**Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública**

**Óleos vegetais extraídos a frio comercializados na
cidade de São Paulo: avaliação das características de
identidade e qualidade e da ocorrência de
hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**

Simone Alves da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Nutrição em Saúde Pública para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Nutrição em Saúde
Pública

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Aparecida
Ferraz da Silva Torres

**Versão corrigida
São Paulo
2015**

Óleos vegetais extraídos a frio comercializados na cidade de São Paulo: avaliação das características de identidade e qualidade e da ocorrência de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Simone Alves da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Nutrição em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Nutrição em Saúde Pública

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres

**Versão corrigida
São Paulo
2015**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida **exclusivamente** para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese/dissertação

À Deus

À minha família:

João, Leonides, Bruno, Alcides, Cibele e Abdias

Com amor, dedico

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela saúde, força e perseverança de cada dia, indispensável para chegar até aqui e minha esperança para seguir adiante.

Aos meus queridos pais, João Alves da Silva e Leonides Alves da Silva, pela vida, amor, apoio e carinho. Sempre me incentivaram a estudar e não mediram esforços, em momento algum, para ajudar a concluir cada etapa de minha formação.

Ao Bruno Alves da Silva, meu querido irmão, pelo carinho, e por compreender minhas longas horas de ausência.

Ao meu querido tio Alcides Abdias da Silva, pelo exemplo de dedicação aos estudos, estímulo e auxílio na correção deste trabalho.

Aos meus padrinhos, meu avô Abdias Napoleão da Silva, e minha avó Luiza Maria de Moraes e Silva (*in memoriam*) que sempre se preocuparam com a escolha da minha profissão, mas me apoiam e torcem pelo meu sucesso.

A Profa. Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres pela orientação, amizade, compreensão e credibilidade para realização deste trabalho.

À Geni Rodrigues Sampaio pela amizade, confiança, paciência, disponibilidade e colaboração ativa na realização deste projeto.

À Faculdade de Saúde Pública e à Universidade de São Paulo, pela oportunidade.

À FAPESP pelo suporte financeiro tornando possível a realização deste projeto.

À Dra. Sabria Aued Pimentel e Dr. Eduardo Vicente, pesquisadores e membros da banca, que se disponibilizaram para colaborar com seus conhecimentos e apresentaram preciosas sugestões para melhoria do trabalho e da dissertação.

Ao Instituto Adolfo Lutz, por permitir o cumprimento deste trabalho.

À Janete Alaburda, Adriana Palma de Almeida e Tereza Atsuko Kussumi, pelo estímulo, confiança e autorização para realização deste trabalho.

A toda equipe do Núcleo de Contaminantes Orgânicos (Leda, Adriana, Valter, Elenice, Luzia, Sueli e Vera), pela paciência, compreensão e todo apoio dado à execução deste projeto.

A todos os amigos de laboratório do Departamento de Nutrição da Faculdade de Saúde Pública, que me proporcionaram momentos incríveis e inesquecíveis, pela amizade de todos e convivência harmoniosa: Geni, Liania, Rosana, Lucile, Bianka, Cintia, Camila, Augusto e Marcelo.

Às amigas Mahyara Markievicz Mancio Kus Yamashita, Lucile Tieme Abe Matsumoto, Márcia Regina Pennacino do Amaral Mello, Luciana Soares da Silva, Maria do Socorro Furlan, pela dedicada amizade e palavras de apoio.

Ao Antonio Augusto Ferreira Carioca, pela gentil ajuda na parte estatística e nas análises de ácidos graxos.

À Juliana Eliza Ribeiro Zanuto pelo auxílio na tradução do resumo.

Ao Prof. Dr. José Alfredo Gomes Areas por ter sugerido a parceria de trabalho com a Profa. Elizabeth.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação (Diego, Alessandra e Vânia) pelos auxílios prestados, sempre com muito carinho.

A todos que eu possa ter esquecido de citar, mas que contribuíram para a realização deste trabalho.

E àqueles que de alguma forma torceram e rezaram por mim.

Muito obrigada!

Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.

São Francisco de Assis

Ninguém vence sozinho, nem no campo, nem na vida!

Papa Francisco

SILVA, S. A. **Óleos vegetais extraídos a frio comercializados na cidade de São Paulo: avaliação das características de identidade e qualidade e da ocorrência de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos**. 2015. Dissertação - Faculdade de Saúde Pública da USP, São Paulo, 2015.

