t | C18:2, 9c 12t | C18:2, 9t 12c | C18:3 <i>trans</i> | |
| Cloreto de cobre II (30 µg.kg ⁻¹) | 4 | 0,22±0,01 ^a | 0,24±0,01 ^a | 0,21±0,01 ^a | 1,14±0,03 ^a | 1,81 |
| | 8 | 0,34±0,01 ^a | 0,29±0,02 ^a | 0,26±0,02 ^a | 1,27±0,05 ^a | 2,16 |
| | 12 | 0,46±0,01 ^a | 0,47±0,03 ^a | 0,42±0,01 ^a | 1,42±0,07 ^a | 2,77 |
| | 16 | 0,59±0,02 ^a | 0,61±0,02 ^a | 0,58±0,03 ^a | 1,64±0,01 ^a | 3,42 |
| | 24 | 0,64±0,01 ^a | 0,81±0,01 ^a | 0,75±0,01 ^a | 1,81±0,08 ^a | 4,01 |
| Cloreto de ferro III (50 µg.kg ⁻¹) | 4 | 0,41±0,05 ^b | 0,45±0,08 ^b | 0,42±0,02 ^b | 1,80±0,12 ^b | 3,08 |
| | 8 | 0,58±0,05 ^b | 0,61±0,02 ^b | 0,54±0,03 ^b | 2,00±0,09 ^b | 3,73 |
| | 12 | 0,64±0,02 ^b | 0,78±0,06 ^b | 0,73±0,01 ^b | 2,15±0,05 ^b | 4,30 |
| | 16 | 0,72±0,04 ^b | 0,84±0,01 ^b | 0,81±0,01 ^b | 2,20±0,12 ^b | 4,57 |
| | 24 | 0,83±0,02 ^b | 1,12±0,05 ^b | 0,94±0,04 ^b | 2,54±0,08 ^b | 5,43 |
| Cloreto de cobre II (50 µg.kg ⁻¹) | 4 | 0,31±0,01 ^a | 0,32±0,02 ^a | 0,31±0,04 ^a | 1,21±0,06 ^a | 2,15 |
| | 8 | 0,42±0,02 ^a | 0,36±0,03 ^a | 0,34±0,02 ^a | 1,38±0,01 ^a | 2,50 |
| | 12 | 0,51±0,03 ^a | 0,48±0,05 ^a | 0,41±0,06 ^a | 1,51±0,01 ^a | 2,91 |
| | 16 | 0,62±0,02 ^a | 0,64±0,06 ^a | 0,62±0,02 ^a | 1,62±0,04 ^a | 3,50 |
| | 24 | 0,71±0,01 ^a | 0,79±0,07 ^a | 0,77±0,01 ^a | 1,79±0,05 ^a | 4,06 |

*Os valores são expressos como média ± desvio padrão de três repetições (LQ: limite de quantificação). Letras diferentes (a, b, c) na mesma coluna representam tratamentos que são significativamente diferentes (P <0,05)

Tabela 22. Composição de ácidos graxos *trans* em g/100 g durante aquecimento de óleo de canola a 180°C, com e sem a adição de metais.

| | Tempo (h) | Ácidos graxos <i>trans</i> (g/100 g de óleo) | | | | Total |
|---|-----------|--|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| | | C18:1, 9t | C18:2, 9c 12t | C18:2, 9t 12c | C18:3 <i>trans</i> | |
| Sem adição de metal | 0 | <0,005 | <0,005 | <0,005 | <0,02 | <LQ |
| | 4 | <0,005 | <0,005 | <0,005 | <0,02 | <LQ |
| | 8 | 0,21±0,02 ^a | 0,04±0,01 ^b | 0,06±0,01 ^b | 0,22±0,05 ^b | 0,53 |
| | 12 | 0,26±0,05 ^a | 0,05±0,01 ^b | 0,08±0,01 ^b | 0,28±0,03 ^b | 0,67 |
| | 16 | 0,28±0,07 ^a | 0,11±0,01 ^b | 0,16±0,02 ^b | 0,75±0,01 ^b | 1,30 |
| | 24 | 0,31±0,04 ^a | 0,23±0,02 ^b | 0,24±0,02 ^b | 1,25±0,02 ^b | 2,03 |
| Cloreto de ferro III (10 µg.kg ⁻¹) | 4 | 0,59±0,05 ^b | 0,11±0,01 ^a | 0,09±0,01 ^a | 0,67±0,09 ^a | 1,46 |
| | 8 | 0,65±0,02 ^b | 0,18±0,01 ^a | 0,13±0,01 ^a | 0,72±0,07 ^a | 1,68 |
| | 12 | 0,72±0,03 ^b | 0,21±0,01 ^a | 0,15±0,01 ^a | 0,81±0,06 ^a | 1,89 |
| | 16 | 0,83±0,01 ^b | 0,35±0,03 ^a | 0,29±0,03 ^a | 0,90±0,05 ^a | 2,37 |
| | 24 | 0,90±0,05 ^b | 0,47±0,02 ^a | 0,38±0,02 ^a | 1,61±0,09 ^a | 3,36 |
| Cloreto de cobre II (10 µg.kg ⁻¹) | 4 | 0,31±0,01 ^a | 0,07±0,01 ^a | 0,05±0,01 ^a | 0,51±0,09 ^a | 0,94 |
| | 8 | 0,38±0,03 ^a | 0,08±0,01 ^a | 0,07±0,01 ^a | 0,64±0,13 ^a | 1,17 |
| | 12 | 0,40±0,01 ^a | 0,15±0,02 ^a | 0,13±0,02 ^a | 0,71±0,09 ^a | 1,39 |
| | 16 | 0,43±0,05 ^a | 0,21±0,00 ^a | 0,18±0,00 ^a | 0,78±0,12 ^a | 1,60 |
| | 24 | 0,45±0,01 ^a | 0,28±0,02 ^a | 0,25±0,02 ^a | 1,42±0,08 ^a | 2,40 |
| Cloreto de ferro III (30 µg.kg ⁻¹) | 4 | 0,61±0,01 ^b | 0,18±0,01 ^a | 0,16±0,01 ^a | 0,84±0,04 ^a | 1,79 |
| | 8 | 0,73±0,04 ^b | 0,29±0,01 ^a | 0,23±0,01 ^a | 0,90±0,03 ^a | 2,15 |
| | 12 | 0,80±0,07 ^b | 0,37±0,02 ^a | 0,32±0,02 ^a | 1,10±0,06 ^a | 2,59 |
| | 16 | 0,91±0,06 ^b | 0,51±0,01 ^a | 0,49±0,01 ^a | 1,45±0,14 ^a | 3,36 |
| | 24 | 1,10±0,09 ^b | 0,69±0,03 ^a | 0,55±0,03 ^a | 1,76±0,37 ^a | 4,10 |