RESUMO

O crescente mercado dos produtos naturais, fomentado pelo interesse dos consumidores por alimentos que auxiliem a promoção da saúde, tem pressionado a indústria alimentícia na oferta por novos alimentos. Dentre estes alimentos, encontram-se os óleos vegetais extraídos a frio, reconhecidos por preservarem compostos bioativos característicos e, alguns deles, serem fontes de ácidos graxos (AG) essenciais. A categoria dos óleos e gorduras apresenta, dentre outros alimentos, uma importante fonte de exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), um grupo de contaminantes químicos orgânicos, alguns com ação carcinogênica. Este trabalho teve como objetivo avaliar os óleos vegetais extraídos a frio quanto aos parâmetros de identidade, de qualidade e à ocorrência de HPAs. Foram avaliadas 40 amostras, dez de cada tipo (coco, cártamo, prímula e linhaça), de diferentes marcas, adquiridas no comércio da cidade de São Paulo. Foram realizados os ensaios de perfil de AG, índice de acidez, índice de peróxido, p-anisidina, valor total de oxidação (totox) e HPAs (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno). Quanto aos AG, catorze óleos (35%) não apresentaram perfis de ácidos graxos característicos que os declarados em seus rótulos, incluindo um de coco, quatro de cártamo e nove de prímula. Os valores para acidez estavam inadequados em relação a legislação para três óleos de linhaça (7,5%). Para o peróxido, quatro óleos (10%) estavam acima do limite da legislação, sendo dois de linhaça e dois de prímula. Os valores de p-anisidina variaram de <LQ a 12,98, sendo o menor valor encontrado nas amostras de coco e o maior em uma de prímula, que apresentava um odor alterado. No ensaio de totox, 37,5% das amostras apresentaram valores acima da recomendação da literatura, especialmente os óleos de cártamo e prímula. Já para os HPAs, pelo menos um dos hidrocarbonetos analisados foi detectado em 97,5% das amostras avaliadas; três amostras de prímula (7,5%) apresentaram níveis acima do permitido pela Comunidade Europeia para BaP e, para a soma dos 4 HPAs, oito óleos (20%) estavam em desacordo: dois de cártamo, quatro de prímula e dois de linhaça. Este trabalho expõe os problemas relacionados aos parâmetros de identidade, qualidade e contaminação dos óleos vegetais comercializados como extraídos a frio e reforçam a importância de um contínuo monitoramento destes produtos.

PALAVRAS-CHAVE: óleos vegetais, ácidos graxos, oxidação de lipídeos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs)

SILVA, S. A. **Cold-pressed vegetable oils sold in São Paulo city: characteristics of identity and quality evaluation and polycyclic aromatic hydrocarbons occurrence.** 2015. Dissertation - Faculdade de Saúde Pública of USP, São Paulo (BR), 2015.

ABSTRACT

The natural product market growth, stimulated by the interest of consumers in foods that support health promotion, has encouraged the food industry to supply new kinds of foods. Among these are the cold-pressed vegetable oils, recognized by preserving characteristic bioactive compounds and, some of them, are sources of essential fatty acids (FA). The category of oils and fats owns, within others foods, an important source of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), a group of organic chemical contaminants, some of them with carcinogenic activity. This study aimed at evaluating cold-pressed vegetable oils in relation to the PAHs occurrence, as well as the quality and identity parameters. Forty samples being ten of each type (coconut oil, safflower oil, evening primrose oil and flaxseed oil) of distinct brands, which were acquired in different markets from São Paulo, were evaluated. Fatty acids profile, acid value, peroxide value, p-anisidine value, total oxidation value (totox) and PAHs (benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(b)fluoranthene and benzo(a)pyrene) were analyzed. As for FA, fourteen oils (35%) showed different fatty acids profiles according to the ones on their labels, including one of coconut oil, four of safflower oils and nine of evening primrose oils. The acid values were unsuitable towards the legislation to three flaxseed oils (7.5%). As for peroxide values, four of the oils (10%) were above the legislation limit, including two of flaxseed oils and two of evening primrose ones. The p-anisidine values ranged from <LOQ to 12.98, being the smallest value found in the coconut oils samples and the biggest ones in an evening primrose oil, which featured an altered odor. In the totox analysis, 37.5% of the samples presented values above the normal pattern according to literature, mainly the safflower and the evening primrose oils. Regarding the PAHs, at least one of the analyzed hydrocarbons was detected in 97.5% of the samples; three of evening primrose samples (7.5%) had levels above those allowed by the European Community for BaP. According to the sum of 4 PAHs, eight oils (20%) were in disagreement: two of safflower oils, four of evening primrose oils and two of flaxseed oils. This study exposes problems related to identity and quality parameters, contamination of vegetable oils marketed as cold-pressed. It also aims at reinforcing the importance of a continuous monitoring of these products.

KEYWORDS: plant oils, fatty acids, lipids oxidation, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
1.1	ÓLEOS VEGETAIS.....	27
1.1.1	Tipos e características dos óleos	27
1.1.2	Processo de obtenção dos óleos	29
1.2	PARÂMETROS DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE ÓLEOS VEGETAIS	31
1.2.1	Parâmetros de identidade de óleos vegetais	31
1.2.2	Parâmetros de qualidade de óleos vegetais	33
1.3	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	37
1.3.1	Toxicidade dos HPAs.....	38
1.3.2	Contaminação dos óleos por HPAs	38
1.3.3	Metodologias para análise dos HPAs.....	40
1.4	LEGISLAÇÕES SOBRE ÓLEOS VEGETAIS	40
2	OBJETIVOS	43
2.1	OBJETIVO GERAL.....	43
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	43
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1	MATERIAL	44
3.1.1	Amostras	44
3.1.2	Padrões, reagentes e solventes	44
3.1.3	Vidrarias	47
3.1.4	Equipamentos e acessórios.....	47
3.2	MÉTODOS.....	48
3.2.1	Ácidos graxos.....	48
3.2.2	Índice de acidez.....	52
3.2.3	Índice de peróxido	54
3.2.4	Valor de p-anisidina	55
3.2.5	Valor total de oxidação (Totox)	56
3.2.6	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	57
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	PARÂMETRO DE IDENTIDADE DE ÓLEOS VEGETAIS – ÁCIDOS GRAXOS ..	61
4.1.1	Otimização das condições analíticas	61
4.1.2	Validação	66
4.1.3	Perfil de EMAG em amostras comerciais	69
4.2	PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÓLEOS VEGETAIS	85
4.2.1	Índice de acidez	85
4.2.2	Índice de peróxido - Resultados em amostras comerciais.....	89
4.2.3	Valor de p-anisidina	91
4.2.4	Valor de total de oxidação (Totox) - Resultados em amostras comerciais	93

4.2.5	Discussão quanto aos índices de qualidade das amostras (acidez, peróxido, p-anisidina e totox)	93
4.3	HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS	99
4.3.1	Otimização das condições analíticas	99
4.3.2	Validação	104
4.3.3	Análise de HPAs em amostras comerciais	109
5	CONCLUSÕES	121
6	REFERÊNCIAS	123
	CURRÍCULO LATTES.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados do desempenho da coluna DB-FFAP (15 m x 0,1 mm x 0,1 μ m), para separação da mistura de 37 padrões EMAG empregando as condições cromatográficas do Método 2 (Quadro 6)	63
Tabela 2 – Composição de ácidos graxos, % p/p de EMAG, encontrada em amostra de linhaça (LI1), usando diferentes procedimentos	66
Tabela 3 - Coeficientes relacionados às curvas de calibração, construídas em soluções com diferentes concentrações (1000 a 10000 μ g/mL) a partir da mistura RM-1 (AOCS)	67
Tabela 4 - Resultados encontrados na exatidão para o material RM-1 (AOCS)	67
Tabela 5 - Recuperação do padrão 11:0 (TAG), com fortificação em diferentes níveis, para amostra de óleo de linhaça (LI1)	68
Tabela 6 - Resultados obtidos nos ensaios de precisão (repetibilidade e precisão intermediária) para os EMAG usando amostra de óleo de linhaça (LI1)	68
Tabela 7 - Composição de ácidos graxos (% p/p de EMAG) obtidos para os diferentes óleos de coco analisados	72
Tabela 8 - Composição de ácidos graxos (% p/p de EMAG) obtidos para os diferentes óleos de cártamo analisados	74
Tabela 9 - Composição de ácidos graxos (% p/p de EMAG) obtidos para os diferentes óleos de primula analisados	76
Tabela 10 - Composição de ácidos graxos (% p/p de EMAG) obtidos para os diferentes óleos de linhaça analisados	78
Tabela 11 - Ocorrência de ácidos graxos <i>trans</i> nos óleos vegetais estudados	84
Tabela 12 - Índices de acidez obtidos para diferentes massas de óleo vegetal	85
Tabela 13 - Resultados do estudo de validação do método para a determinação do índice de acidez em óleos vegetais, quanto aos critérios de linearidade e seletividade, em diferentes níveis de concentração (1 a 7 g oleico/100 g de amostra)	87
Tabela 14 - Resultados do estudo de validação do método para a determinação do índice de acidez em óleos vegetais, quanto critérios de exatidão e precisão	88