| | Tempo (h) | Ácidos graxos <i>trans</i> (g/100 g de óleo) | | | | Total |
|---|-----------|--|------------------------|------------------------|------------------------|-------|
| | | C18:1, 9t | C18:2, 9c 12t | C18:2, 9t 12c | C18:3 <i>trans</i> | |
| Cloreto de cobre II (30 µg.kg ⁻¹) | 4 | 0,35±0,07 ^a | 0,09±0,01 ^a | 0,07±0,01 ^a | 0,59±0,02 ^a | 1,10 |
| | 8 | 0,38±0,08 ^a | 0,17±0,01 ^a | 0,15±0,01 ^a | 0,71±0,04 ^a | 1,41 |
| | 12 | 0,42±0,01 ^a | 0,25±0,02 ^a | 0,21±0,02 ^a | 0,81±0,08 ^a | 1,69 |
| | 16 | 0,46±0,02 ^a | 0,37±0,00 ^a | 0,32±0,00 ^a | 0,92±0,05 ^a | 2,07 |
| | 24 | 0,50±0,04 ^a | 0,53±0,02 ^a | 0,47±0,02 ^a | 1,62±0,16 ^a | 3,12 |
| Cloreto de ferro III (50 µg.kg ⁻¹) | 4 | 0,80±0,01 ^b | 0,23±0,01 ^a | 0,19±0,01 ^a | 0,90±0,06 ^a | 2,12 |
| | 8 | 0,86±0,04 ^b | 0,39±0,01 ^a | 0,31±0,01 ^a | 1,10±0,07 ^a | 2,66 |
| | 12 | 1,00±0,07 ^b | 0,53±0,02 ^a | 0,46±0,02 ^a | 1,20±0,05 ^a | 3,19 |
| | 16 | 1,10±0,06 ^b | 0,61±0,01 ^a | 0,57±0,01 ^a | 1,74±0,03 ^a | 4,02 |
| | 24 | 1,20±0,09 ^b | 0,74±0,03 ^a | 0,71±0,03 ^a | 1,95±0,04 ^a | 4,60 |
| Cloreto de cobre II (50 µg.kg ⁻¹) | 4 | 0,39±0,02 ^a | 0,12±0,01 ^a | 0,10±0,01 ^a | 0,60±0,09 ^a | 1,21 |
| | 8 | 0,43±0,09 ^a | 0,21±0,01 ^a | 0,16±0,01 ^a | 0,81±0,07 ^a | 1,61 |
| | 12 | 0,48±0,03 ^a | 0,32±0,02 ^a | 0,27±0,02 ^a | 0,90±0,06 ^a | 1,97 |
| | 16 | 0,51±0,08 ^a | 0,48±0,00 ^a | 0,43±0,00 ^a | 1,24±0,01 ^a | 2,66 |
| | 24 | 0,57±0,01 ^a | 0,64±0,02 ^a | 0,55±0,02 ^a | 1,83±0,12 ^a | 3,59 |

*Os valores são expressos como média ± desvio padrão de três repetições (LQ: limite de quantificação). Letras diferentes (a,b,c) na mesma coluna representam tratamentos que são significativamente diferentes (P <0,05).

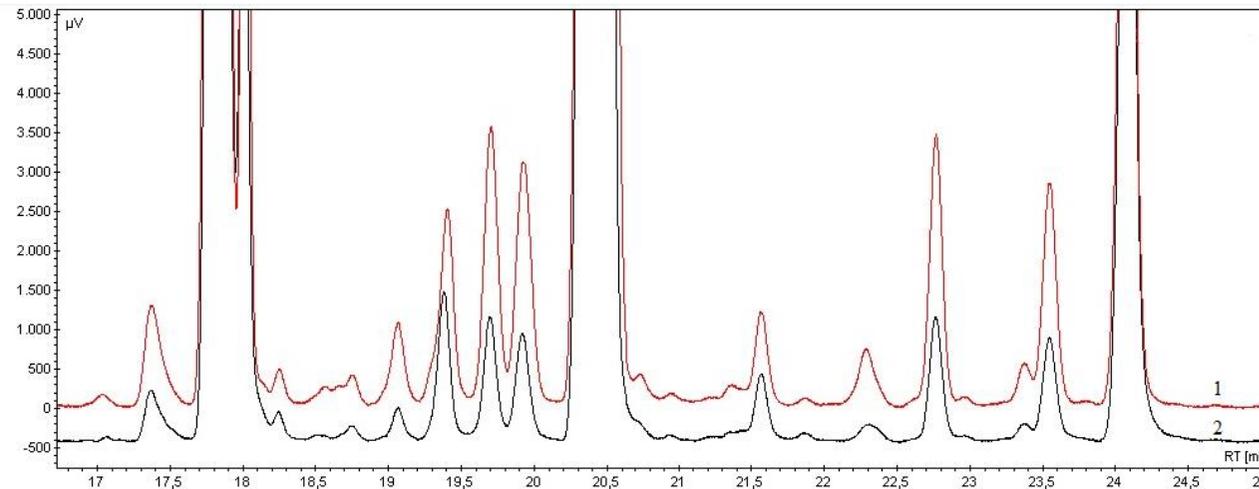


Figura 24. Cromatogramas (GC-FID) de amostras derivadas de óleo de soja aquecida por 16 h adicionada de metal. (1) Cloreto de ferro $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de óleo (2) Cloreto de cobre $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de óleo.

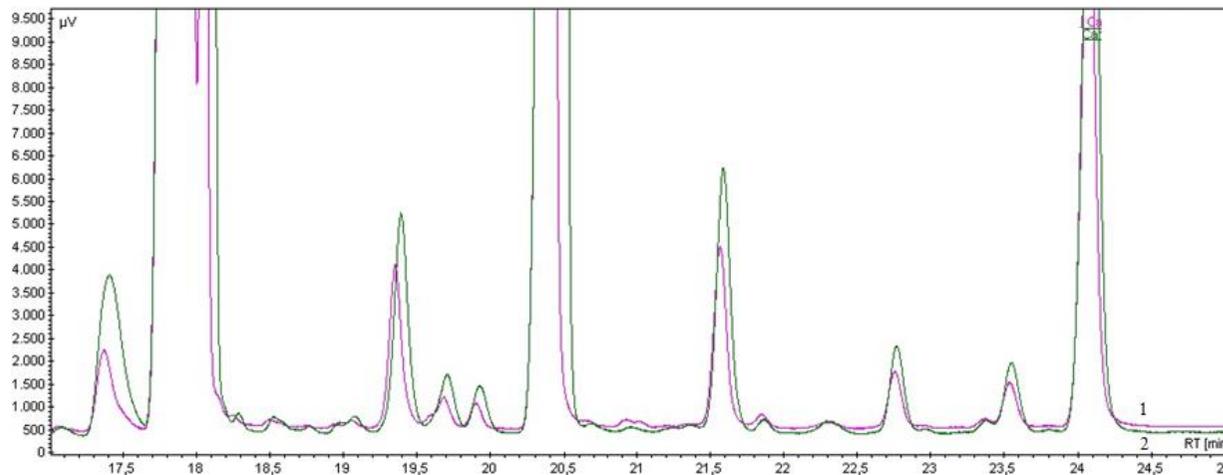


Figura 25. Cromatogramas (GC-FID) de amostras derivadas de amostra de óleo de canola aquecida por 16 h adicionada de metal. (1) Cloreto de cobre $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de óleo (2) Cloreto de ferro $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de óleo.

6. CONCLUSÕES

A otimização das condições de transesterificação foi executada com êxito através de um planejamento univariado. Através das figuras de mérito da validação, o método mostrou-se simples e eficiente, apresentando bons resultados de precisão, linearidade e exatidão.

O aquecimento com óleo de canola gerou mais compostos C18:1 *trans* e soja C18:2 *trans* e 18:3 *trans*. Os experimentos de aquecimento dos óleos sem adição de alimentos, a temperatura de fritura de $180\pm 5^{\circ}\text{C}$, com presença de metais Cu e Fe adicionados nas concentrações de $10\ \mu\text{g kg}^{-1}$; $30\ \mu\text{g kg}^{-1}$ e $50\ \mu\text{g kg}^{-1}$ geraram um aumento na formação dos ácidos graxos *trans* a partir de 4 h para os dois tipos de óleos. Sendo demonstrada uma maior suscetibilidade do óleo de soja quando exposto ao metal de transição.

Os resultados do presente trabalho são de grande importância para a comunidade em geral pois aborda a problemática relacionada à formação de AGT em óleos quando submetidos ao aquecimento, visto que é um tipo de processo comum tanto no ramo doméstico como industrial, mas que expõe o consumidor aos AGT que possuem efeitos adversos a saúde.

Especificamente com relação aos metais cobre e ferro, os mesmos podem estar presentes em utensílios e recipientes, e podemos afirmar que contribuíram com uma maior formação de AGT durante o aquecimento. Assim sendo, deve-se evitar realização de processos de frituras em materiais nos quais cobre e ferro fazem parte da liga metálica ou possam estar expostos por algum tipo de corrosão associada.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Avaliar a formação de isômeros *trans* em óleos comestíveis sem a presença de metais, seja através do uso de quelantes em óleos comerciais, aquisição de óleo comercial com ausência de metais ou produção do óleo em escala piloto em condições controladas de contaminação de metais. E assim dosar metais de transição com Cu, Fe e outros, para verificação do efeito catalítico mínimo e máximo.

Estudar o perfil térmico (curvas termogravimétricas) de antioxidantes naturais e sintéticos permitidos como aditivos em óleos e gorduras pela RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005 da ANVISA e dosar os mais resistentes em aquecimentos de óleos comestíveis com metais para avaliar a formação de ácidos graxos *trans*.

Avaliar a formação de isômeros *trans* a partir da foto-oxidação em óleos comestíveis (presença de luz e sensibilizantes).

Avaliar a formação de isômeros *trans* em óleos comestíveis na presença de metais em processo de fritura de batatas em diferentes temperaturas normalmente adotadas em fritadeiras.

Estudar a formação de isômeros *trans* em óleos comestíveis sob aquecimento na presença dos metais: Ni, Mn e Cr.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017. Requisitos Gerais para Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração.

ACKMAN, R. G.; HOOPER, S. N.; HOOPER, D. L.: Linolenic acid artefacts from the deodorization of oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 51, p. 42–49, 1974.

AHMAD, M. U. **Fatty Acids: Chemistry, Synthesis, and Applications**. Elsevier, 2017.

ALADEDUNYE, F. A.; PRZYBYLSKI, R. Degradation and nutritional quality changes of oil during frying. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 86, n. 2, p. 149–156, 2009a.

ALADEDUNYE, F.A; PRZYBYLSKI, R. Protection of oil during frying: a comparative study. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 893–901. 2009b.

ALBUQUERQUE, T.G.; COSTA, H.S.; CASTILHO, M.C.; SANCHES-SILVA, A. Trends in the analytical methods for the determination of *trans* fatty acids content in foods. **Trends in Food Science Technology**, v. 22, n.10, p.543–560, 2011.

ALLEN, L. B.; SIITONEN, P. H.; HAROLD, C.; THOMPSON, J.; Determination of copper, lead, and nickel in edible oils by plasma and furnace atomic spectroscopies. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v.75, p.477-481, 1998.

ALLEN, B.C.; VINCENT, M. J.; LISKA, D.; HABER, L. T. Meta-regression analysis of the effect of *trans* fatty acids on low-density lipoprotein cholesterol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 98, p.295–307, 2016.

ALMEIDA, J.S.; SANTOS, G.L.; BRANDÃO, G.C.; KORN, M.G.A.; TEIXEIRA, L.S.G. Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction using Doehlert matrix for simultaneous determination of Fe and Ni in vegetable oils by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, v. 273, p. 130–135, 2019

AOAC. Association of Oficial Analytical Chemists. Official methods of analysis. 18 ed. Gaithersburg, 2005.

AOCS. Method Ce 1h-05. **Determination of cis-, trans-, saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in vegetable or non-ruminant animal oils and fats by capillary GLC**. 2005.

ARO, A.; JAUHAINEN, M.; PARTANEN, R.; SALMINEN, I.; MUTANEN, M..Stearic acid, *trans* fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein lipids, apolipoproteins, lipoprotein(a), and lipid transfer proteins in healthy subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n. 5, p. 1419-1426, 1997.

ASCHERIO, A.; KATAN, M. B.; ZOCK, P. L.; STAMPFER, M. J.; WILLETT W. C. *Trans* fatty acids and coronary heart disease. **New England Journal of Medicine**, v. 340, p. 1994–1998, 1999.

ASCHERIO, A. *Trans* Fatty acids acids and blood lipids, **Atherosclerosis supplements**, v. 7, p. 25-27, 2006.

ASCN/AIN Task force on *trans* fatty acids: position paper on *trans* fatty acids. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.63, p.663-670, 1996.

ASSIS, Maria A. A. e NAHAS, Marcus V. Motivational aspect in programs of nutritional behavior changes. **Rev. Nutr.** v. 12, n.1, p.33-41. Campinas, jan/abr, 1999.

ASTRUP, A. The *trans* fatty acid story in Denmark. **Atherosclerosis Supplements**, v. 7, p. 43-46, 2006.

AUED-PIMENTEL, S. **Avaliação de procedimentos analíticos para a determinação de lipídios e ácidos graxos em produtos alimentícios**. 2007. 230 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

AUED-PIMENTEL, S.; KUMAGAI, E.E.; KUS, M.M.M.; CARUSO, M.S.F.; TAVARES, M.; ZENEON, O. Ácidos graxos *trans* em óleos vegetais refinados poli-insaturados comercializados no Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, 2009.

AUED-PIMENTEL, S; SILVA, S.A.; KUS, M.M.M.; CARUSO, M.S.F.; ZENEON, O. Avaliação dos teores de gordura total, ácidos graxos saturados e *trans* em alimentos embalados com alegação “livre de gordura *trans*”. **Brazilian Journal of Food Technology**. 2009; VII BMCFB.

BADOLATO, E.S.G. **Aspectos analíticos da determinação de ácidos graxos *trans* em margarinas e gorduras vegetais hidrogenadas**. 1997. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BANNON, C. D.; BREEN, G. J.; CRASKE, J. D.; HAI, N. T.; HARPER, N. L.; O’ROURKE, K. L. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. III. literature review of and investigations into the development of rapid procedures for the methoxide catalysed methanol of fats and oils. **Journal of Chromatography A**, v. 247, n. 1, p. 71 89, 1982a.

BANNON, C. D.; CRASKE, J. D.; HAI, N. T.; HARPER, N. L.; O’ROURKE, K. L. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. II. methylation of fats and oils with boron trifluoride methanol. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 247, n. 1, p. 63 69, 1982b.

BANSAL, G., ZHOU, W. B., TAN, T. W., NEO, F. L., & LO, H. L. Analysis of *trans* fatty acids in deep frying oils by three different approaches. **Food Chemistry**, 116, 535–541, 2009.

BARAN, E. K.; YASAR, S. B. Copper and iron determination with [N, N’-bis(salicylidene)-2,2’-dimethyl-1,3-propanediaminato] in edible oils without digestion. **Journal of the American Oil Chemists’ Society**, v. 87, p. 1389–1395. 2010.

BASTOS, L. C. S.; PEREIRA, P. A. P. Influence of Heating Time and Metal Ions on the Amount of Free Fatty Acids and Formation Rates of Selected Carbonyl Compounds during the Thermal Oxidation of Canola Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 24, p. 12777-12783, 2010.

BASTOS, L. C. S. **Estudo da formação de compostos carbonílicos, com ênfase em hidroxialdeídos α , β -insaturados, na fase líquida de óleo de soja aquecido e avaliação da influência de íons metálicos**. 2014. 148 f. Tese de doutorado – Instituto de Química – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

BENDSEN, N. T., CHRISTENSEN, R., BARTELS, E. M., & ASTRUP, A. Consumption of industrial and ruminant *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. **European Journal of Clinical Nutrition**, 65, 773–783. 2011.

BHARDWAJ, S.; PASSI, S.J.; MISRA, A. Overview of *trans* fatty acids: biochemistry and health effects. **Diabetes & metabolic syndrome: clinical research & reviews**, v. 5, p. 161-164, 2011.

BHARDWAJ, S.; PASSI, S.J.; MISRA, A.; KAMAL, K.P.; ANWAR, K.; PANDEY, R.M.; KARDAM, V. Effect of heating/reheating of fats/oils, as used by Asian Indians, on *trans* fatty acid formation. **Food Chemistry**, v 212, p. 663–670, 2016.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução a química de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2003. 150 p.

BOUWSTRA, H.; DIJCK-BROUWER, D.J.; DECSI, T.; BOEHM, G.; BOERSMA, E.R.; MUSKIET, F.A.; HADDERS-ALGRA, M. Neurologic condition of healthy term infants at 18 months: positive association with venous umbilical DHA status and negative association with umbilical *trans*-fatty acids. **Pediatric Research**. 2006, v. 59, 717.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Guia para Qualidade em Química Analítica: Uma Assistência a Acreditação, p. 80, v.1, 2004.

BRASIL. Guia alimentar para a população brasileira: promovendo a alimentação saudável Brasília. 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao>. Acesso: 13 de fevereiro de 2018.