Tabela 15 - Índices de acidez (mg KOH/g de óleo) para os diferentes óleos vegetais analisados	88
Tabela 16 - Índices de peróxidos (meq/kg de óleo) para os diferentes óleos vegetais analisados	90
Tabela 17 - Valores de p-anisidina para os diferentes óleos vegetais analisados.....	92
Tabela 18 - Valores de totox para os diferentes óleos vegetais analisados	93
Tabela 19 - Resultados gerais para índices de qualidade nos óleos vegetais analisados.....	94
Tabela 20 - Resultados do desempenho da coluna Zorbax Eclipse PAH (100 mm x 2,1 mm x 1,8 µm), para separação da mistura de 4 padrões de HPAs	103
Tabela 21 - Resultados do estudo de validação do método para a determinação dos HPAs, quanto aos critérios de linearidade, usando padrões preparados em acetonitrila, em diferentes níveis de concentração	105
Tabela 22 - Resultados do estudo de validação do método para a determinação dos HPAs em óleos vegetais, quanto aos critérios de seletividade, em diferentes níveis de concentração	107
Tabela 23 - Resultados do estudo de validação do método para a determinação dos HPAs em óleos vegetais, quanto aos limites de detecção, quantificação, critérios de exatidão e precisão.....	108
Tabela 24 - Resultados de recuperação e coeficientes de variação para óleos de coco, prímula e linhaça.....	109
Tabela 25 - Teores de HPAs (µg/kg) para os diferentes óleos de coco analisados	112
Tabela 26 - Teores de HPAs (µg/kg) para os diferentes óleos de cártamo analisados.....	112
Tabela 27 - Teores de HPAs (µg/kg) para os diferentes óleos de prímula analisados	113
Tabela 28 - Teores de HPAs (µg/kg) para os diferentes óleos de linhaça analisados	113
Tabela 29 - Ocorrência de HPAs em óleos vegetais.....	116
Tabela 30 – Ingestão diária dos HPAs (ng/dia) em diferentes óleos vegetais*	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxograma do processo de obtenção dos óleos vegetais (adaptado de MORETTO e FETT, 1998)	29
Figura 2 - Representação gráfica da cinética da reação lipídica (Extraída de KAMAL-ELDIN e YANISHLIEVA, 2005)	35
Figura 3 - Óleos analisados - A: coco, B: cártamo, C: primula, D: linhaça	46
Figura 4 - Cromatógrafo a gás (GC-2010, Shimadzu) usado na análise de ácidos graxos	50
Figura 5 - Análise titrimétrica do índice de acidez em óleo vegetal	53
Figura 6 - Análise titrimétrica do índice de peróxido em óleo vegetal	55
Figura 7 - Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (Shimadzu) usado na análise de HPAs	59
Figura 8 - Cromatograma obtido pela análise por CG/DIC da mistura de 37 padrões certificados de EMAG (Fame Mix, Supelco), concentração de 1 mg/mL, com programação de temperatura do Método 2 (Quadro 6)	62
Figura 9 - Cromatogramas obtidos pela análise por CG/DIC da mistura de padrões de isômeros <i>cis/trans</i> dos EMAG 18:2 e 18:3 na programação de temperatura utilizada (Método 2, Quadro 6). Símbolos: A: 18:2 (9c,12c); B: Outros isômeros <i>cis/trans</i> do 18:2; C: 18:3 (9c,12c,15c); D: Outros isômeros <i>cis/trans</i> do 18:3	64
Figura 10 - Cromatograma obtido pela análise por CG/DIC de padrão de isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA) na programação de temperatura utilizada (Método 2, Quadro 6)	64
Figura 11 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC para o material RM-1, AOCS (C=4000 µg/mL)	67
Figura 12 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de coco (CO1)	80
Figura 13 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de cártamo (CA5)	80