BRASIL. Lei nº 8078, 11 de setembro de 1990. Diário Oficial. Brasília, 12 set, 1990. Seção I (supl.). p.1-12. Dispõe sobre a proteção do consumidor.

BROUWER, I.A. Effect of *Trans*-Fatty Acid Intake on Blood Lipids and Lipoproteins: A Systematic Review and Meta-Regression Analysis. Geneva: WHO. 2016.

CARPENTER, D. M, Ngeh-Ngwainbi J, Lee S. Lipid Analysis. In: Carpenter DE, Sullivan DM. Methods of analysis for nutritional labeling. Arlington: **AOAC International**. p 85-104.1993.

CERIANI, R.; MEIRELLES, A. J. A. Simulation of continuous physical refiners for edible oil deacidification. **Journal Food Engineering**, v. 76, n. 8, p. 261-71, 2006.

CHAJÈS, V.; THIÉBAUT, A.C.M.; ROTIVAL, M. et al. Association between serum *trans*-monounsaturated fatty acids and breast cancer risk in the E3N-EPIC study. **American Journal of Epidemiology**, 167, p. 1312–20, 2008.

CHARDIGNY, J.M.; BLOND, J.P.; BRETILLON, L.; MAGER, E.; POUILLAIN, D.; MARTINE, L.; VATELE, J.M.; NOEL, J.P.; SEBEDIO, J.L. Conversion of 18:3 Δ^9 *cis*, 12*cis*, 15*trans* in rats liver microsomes. **Lipids**, Champaign, v.32, p.731-735, 1997.

DORNI, C.; SHARMA, P.; SAIKIA, G.; LONGVAH, T. Fatty acid profile of edible oils and fats consumed in India. **Food Chemistry**, v. 238, p. 9–15, 2018.

CHEN, C. W.; CHONG, C. L.; GHAZALI, H. M.; LAI, O. M. Interpretation of triacylglycerol profiles of palm oil, palm kernel oil and their binary blends. **Food Chemistry**, v. 100, p. 178–191. 2007.

CHEN, Y.; YANG, Y.; NIE, S.; YANG, X.; WANG, Y.; YANG, M.; LI, C.; XIE, M. The analysis of *trans* fatty acid profiles in deep frying palm oil and chicken fillets with an improved gas chromatography method. **Food Control**, v. 44, p. 191 a 197. 2014.

CHIARA, V.L.; SILVA, R.; JORGE, R.; BRASIL, A.P. Ácidos graxos *trans*: doenças cardiovasculares e saúde materno infantil. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 341-349, 2002.

CHIARA, V.L.; SICHIERI, R.; CARVALHO, T.S.F. Teores de ácidos graxos *trans* de alguns alimentos consumidos no Rio de Janeiro, **Revista de nutrição**, v. 16, p. 227-233, 2003.

CHRISTIE, W. W. **Preparation of esters derivatives of fatty acids for chromatographic analysis**. In: *Advances in lipid methodology – two*. [S.L.]: [s.n.], 1993. p. 69-111. Disponível em: <http://www.lipid.co.uk/infores/topics/methests/index.htm>. Acesso em: 05 Out 2015.

CHRISTOPHERSON, S. W.; GLASS, R. L. Preparation of milk fat methyl esters by alcoholysis in an essentially nonalcoholic solution. **Journal Dairy Science**, v. 52, n. 8, p. 1289-90, 1969.

COSTA, N.; CRUZ, R.; GRAÇA, P.; BREDA, J.; CASAL, S. *Trans* fatty acids in the Portuguese food Market. **Food Control**, n. 64, p. 128 a 134, 2016.

CRAIG-SCHMIDT, C. M., Worldwide consumption of *trans* fatty acids. **Atherosclerosis Supplements**, v. 7, p. 1–4, 2006.

CUNHA, S.; RODRIGUES, A, M. C.; MATTOSA, R.R.; TEIXEIRA, L.S.G.; SANTOS, A.O.; SANTOS, E.V.; SOUZA, R.S.; ANDRADE, G.S.; PAULA, R.; JESUS, D.S. Experimento com abacate, borra de café, licuri e leite de coco para extração de óleo, produção de biodiesel e análise espectral. **Química Nova**, Vol. 41, No. 06, p. 691-698, 2018.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010, 900p.

DA SILVA, T. O.; PEREIRA, P. A. P. Influence of Time, Surface-to-Volume Ratio and Heating Process (Continuous or Intermittent) on the Emission Rates of Selected Carbonyl

Compounds during Thermal Oxidation of Palm and Soybean Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3129-3135, 2008

DELMONTE, P.; KIA, A.F.; KRAMER, J.K.G.; MOSSOBA, M.M. Separation characteristics of fatty acid methyl esters using SLB-IL111, a new ionic liquid coated capillary gas chromatographic column. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p.545–554, 2011.

DE SOUZA, R.J; MENTE, A.; MAROLEANU, A. et al. Intake of saturated and *trans* unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMJ**, n. 351, p. 1-16, 2015.

DIJKSTRA, A. J.; HAMILTON, R. J.; HAMM, W. **Trans fatty acids**, 1st ed. Oxford: Blackwell publishing. 2008.

DJOUSSE, L.; MATSUMOTO, C.; HANSON, N.Q.; WEIR, N.L.; TSAI, M.Y.; GAZIANO, J. M. Plasma *cis*vaccenic acid and risk of heart failure with antecedent coronary heart disease in male physicians. **Clinical Nutrition**, v. 33, p. 478–82, 2014.

DIXIT, S., DAS, M. Fatty Acid Composition Including *Trans*-Fatty Acids in Edible Oils and Fats: Probable Intake in Indian Population (pages T188–T199). **Journal of Food Science**, v. 77, T188–T199, 2012.

DODDS, E.D.; MCCOY, M.R.; REA, L.D.; KENNISH, J.M. Gas chromatographic quantification of fatty acid methyl esters: flame ionization detection vs. electron impact mass spectrometry. **Lipids**, v. 40, n. 4, p. 419-428, 2005.

DOGAN, I. JAVIDIPOUR, I.; AKAN, T. Effects of interesterified palm and cottonseed oil blends on cake quality. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 2, p. 157-164, 2007.

DOWNS, S.M.; THOW, A.M.; LEEDER, S.R. The effectiveness of policies for reducing dietary *trans* fat: a systematic review of the evidence. **Bull World Health Organ**, v. 91, p. 262–269H, 2013.

DUCHATEAU, G. S. M. L. E.; Van OOSTEN, H. J.; VASCONCELOS, M. A. Analysis of *cis*- and *trans*- fatty acid isomers in hydrogenated and refined vegetable oils by capillary gas-liquid chromatography. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 3, p. 275-82, 1996.

DUMONT, M. J.; NARINE, S. S. Soapstock and deodorizer distillates from North American vegetable oils: Review on their characterization, extraction and utilization. **Food Research International**, v. 40, n. 8, p. 957-74, 2007.

EDER, K. Gas chromatography analysis of fatty acid methyl esters. **Journal of chromatography B**, Amsterdam, v. 671, n. 1, p. 113 131, 1995.

ENDO, Y. Analytical Methods to Evaluate the Quality of Edible Fats and Oils: The JOCS Standard Methods for Analysis of Fats, Oils and Related Materials (2013) and Advanced Methods. **Journal of Oleo Science**, v. 67, n. 1, p. 1-10, 2018.

ERATTE, D.; DOWLING, K.; BARROW, C.; ADHIKARI, B. In-vitro digestion of probiotic bacteria and omega-3 oil co-microencapsulated in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. **Food Chemistry**, v. 227, p. 129–136, 2017.

ESTADELLA, D.; NASCIMENTO, C. M. P. O.; OYAMA, L. M.; RIBEIRO, E. B.; DAMASCO, A. R.; DE PIANO, A. Lipotoxicity: effects of dietary saturated and *trans* fatty acids. **Mediators of Inflammation**, n. 13, 2013.

FAHY, E.; SUBRAMANIAM, S.; MURPHY, R.C.; NISHIJIMAM, R.C.R.; SHIMIZU, T.; SPENER, F.; VANMEER, G.; WAKELAM, M.J.; DENNIS, E.A. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids. **The Journal of Lipid Research**, v. 50, p. S9–14, 2009.

FDA, Food and Drug Administration (2010). 21CFR101.9. Nutrition labeling of food. Disponível em: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm?fr=4101.9>. Acesso em: 20 jan 2014.

FDA, Final determination regarding partially hydrogenated oils, FDA Notice: docket No. FDA-2013-N-1317, **Federal Register**, vol. 80, pp. 34650–34670. 2015.

FLOCK, M.R.; KRIS-ETHERTON, P.M. Diverse physiological effects of long-chain saturated fatty acids: implications for cardiovascular disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 16, p. 133–140, 2013.

FREEDMAN, B.; BUTTERFIELD, R.O.; PRYDE, E.H. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 63, n. 10, p. 1375-1380, 1986.

GALVÍN, S.; SANS, R.G.; GALBIS, J.A; CHOZAS, M.G. *Trans* fatty acids in two classes of reformulated “zero *trans*” Spanish margarines by use of second derivative ATR-FT-IR spectroscopy. **Food Science and Technology**, v.65, p.66-71, 2016.

GANGULY, R.; LAVALLEE, R.; MADDAFORD, T. G.; DEVANEY, B.; BASSETT, C. M. C.; EDEL, A. L.; *et al.* Ruminant and industrial *trans*-fatty acid uptake in the heart. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 31, p. 60–66, 2016.

GARRIDO, M.D.; FRIAS, I.; DIAZ, C.; HARDISSON, A. Concentrations of metals in vegetable edible oils. **Food Chemistry**, v. 50, p. 237-243, 1994.

GERTZ, C. Chemical and physical parameters as quality indicators of used frying fats. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, n. 8–9, p. 566–572, 2000.

GÓMEZ, Maria Elena de los Dolores Bernal. **Modulação da Composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta.I. Estabilidade oxidativa**. 2003. Tese (Doutorado em Bromatologia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

GOYAL, N.; SUNDARARAJ, P. Are we unknowingly consuming *trans* fats and abused oils? **NFI Bull**, v. 30, n. 2, p. 4-7, 2009.

GOTOH, N.; KAGIONO, S.; YOSHINAGA, K.; MIZOBE, H.; NAGAI, T.; YOSHIDA, A.; BEPPU, F.; NAGAO, K. Study of *Trans* Fatty Acid Formation in Oil by Heating Using Model Compounds. **Journal of Oleo Science**, v. 67, n. 3, p. 273-281. 2018.

GRANDGIRARD, A; S'EB'EDIO, J.L.; FLEURY, J. Geometrical isomerization of linolenic acid during heat treatment of vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 1563–1568, 1984.

GRAY, J.I.; RUSSELL, L.F. Hydrogenation catalysts – their effect on selectivity. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 56, p. 36– 56, 1979.

GONÇALVES, R. P.; MARÇO, P. H.; VALDERRAMA, P. Thermal edible oil evaluation by UV-Vis spectroscopy and chemometrics. **Food Chemistry**, v. 163, p. 83-86, 2014.

GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; PADLEY, P. **The Lipid Handbook**, 2a ed., Chapman and Hall, London. 1994.

GUTNIKOV, G. Fatty acid profiles of lipid samples. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 671, n. 1-2, p. 71 89, 1995.

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids, **Lab. Pract.**, v. 22, p. 475–476, 1973.

HOLANDA, M. A. C.; HOLANDA, M. C. R.; MENDONÇA JÚNIOR, A. F. Suplementação dietética de lipídios na concentração de ácido linoleico conjugado na gordura do leite. **Acta Veterinaria Brasilica, Mossoró**, v.5, n.3, p.221-229, 2011.

HOU, J.; JIANG, L.; ZHANG, C. Effects of frying on the *trans*-fatty acid formation in soybean oils. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, p. 287–293, 2012.

HUA, X.; TANAKAA, N.; GUOA, R.; LU, Y.; NAKAJIMAA, T.; GONZALEZ, F.J.; AOYAMA, T. PPAR α protects against *trans*-fatty-acid-containing diet-induced steatohepatitis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 39, p. 77–85, 2017.

HUANG, X.; NIE, S.; YANG, M.; XIE, J.; LI, C.; XIE, M. Are Chinese Edible Oils Safe? A Survey of *Trans* Fatty Acid Contents in Chinese Edible Oils. **Food Sci. Biotechnol.** V. 25, n. 2, p. 631-636, 2016.

IARC - International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of carcinogenic risk chemicals to humans**. Preamble, 2006. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Preamble/CurrentPreamble.pdf>. Acesso em: 28 jan 2018.

INMETRO. Coordenação Geral de Acreditação. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008. Revisão 06 – Nov/2017.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. ed. 4, São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, p. 1020, 2008.

International Conference on Harmonisation (ICH); Guidance for Industry Q2B: Text on Validation of Analytical Procedures, November 1996.

ISO 12966-1:2014. Animal and vegetable fats and oils-Gas chromatography of fatty acid methyl esters-Part 1: Guidelines on modern gas chromatography of fatty acid methyl esters, 2014.

ISO 5509:2000. Animal and Vegetable Fats and Oils: Preparation of Methyl Esters of Fatty Acids, International Organization for Standardization, London, 2000.

ISO GUIA 34. Requisitos gerais para a competência de produtores de material de referência. 2012.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. **Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives**. Method 2.301; Report of IUPAC Working Group WG 2/87. 7 ed. [S.L.]: Blackwell Scientific Publications, 1987.

IUPAC. International Union of Pure and Applied Chemistry. **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis**. Pure Appl. Chem., v. 74, n. 5, p. 835-855, 2002.

JENKIS, T. C. Lipid metabolismo in the rumen. In: Symposium: Advances in ruminant lipid metabolismo. **Journal of Dairy Science**, Chapaing, Savoy, v. 76, p. 3851-3863, 1993.

JIMÉNEZ, M. S.; VELARTE, R.; CASTILLO, J. R.; On-line emulsions of olive oil simples and ICP-MS multi-elemental determination. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 18, p.1154-1162. 2003.

JORGE, N. **Química e tecnologia de óleos vegetais**. São Paulo: Cultura Acadêmica: Universidade Estadual Paulista, Pró-Reitoria de Graduação, 2009.

KALA, A.; JOSHI, V.; GURUDUTT, K. Effect of heating oils and fats in containers of different materials on their *trans* fatty acid content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, p. 2227–2233, 2012.

KATAN, B.M., Regulation of *trans* fats: The gap, the Polder. And McDonald's french fries. **Atheroscler. Suppl**, v. 7, p. 63–66, 2006.

KATZ, A.M. Should *trans* fatty acids be viewed as membrane-active drugs? **Atherosclerosis Supplements**, v. 7, n. 2, p. 41-42. 2006.

KEBEDE, B.T.; GRAUWET, T.; TABILO-MUNIZAGA, G.; PALMERS, S.; VERVOORT, L.; HENDRICKX, M.; LOEY, A.V. Headspace components that discriminate between thermal and high pressure high temperature treated green vegetables: identification and linkage to possible process-induced chemical changes, **Food Chemistry**, v. 141, p. 1603–1613, 2013.

KHAN, M. U.; HASSAN, M. F.; RAUF, A. Determination of *trans* Fat in Selected Fast Food Products and Hydrogenated Fats of India Using Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy. **Journal of oleo Science**, v. 66, n. 3, p. 251-257, 2017.

KHANAL, R.C.; DHIMAN, T.R. Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): a review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 3, p. 72– 81. 2004.

KIM, B. H., LUMOR, S. E., & AKOH, C. C. *Trans*-Free margarines prepared with canola oil/Palm stearin/Palm kernel oil-based structured lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8195-8205, 2008.

KIM, E. J. HUWS, S. A. LEE, M. R. F. SCOLLAN, N. D. Dietary Transformation of Lipid in the Rumen Microbial Ecosystem. **Journal of Animal Science**, v. 22, n. 9, p. 1341-1350, 2009.