Figura 14 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de cártamo (CA6), considerada possivelmente adulterada pelo ensaio de AG.....	80
Figura 15 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de primula (PR10)	81
Figura 16 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de primula (PR1), considerada possivelmente adulterada pelo ensaio de AG	81
Figura 17 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de linhaça (LI6)	81
Figura 18 - Sobreposição de cromatogramas obtidos pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de cártamo autêntica (CA5) e do padrão do ácido linoleico conjugado (CLA)	82
Figura 19 - Sobreposição de cromatogramas obtidos pela análise em CG/DIC para uma amostra de óleo de primula (PR6) e padrões de isômeros do ácido linoleico (18:2) e linolênico (18:3)	84
Figura 20 - Linearidade - Curvas de calibração para a determinação do índice de acidez, resposta em volume de NaOH, em mL, e concentração em g oleico por 100 g.....	86
Figura 21 - Gráfico de resíduos da curva de calibração para a determinação do índice de acidez, concentração em g oleico por 100 g	86
Figura 22 - Curva obtida entre os resultados de absorbância e as concentrações das soluções de dicromato de potássio	91
Figura 23 - Diagrama de dispersão entre índices de qualidade e data de fabricação dos óleos	98
Figura 24 - Curvas espectrais dos HPAs, obtidas no detector de arranjo de diodos, para os padrões de benzo(a)antraceno (BaA), criseno (Cri), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(a)pireno (BaP), em concentrações variadas.....	100
Figura 25 - Cromatograma obtido pela análise em UFLC/FL para mistura de padrões de HPAs e amostra contaminada, com concentrações variadas: 1 – Benzo(a)antraceno (C=10,0 µg/kg), 2 – Criseno (C=15,0 µg/kg), 3 – Benzo(b)fluoranteno (C=40,0 µg/kg) e 4 – Benzo(a)pireno (C=10,0 µg/kg)	102

Figura 26 - Linearidade - Curvas de calibração para a determinação dos HPAs usando padrões preparados em acetonitrila, resposta em área, concentração em ng/mL	105
Figura 27 - Gráfico de resíduos das curvas de calibração para a determinação dos HPAs usando padrões preparados em acetonitrila, concentração em ng/mL.....	106
Figura 28 - Cromatograma obtido pela análise em UFLC/FL para branco do ensaio; 1 – Benzo(a)antraceno, 2 – Criseno.....	114
Figura 29 - Cromatograma obtido pela análise em UFLC/FL para amostra de óleo de coco (CO1); 1 – Benzo(a)antraceno, 2 – Criseno, 3 – Benzo(b)fluoranteno e 4 – Benzo(a)pireno	114
Figura 30 - Cromatograma obtido pela análise em UFLC/FL para amostra de óleo de cártamo (CA2); 1 – Benzo(a)antraceno, 2 – Criseno, 3 – Benzo(b)fluoranteno e 4 – Benzo(a)pireno	114
Figura 31 - Cromatograma obtido pela análise em UFLC/FL para amostra de óleo de prímula (PR1); 1 – Benzo(a)antraceno, 2 – Criseno, 3 – Benzo(b)fluoranteno e 4 – Benzo(a)pireno	115
Figura 32 - Cromatograma obtido pela análise em UFLC/FL para amostra de óleo de linhaça (LI7); 1– Benzo(a)antraceno, 2 – Criseno, 3 – Benzo(b)fluoranteno e 4 – Benzo(a)pireno	115
Figura 33 - Porcentagem de contribuição de cada hidrocarboneto, considerando a soma dos 4 HPAs quantificados; BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno	116

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Nome e estrutura molecular de alguns HPAs (adaptado de BANSAL e KIM, 2015)	37
Quadro 2 - Limites para os índices de acidez e peróxido em óleos refinados e prensados a frio segundo legislação do Ministério de Saúde brasileiro (BRASIL, 2005).....	41
Quadro 3 - Características dos óleos vegetais comerciais estudados.....	45
Quadro 4 - Gradiente de eluição da fase móvel para análise de HPAs.....	57
Quadro 5 - Informações sobre as faixas de concentração de HPAs usadas na validação para os ensaios de linearidade, seletividade, exatidão e precisão	60
Quadro 6 - Condições cromatográficas para análise de EMAG por CG/DIC	62
Quadro 7 - Massas de óleo e quantidade de reagentes utilizados em diferentes procedimentos para avaliação do método de esterificação	65
Quadro 8 - Valores para índices de acidez, peróxido e p-anisidina em óleos vegetais citados na literatura.....	96
Quadro 9 - Condições cromatográficas testadas, quanto à composição da fase móvel, para análise de HPAs por UFLC/FL	101
Quadro 10 - Condições cromatográficas testadas, quanto aos comprimentos de onda, para análise de HPAs por UFLC/FL	102
Quadro 11 - Valores para os 4 HPAs em óleos vegetais citados na literatura	117