KINSELLA, J.E.; BRUCKNER, G.; MAI, J.; SHIMP J. Metabolism of *trans* fatty acids with emphasis on the effects of *trans,trans*-octadecadienoate on lipid composition, essential fatty acid, and prostaglandins: an overview. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 34, p. 2307-2318, 1981.

KOH, S.P.; ARIFI, N. N.; TAN, C.P.; YUSOFF, M.S.A.; LONG, K.; LAI, O.M. Deep frying performance of enzymatically synthesized palm-based medium- and long-chain triacylglycerols (MLCT) oil blends. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 124–35, 2008.

KOJIMA, Y.; PARCELL, J.; CAIN, J. A Global Demand Analysis of Vegetable Oils for Food and Industrial Use: A Cross-Country Panel Data Analysis with Spatial Econometrics. In 2016 Annual Meeting, July 31-August 2, 2016, Boston, Massachusetts (No. 235744). Agricultural and Applied Economics Association. 2016.

KOLETZKO, B.; MULLER, J. *Cis*- and *Trans*-Isomeric Fatty Acids in Plasma Lipids of Newborn Infants and Their Mothers. **Biology of the Neonate**, v. 57, n. 3-4, 1990.

KONING, S.; MEER, B.V.; ALKEMA, G.; JANSSEN, H.; BRINKMAN, U.A.T. Automated determination of fatty acid methyl ester and *cis/trans* methyl ester composition of fats and oils. **Journal of Chromatography A**, v. 922. p. 391–397, 2001.

KOSTIK, V.; MEMETI, S.; BAUER, B. Fatty acid composition of edible oils and fats. **Journal of Hygienic Engineering and Design**, v. 4, p. 112–116. 2013

KRAMER JKG, BLACKADAR CB, ZHOU J. Evaluation of two GC columns (60-m SUPELCOWAX 10 and 100 m CP-Sil 88) for analysis of milkfat with emphasis on CLA,18:1, CC18:2 and C18:3 isomers, and short- and long-chain FA. **Lipids**, v. 37, p. 823-835, 2002.

KRAMER, J.K.G.; HERNANDEZ, M.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; KRAFT, J.; DUGAN, M. Combining results of two GC separations partly achieves determination of all *cis* and *trans* 16:1, 18:1, C18:2 and 18: 3 except CLA isomers of milk fat as demonstrated using ag-ion SPE fractionation. **Lipids**, v. 43, n. 3, p. 259-273, 2008.

KUS, Mahyara Markievicz Mancio. **Determinação de ácidos graxos poliinsaturados em fórmulas infantis: comparação de metodologias na análise por cromatografia em fase gasosa**. 2009. 196p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

LA PERA, L.; LO COCO, F.; MAVROGENI, E.; GIUFFRIDA, D.; DUGO, G. MO. Determination of Copper (II). Lead (II). Cadmium (II) and Zinc (II) in virgin olive oils produced in Sicily and Apulia by Derivative Potentiometric Stripping Analysis. **Italian Journal of Food Science**, v. 14, p. 389–399, 2002.

LANÇAS, F.M. Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE. 1 ed. Campinas. Átomo, 2009.

LEE, J. H., AKOH, C. C., HIMMELSBACH, D. S., & LEE, K. Preparation of interesterified plastic fats from fats and oils free of *trans* fatty acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 4039-4046, 2008.

LETH, T. et al. The effect of the regulation on *trans* fatty acid content in Danish food. **Atherosclerosis Supplements**, v. 7, 53-56. 2006.

LIMA, A. F. **Desenvolvimento de métodos para a determinação de metais em diferentes partes do cultivo da soja: solo, fertilizante, tecido foliar, farelo e óleo**. 2016. 115 f. Tese de doutorado – Faculdade de Química – Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2016.

LIU, W. H.; INBARAJ, B. STEPHEN; CHEN, B. H. Analysis and formation of *trans* fatty acids in hydrogenated soybean oil during heating. **Food Chemistry**, vol. 104, no. 4, p. 1740-1749, 2007.

LOI, L.; CHARDIGNY, J.-M.; ALMANZA, S.; LECLERE, L.; GINIS, C.; SEBEDIO, J.-L. Incorporation and metabolism of dietary *trans* isomers of linolenic acid alter the fatty acid profile of rat tissues. **The Journal of Nutrition**, v.130, p.2550-2555, 2000.

LOTTENBERG, A.M.; AFONSO, Mda. S.; LAVRADOR, M.S.; MACHADO, R.M.; NAKANDAKARE, E.R. The role of dietary fatty acids in the pathology of metabolic syndrome. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, p.1027–40, 2012.

LUTHEIA, D.L. **Oil extraction and analysis. Critical issues and comparative studies**, Champaign (IL): AOCS press; 2004.

MAIA, E.L.; AMAYA, D.B.R. Avaliação de um método simples e econômico para amidação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes, **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 53 p. 27–35, 1993.

MAIA M. R. G.; CHAUDHARY, L. C.; BESTWICK; C. S.; RICHARDSON, A. J.; MCKAIN, N.; LARSON, T. R.; GRAHAM, I. A.; WALLACE, R. J. Toxicity of unsaturated fatty acids to the biohydrogenating ruminal bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*. **BMC Microbiology**, n.10, n.52, p. 1-10, 2010.

MAIA, M. R. G.; CHAUDHARY, L. C.; FIGUERES, L.; WALLACE, R. J. Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie van Leeuwenhoek*, Amsterdam, v. 91, n. 4, p. 303–314, 2007.

MALHEIRO, R., OLIVEIRA, I., VILAS-BOAS, M., FALCÃO, S., ET AL. Effect of microwave heating with different exposure times on physical and chemical parameters of olive oil. *Food and Chemical Toxicology*, v. 47, p. 92–97, 2009.

MANTZIORIS, E.; JAMES, M.J.; GIBSON, R.A.; CLELAND, L.G. Dietary substitution with α -linolenic acid-rich vegetable oil increases eicosapentaenoic acid concentrations. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Bethesda, v.59, p.1304-1309, 1994.

MARTIN, C. A.; CARAPELLI, R.; VISANTAINER, J. V.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E. *Food Chemistry*, v. 93, p. 445. 2005.

MARTIN, C.A.; MILINSK, M.C.; VISENTAINER, J.V.; MATSUSHITA, M, DE-SOUZA NE. *Trans* fatty acid-forming processes in foods: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 79, n. 2, p. 343–50. 2007.

MARTINS, M. B et al. Properties of Omega-3 polyunsaturated fatty acids obtained of fish oil and flaxseed oil. *Rev Inst Ciênc Saúde*. v. 26, n. 2, p. 153-6, jun. 2008.

MEHER, L. C.; SAGAR, D. V.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Golden, v. 10, n. 3, p. 248 268, 2006.

MENAA, F.; MENAA, A.; TR'ETON, J.; MENAA, B. Technological Approaches to Minimize Industrial *Trans* Fatty Acids in Foods. *Journal of Food Science*, v. 78, n. 3, p. 377-386. 2013.

MENEGHETTI, S.P.; MENEGHETTI, M.R.; BRITO, Y.C. A Reação de *Transesterificação*, Algumas Aplicações e Obtenção de Biodiesel, *Revista Virtual de Química*, v. 5, n. 1, 2013.

MENEGHETTI, M. R.; MENEGHETTI, S. M. P.; BARBOSA, D. C.; SERRA, T. M. *BiodieselBR*, v. 62, n. 10, 2009.

METCALFE, L. D.; WANG, C. N. Rapid preparation of fatty acid methyl esters using organic base catalysed *transesterification*. *Journal of Chromatography Science*, v. 19, n. 10, p. 530 535, 1981.

MILINSK, M.C.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J.V.; DIAS, L.F.; YAMAGUCHI, M.M.; PEDRÃO, M.R.; SOUZA, N.E. Influence of the esterification method on the quantification of olive oil fatty acids. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 32, n. 2, p. 139-150, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 306, de 7 de dez. 2004. **Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde**. Diário Oficial da União, 10 dez. 2004. Seção I:15-18.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância Sanitária. Rótulo de alimentos | Saiba o que você está comendo neste fim de ano. 23 de Dezembro de 2013. Disponível em: <http://www.blog.saude.gov.br/promocao-da-saude/33435-rotulo-de-alimentos-saiba-o-que-voce-esta-comendo-neste-fim-de-ano>. Acesso em: 26 Fev 2019.

MORETTO, E.; FETT, R.; GONZAGA, L.V.; KUSKOSKI, E.M. **Introdução à ciência de alimentos**. Florianópolis: Ed. da UFSC; 2002. 255 p.

MOSS, J. Labeling of *trans* fatty acid content in food, regulations and limits – The FDA view. *Atherosclerosis Supplements*, v.7, p. 57-59, 2006.

MOSSOBA, M.M.; KRAMER, J.K.G. **Official Methods for the determination of *trans***, 2nd Edition, AOCS Press. 2009.

MOURA, J.M.L.N; GONÇALVES, L.A.G.; GRIMALDI, R.; SOARES, M.S.; RIBEIRO, A.P.B. Otimização das condições de produção de ésteres etílicos a partir de óleo de peixe com elevado teor de ácidos graxos ω -3. **Química Nova**, Vol. 29, No. 5, 956-959, 2006.

MOZAFFARIAN, D.; KATAM, M.B.; ASCHERIO, A.; STAMPIER, M.J.; Willet. *Trans* fatty acids and cardiovascular disease. **New England Journal of Medicine**, v. 354; p. 1601-1613. 2006.

MOZAFFARAIN, D.; ARO, A.; WILLET, W. C. Health effects of *trans*-fatty acids: experimental and observational evidence. **European Journal of Clinical Nutrition**, n. 63, S5 a S21, 2009.

NEFF, M. R.; BHAVSAR, S. P.; BRAEKEVELT, E.; ARTS, M. T. Effects of diferente cooking methods on fatty acid profiles in four vegetable salad water fishes from the Laurentian great lakes region. **Food Chemistry**, v. 164, p. 544–550, 2014.

NGADI, M. O., WANG, Y., ADEDEJI, A. A., RAGHAVAN, G. S. V., Effect of microwave pretreatment on mass *transfer* during deep frying of chicken nuggets. **LWT-Food Sci. Technol**, v. 42, p. 438–440, 2009.

NOOR LIDA, H. M. D.; MISKANDAR, M. S. RAFIDAH, A. H., NOHAMMAD RODDY, R. Pilot plant service for continuous enzymatic interesterification of oils and fats. <http://palmoilis.mpob.gov.my/publications/TOT/TS151-Noorlida.pdf>. 2015.

NOVELLO, D.; FRANCESCHINI, P.; QUINTILIANO, D.A. The ω -3 and ω -6 fatty acids importance for disease prevention and in the human health. **Revista Salus**. v. 2, n. 1, p. 77-87. Guarapuava, jan/jun. 2008.

NUNES, L. S.; BARBOSA, J. T. P.; FERNANDES, A. P.; LEMOS, V. A.; SANTOS, W. N. L.; KORN, M. G.; TEXEIRA, L. S. G. Multi-element determination of Cu, Fe, Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry and microemulsion sample preparation. **Food Chemistry**, v. 127, p.780–783, 2011.

NWOKOCHA, CH. R.; NWOKOCHA, M. I.; OWU, D. U.; OBI, J.; OLATUNDE, B.; EBE, CH.; NWANGWU, O.; IWUALA, M. O. Comparative analysis on the effect of palm oil

(*Elaeis guineensis*) in reducing cadmium and lead accumulation in liver of Wistar rats. **Pharmacognosy Research**, v. 4, p. 214–218. 2012.

O'BRIEN, R. D. **Fats and oils: Formulating and processing for applications**. 3rd. ed. CRC Press, 2009. 765p.

O'BRIEN, R. D. **Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications**. 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL. 2000.

O'BRIEN, R. D. **Fats and Oils: Formulating and Processing for Applications**, Technomic Publishing Company: Lancaster, 1998.

OMS - Organização Mundial da Saúde. Manual de segurança biológica em laboratório. 3ed. Genebra: OMS; 2004b.

PÉREZ-PALACIOS, T.; RUIZ, J.; MARTÍN, D.; MURIEL, E.; ANTEQUERA, T. Comparison of different methods for total lipid quantification in meat and meat products, **Food Chemistry**, v. 110, p. 1025–1029, 2008.

QUINTAES, K. D.; AMAYA-FARFA, J.; TOMAZINI, F. M.; MORGANO, M. A.; MANTOVANI, D. M. B. Migração de minerais de panelas brasileiras de aço inoxidável, ferro fundido e pedra-sabão (esteatito) para simulantes de alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.24, n.3, p. 397- 402, 2004.

RASHID, N.A.; KAMARULZAMAN, N.A.; OMAR, Z. Influence of enzymatic and chemical interesterification on crystallization properties of refined, bleached and deodourised (RBD) palm oil and RBD palm kernel oil blends. **Food Research International**, v. 106, p. 982–991, 2018.

RATNAYAKE, W. M. N. Overview of methods for the determination of *trans* fatty acids by gas chromatography, silver-ion thin layer chromatography, silver-ion liquid chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal AOAC International**, v. 87, n. 2, p. 523-39, 2004.

RATNAYAKE, W. M., GALLI, C. Fat and fatty acid terminology, methods of analysis and fat digestion and metabolism: a background review paper. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 55, p. 8–43. 2009.

RATNAYAKE, W.M.N.; HANSEN, S.L.; KENNEDY, M.P. Evaluation of the CP-Sil 88 and SP-2560 GC columns used in the recently approved AOCS official method Ce 1h-05: Determination of *cis*-, *trans*-, saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids in vegetable or non-ruminant animal oils and fats by capillary GLC method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, p. 475-488, 2006.

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. **Óleos e gorduras: Aplicações e implicações**. Revista Analytica. Fevereiro/ Março 2007. Nº 27.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, A.P.B.; MOURA, J.M.L.; GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L. A.G. Interesterificação química: alternativa para obtenção de gordura zero *trans*. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1295-1300, 2007.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. Química de alimentos. 1ª edição; p.157; SP: 2004.

RICHTER, E.K.; SHAWISH, K.A.; SCHEEDER, M.R.; COLOMBANI P.C. *Trans* fatty acid content of selected Swiss foods: the *Trans* Swiss Pilot study. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, p. 479-484, 2009.

ROBERTS, L.D.; MCCOMBIE, G.; TITMAN, C.M.; GRIFFIN, J.L. A matter of fat: an introduction to lipidomic profiling methods. *J. Chromatogr. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. Life Sci., v. 871, n. 2, p. 174-181, 2008.

RIOS, R.V.; LANNES, S.C.S. **Efeitos da substituição de gordura vegetal hidrogenada nas propriedades estruturais de bolos**. São Paulo, 2014. 131 f. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

ROZENDAAL, A.; MACRAE, A. R. Interesterification of Oils and Fats, in *Lipid Technologies and Applications* (Gunstone, F. D. and Padley, F. B., eds.), Dekker, New York, pp. 223–263. 1997.

ROSSELL, J.B. Introduction. In: ROSSELL JB (Ed), *Frying: improvement quality*. New York: CRC Press.2001.

RUIZ-RODRIGUEZ, A.; REGLERO, G.; IBAÑEZ, E. Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 51, p. 305-326. 2010.

RUSTAN, A.C.; DREVON, C.A. **Fatty acids: structures and properties**. In: *Encyclopedia of lifesciences*. New York: John Wiley & Sons, Ltd. p 1–7. 2005.

SAHAN, Y.; BASOGLU, F.; GUCER, S. ICP-MS analysis of a series of metals (Namely: Mg, Cr, Co, Ni, Fe, Cu, Zn, Sn, Cd and Pb) in black and green olive samples from Bursa Turkey, **Food Chemistry**, v. 105, p. 395–399, 2007.

SALIMON, J.; OMAR, T.A.; SALIH, N. An accurate and reliable method for identification and quantification of fatty acids and *trans* fatty acids in food fats samples using gas chromatography. **Arabian Journal of Chemistry**, p. 10, S1875–S1882, 2017.