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN - Acetonitrila

AG - Ácidos graxos

AGE - Ácidos graxos essenciais

AGPI - Ácidos graxos poli-insaturados

AGS - Ácidos graxos saturados

AGT - Ácidos graxos *trans*

AL - Alagoas

ALA - Ácido α -linolênico

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC - *Association of Official Analytical Chemistry*

AOCS - *American Oil Chemists' Society*

AV - Valor de p-anisidina

BaA - Benzo(a)antraceno

BaP - Benzo(a)pireno

BbF - Benzo(b)flouranteno

CA - Cártamo

CF - Fator de correção

CG - Cromatógrafo a gás

CLA - Ácido linoleico conjugado

CLAE - Cromatógrafo a líquido de alta eficiência

CO - Coco

Cri - Criseno

CV - Coeficiente de variação

DAD – Detector de arranjo de diodos

DCNT - Doenças crônicas não transmissíveis

DIC - Detector de ionização de chama

DMF - N,N-dimetilformamida

DP - Desvio-padrão

EFSA - *European Food Safety Authority*

EMAG - Ésteres metílicos de ácidos graxos

ES - Espírito Santo

EUA - Estados Unidos

FA - *Fatty acids*

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

FL - Detector de fluorescência

GLA - Ácido γ -linolênico

GO - Goiás

H₂O - Água

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HPAs - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

IA - Índice de acidez

IAL - Instituto Adolfo Lutz

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

IP - Índice de peróxido

KOH - Hidróxido de potássio

LA - Ácido linoleico

LD - Limite de detecção

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

LI - Linhaça

LOQ - *Limit of quantification*

LQ - Limite de quantificação

n-3 - Ômega 3

n-6 - Ômega 6

N₂ - Nitrogênio

Na₂S₂O₃ - Tiosulfato de sódio

NaCl - Cloreto de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NC - Não consta

ND – Não detectado

OL - Ácido oleico

PAHs - *Polycyclic aromatic hydrocarbons*

PR - Prímula

r² – Coeficiente de correlação quadrado

RS - Rio Grande do Sul

SP - São Paulo

SPE - Cartucho de extração em fase sólida

TAG - Triglicerídeos

Totox - Valor total de oxidação

Tr - Traços

UFLC - Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência

UV - Ultravioleta

WHO - *World Health Organization*

% p/p - Porcentagem relativa de massa

λ - Comprimento de onda

1 INTRODUÇÃO

1.1 ÓLEOS VEGETAIS

Óleos e gorduras são as principais formas de armazenamento de energia dos organismos, conferem aos alimentos sabor, consistência e estabilidade e desempenham uma variedade de funções celulares: são componentes estruturais das membranas, responsáveis pelo transporte e absorção de vitaminas lipossolúveis, precursores de hormônios, fornecem ácidos graxos essenciais (AGE), etc (PERINI et al., 2010).

Um dos maiores desafios relacionados à Saúde Pública em todo o mundo são as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), que matam cerca de 38 milhões de pessoas anualmente e afetam países desenvolvidos e em desenvolvimento, incluindo o Brasil. Estas doenças, como obesidade, aterosclerose, hipertensão, diabetes e câncer, afetam a qualidade de vida da população, podendo levar inclusive à morte prematura (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). O aumento da prevalência de DCNT tem ocasionado uma preocupação maior com a alimentação, por parte da população e dos órgãos públicos relacionados à saúde. Neste contexto, inserem-se os alimentos funcionais, considerados promotores de saúde por estarem associados à diminuição de riscos de algumas doenças crônicas, uma vez que podem ser encontrados em alimentos naturais contendo uma ou mais substâncias funcionais (MORAES e COLLA, 2006).

Estudos sugerem que óleos como cártamo, coco, linhaça e prímula são considerados funcionais, pois muitos deles apresentam em sua constituição lipídeos biologicamente ativos, como os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6). Além disso, quando obtidos por prensagem a frio excedem em vantagens nutricionais em relação aos refinados, por apresentarem mais componentes naturais como os tocoferóis, compostos fenólicos, carotenoides e esteróis, cujas propriedades contribuem para a promoção da saúde e prevenção de doenças (MORAES e COLLA, 2006; RUIZ-RODRIGUEZ et al., 2010).