SANDHYA, R.A.K; YELLA, R. S; CHETANA, R. Quality changes in *trans* and *trans* free fats/oils and products during frying. **European Food Research and Technology**, v. 230, p. 803–811, 2010.

SANTOS, N.A. **Influência dos metais de transição no processo oxidativo do biodiesel de soja**. 2012. 129 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012.

- SAUNDERS, D.; JONES, S.; DEVANE, G.J.; SCHOLE, P.; LAKE, R.J.; PAULIN, S.M. *Trans* fatty acids in the New Zealand food supply. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 21, p. 320-325, 2008.
- SCHUCHARDT, U; SERCHELI, R.; VARGAS, R.M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 3, p. 199-210, 1998.
- SÉBÉDIO, J. L.; RATNAYAKE, W. M. N. IN A. J. DIJKSTRA, R. J. HAMILTON, & W. HAMM (EDS.), *Trans Fatty Acids*, p. 102-131. OXFORD: BLACKWELL. 2008.
- SILVA, R.C.; SOARES, D.F.; LOURENÇO, M.B.; SOARES, F.A.S.M.; SILVA, K.G.; GONÇALVES, M.I.A.; GIOIELLI, L.A. Structured lipids obtained by chemical interesterification of olive oil and palm stearin. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, n. 5, p. 752-758, 2010.
- SONG, J.; PARK, J.; JUNG, J.; LEE, C.; GIM, S.Y.; KA, H.; YI, B.; KIM, M.; KIM, C.; LEE, J. Analysis of *Trans* Fat in Edible Oils with Cooking Process, **Toxicological Research**, v. 31, n. 3, p. 307-312, 2015.
- STAUFFER, C.E, **Fats and Oils. Practical Guide for the Food Industry**. Eagan Press, St Paul, MN. 1996.
- STENDER, S., DYERBERG, J., BYSTED, A., LETH, T., ASTRUP, A., A *trans* world journey. **Atherosclerosis Supplements**, v. 7, p. 47–52, 2006.
- SUAREZ, P. A. Z.; Meneghetti, S. M. P. 70º aniversário do biodiesel em 2007: evolução histórica e situação atual no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 3, 2068-2071, 2007a.
- SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; WOLF, C. R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, v. 30, n. 3, 667-676, 2007b.
- TASAN, M.; DEMIRCI, M. TOTAL and individual tocopherol contents of sunflower oil at different steps of refining; **European Food Research and Technology**, vol. 220, p. 251-254, 2005.
- TIMBERLAKE, K.C. **General, Organic, and Biological Chemistry: Structures of Life**. 4th Edition. 2012.
- TZENG, Y.Z.; HU, C.H. Radical-induced *cis–trans* isomerization of fatty acids: A theoretical study. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 118, p. 4554-4564, 2014.
- TSUZUKI, W. Study of the formation of *trans* fatty acids in model oils (triacylglycerols) and edible oils during the heating process. **JARQ**, v. 46, n. 3, p. 215-220, 2012.
- TSUZUKI, W.; MATSUOKA, A.; USHIDA, K. Formation of *trans* fatty acids in edible oils during the frying and heating process. **Food Chemistry**, v. 123, p. 976–982, 2010.

TYAGI, U.K; VASISHTHA, A.K, Changes in the characteristics and composition of oils during deep fat frying. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.73, p. 409–506, 1996.

ULBERTH, F.; SCHRAMMEL, F. Accurate quantification of short, medium, and long chain fatty acid methyl esters by split injection capillary gas liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 704, n. 2, p. 455-463, 1995.

VALENZUELA, A.; KING, J.; NIETO, S. *Trans* fatty acid from hydrogenated fats: The controversy about health implications, **Grasas y Aceites**, v. 46, n. 6, p. 369-75, 1995.

VALENZUELA, A.; MORGADO, N. *Trans* fatty acid isomers in human health and in the food industry. **Biological Research**, v. 32, n. 4, p. 273-87, 1999.

VAN BRUGGEN, P. C. et al. Precision of low *trans* fatty acid level determination in refined oils. Results of a collaborative capillary gas-liquid chromatography study. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 4, p. 483-88, 1998.

VIANNI, R. e BRAZ-FILHO, R. Natural fatty acids: importance and occurrence in food. **Química Nova**. V. 19, n.4, p. 400-4007. 1996.

WADA, J.; YOSHIDA-YAMAMOTO, J.; WADA, Y.; NAKAYAMA, M.; MITSUDA, N.; KITAJIMA, H. J. *Trans* fatty acid accumulation in the human placenta. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 52, p. 139–143, 2017.

WAGNER, K.; PLASSER, E.; PROELL, C.; KANZLER, S. Comprehensive studies on the *trans* fatty acid content of Austrian foods: Convenience products, fast food and fats. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1054-1060, 2008.

WAHEED, A., MAHMUD, S., SALEEM, M., AHMAD, T. Fatty acid composition of neutral lipid: Classes of Citrus seed oil. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 13, p. 269–272, 2009.

WEILAND, S.K.; VON MUTIUS, E.; HUSING, A. et al. Intake of *trans* fatty acids and prevalence of childhood asthma and allergies in Europe. **Lancet**, n. 353, p. 2040–1, 1999.

WEATHERLY, C.A.; ZHANG, Y.; SMUTS, J.P.; FAN, H.; XU, C.; SCHUG, K.A.; LANG, J.C; ARMSTRONG, D.W. Analysis of Long-Chain Unsaturated Fatty Acids by Ionic Liquid Gas Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 6, p. 1422-32, 2016.

WEBER, J., BOCHI, V. C., RIBEIRO, C. P., VICTORIO, A. M., Emanuelli, T., Effect of different cooking methods on the oxidation, proximate and fatty acid composition of silver catfish (*Rhamdia quelen*) fillets. **Food Chemistry**, v. 106, p. 140–146, 2008.

WIJESUNDERA, C., RICHARDS, A., & CECCATO, C. Industrially produced *trans* fat in foods in Australia. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 433-442, 2007.
WOLFF, R. L. Ubiquité et caractéristiques des isomères *trans* de l'acide linoléique: Une revue. **OCL** 1995, v. 2, p. 391–400. 1995.

XIAO, H.; KIM, H.J.; DAVID, B.M.; SHASHI, B.L. Oleic and low *trans* fatty acid formation by an electrochemical process. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.87, p. 9–17, 2010.

YANAI, H.; KATSUYAMA, H.; HAMASAKI, H.; ABE, S.; TADA, N.; SAKO, A. Effects of Dietary Fat Intake on HDL Metabolism. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 7, n. 3, p. 145-149, 2015.

YOSHIDA, Y; FURUTA, S; NIKI E. Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron. **Biochim Biophys Acta**, v. 1210, n. 1, 1993.

YOSHINAGA, K.; ASANUMA, M.; MIZOBE, H.; KOJIMA, K.; NAGAI, T.; BEPPU, F.; GOTOH, N. Characterization of *cis* and *trans*-octadecenoic acid positional isomers in edible fat and oil using gas chromatography-flame ionization detector equipped with high polar ionic liquid capillary column. **Food Chemistry**, v. 160, p. 39-45, 2014.

YOUNG, F. V. K.; Interchangeability of fats and oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. v.62, p.372-376, 1985.

ZAMBONIN, L.; PRATA, C.; CABRINI, L.; MARALDI, T.; et al. Effect of radical stress and ageing on the occurrence of *trans* fatty acids in rats fed a *trans*-free diet. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 44, p. 594–601, 2008.

ZANG, X, H.; WU, Q. H.; ZHANG, M. Y.; XI, G. H.; WANG, S. Developments of dispersive liquid-liquid microextraction technique. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 37, n. 2, p. 161-168, 2009.

ZIAIIFAR, A.M.; COURTOIS, F.; TRYSTRAM, G. Porosity development and its affect on oil uptake during frying process. **Journal of Food Process Engineering**, v. 33, n. 2, p. 191–212, 2010.

ZHANG, Q.; SALEH, A. S.; CHEN, J.; SHEN, Q. Chemical alterations taken place during deep-fat frying based on certain reaction products: a review. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 165, p. 662–681, 2012.