1.1.1 Tipos e características dos óleos

O coco (*Cocos nucifera* L.), da família Arecaceae, é um importante fruto proveniente de regiões tropicais e subtropicais (DEBMANDAL e MANDAL, 2011). A produção de óleo de

coco em 2013 foi de 3 milhões de toneladas, com grandes contribuições de países como Filipinas, Indonésia e Índia. A produção no Brasil é baixa (2 mil toneladas) e, devido a demanda, foram importadas 1868 toneladas em 2012, procedentes principalmente da Índia e Filipinas (FAOSTAT, 2015). Os ácidos graxos (AG) predominantes neste óleo são caprílico (8:0) (4,6-10%), láurico (12:0) (45,1-53,2%) e mirístico (14:0) (16,8-21,0%) (CODEX, 1999 revisada em 2015). O consumo de óleo de coco virgem é relacionado com efeitos benéficos à saúde, especialmente por conter mais de 50% de triglicerídeos (TAG) de cadeia média, que possuem rápida absorção no organismo, e compostos fenólicos, com capacidade antioxidante (MARINA et al., 2009). A ingestão deste produto também mostrou relação com a redução da circunferência abdominal em mulheres obesas (ASSUNÇÃO et al., 2009). No entanto, seu uso gera controvérsias devido à elevada presença de ácidos graxos saturados (AGS): uma metanálise indicou que o ácido graxo láurico aumenta de forma significativa a lipoproteína de baixa densidade (LDL) (MICHA e MOZAFFARIAN, 2010).

O cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) é uma espécie da família Asteraceae e suas sementes contêm aproximadamente 27-32% de óleo, sendo a maior parte composta pelo ácido linoleico (LA, n-6, 18:2, 9c,12c), variando de 68 a 83% (VOSOUGHKIA et al., 2011). Os maiores produtores de óleo de cártamo são Índia, Argentina e México, com 107 mil toneladas em 2013 (FAOSTAT, 2015). Este óleo tem sido comercializado com o apelo de redução de peso corporal. Em pesquisa com ratos suplementados com o óleo, ocorreu uma redução no consumo alimentar e do peso (CAMPANELLA et al., 2014). Já em mulheres obesas na menopausa, a suplementação com este óleo aumentou a massa magra (NORRIS et al., 2009).

A prímula (*Oenothera biennis* L.), da família Onograceae, é cultivada em países como Estados Unidos (EUA) e Canadá, que também são os maiores produtores do óleo, e foi a primeira planta a ser utilizada para isolamento do ácido γ -linolênico (GLA, n-6, 18:3, 6c,9c,12c). Contém cerca de 24% de óleo, rico em AGPI, sendo que o GLA pode variar de 7 a 14% (BALCH et al., 2003). Alguns estudos apontam que este AG possui propriedades anti-inflamatórias, com aplicações no tratamento e prevenção de doenças como dermatite, síndrome pré-menstrual, artrite reumatóide, dores crônicas, etc (KUHN et al., 2012).

A linhaça (*Linum usitatissimum* L.) é a semente do linho, pertencente à família Linaceae, com mais de 100 espécies. É cultivada em países como Canadá, Rússia, China, EUA e Brasil. É uma semente rica em gordura (41%) e o óleo é composto pelos ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0), LA e α -linolênico (ALA, n-3, 18:3, 9c,12c,15c), sendo predominante o último (52-54%) (NOVELLO e POLLONIO, 2011). Em 2013, foram produzidas cerca de 565 mil toneladas do óleo, especialmente na China, e o Brasil foi responsável por cerca de 1% desta

produção. O Brasil também importa óleo de linhaça da Alemanha, Argentina e Bélgica (FAOSTAT, 2015). Estudos indicam potentes benefícios após o uso de linhaça e/ou derivados na dieta, associados à presença do ALA, com diminuição dos níveis de TAG, do risco de câncer e com ação preventiva para o controle da obesidade e diabetes (SERRAINO e THOMPSON, 1992; MOLENA-FERNANDES et al., 2010).

1.1.2 Processo de obtenção dos óleos

Os óleos vegetais podem ser extraídos de diferentes fontes, como sementes, nozes e frutos. A produção envolve basicamente três etapas: preparo da matéria-prima, extração do óleo bruto e refino, conforme apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Fluxograma do processo de obtenção dos óleos vegetais (adaptado de MORETTO e FETT, 1998)

Na etapa de extração, os processos mais comumente empregados são a prensagem mecânica, a extração com solvente ou uma combinação de ambos, quando a torta obtida na prensagem é submetida à extração com solvente (KHATTAB e ZEITOUN, 2013).

Alguns óleos passam pelo processo de refino, para ajuste de suas propriedades físico-químicas (KHATTAB e ZEITOUN, 2013). Durante este processo, a primeira etapa, degomagem, é realizada para remover os fosfolípidos e gomas mucilaginosas. A neutralização ou refino alcalino e branqueamento são usados para eliminar os AG livres e pigmentos que podem promover a oxidação das gorduras e produzir cores indesejáveis no produto final. Nesta etapa, são usados agentes de branqueamento como a terra de branqueamento e carvão ativado. A desodorização remove compostos voláteis e decompõe peróxidos, o que pode melhorar a qualidade do aroma e a estabilidade do óleo (CAMARGO et al., 2012).

O processo de refino pode aumentar os teores de ácidos graxos *trans* (AGT) e diminuir a proporção de substâncias bioativas. Os AGT podem ser formados nas etapas de desodorização e branqueamento, dependendo da temperatura e do tempo utilizados no processo (AUED-PIMENTEL et al., 2009). Já substâncias bioativas, como os compostos fenólicos, são eliminados durante o processo de refino: em estudo realizado com azeite de oliva, compostos como orto-difenóis (hidroxitirosol, catecol, e acetato de hidroxitirosol) e flavonóides (luteolina e apigenina) foram extintos durante o tratamento alcalino, enquanto que outros componentes como tirosol e 4-etilfenol foram eliminados no processo de desodorização (GARCIA et al., 2006).

Os óleos vegetais não convencionais, como linhaça, cártamo e prímula, são usualmente comercializados como extra-virgem e passam apenas pela prensagem a frio e filtragem, para manter os compostos bioativos característicos destes produtos (CIECIERSKA e OBIEDZINSKI, 2013). Estes óleos são reconhecidos por suas propriedades funcionais e bastante utilizados por consumidores preocupados com a saúde, seja para prevenção ou tratamento de algumas doenças (KHATTAB e ZEITOUN, 2013).

O óleo de coco pode ser obtido tanto do leite de coco quanto do coco seco. O óleo de coco virgem é preparado a partir do leite de cocos frescos e maduros, usando processos físicos, mecânicos ou enzimáticos, e este produto tem conquistado um mercado cada vez maior. O óleo de coco não refinado é um outro óleo que vem ganhando popularidade e é extraído do coco seco, usando prensas, segundo etapas descritas na Figura 1; contém ácidos graxos livres e compostos com odor característico. Este último óleo também pode passar pelo processo de refino (Figura 1), para remover impurezas e padronizar características físico-químicas, mas este não é um produto muito comum para consumo direto (MARINA et al., 2009; KUMAR e KRISHNA, 2015). Em estudo realizado com estes óleos de coco (virgem, não refinado e refinado), o virgem foi superior em qualidade nos parâmetros físico-químicos, enquanto que o

óleo não refinado superou os demais em composição de fitonutrientes (fitoesteróis, fenólicos e tocoferol) (KUMAR e KRISHNA, 2015).

1.2 PARÂMETROS DE IDENTIDADE E QUALIDADE DE ÓLEOS VEGETAIS

A definição de parâmetros de identidade e qualidade de alimentos é necessária, uma vez que são essenciais para garantir a saúde do consumidor e a qualidade do produto que é oferecido à população.

Dentre os vários ensaios físico-químicos que podem ser utilizados para avaliação dos óleos, estão incluídos os índices de acidez (IA), peróxido (IP), p-anisidina (AV), perfil de ácidos graxos, conteúdo de esteróis, hidrocarbonetos esteroidais, triglicerídeos, tocoferóis, ceras, etc (ULBERTH e BUCHGRABER, 2000).

1.2.1 Parâmetros de identidade de óleos vegetais

Relatos nacionais e internacionais sobre óleos adulterados são comuns e as principais causas estão relacionadas à alta demanda e/ou valor agregado e/ou possibilidade de lucro potencial. Por exemplo, óleos vegetais obtidos por prensagem a frio possuem um rendimento no processo bem inferior quando comparados aos óleos extraídos com solventes e, por isso, possuem preços mais elevados e, desta forma, podem ser propícios à adulteração. Além disso, os óleos podem ser adicionados ou substituídos por outros de menor valor (ULBERTH e BUCHGRABER, 2000; ROHMAN e CHE MAN, 2012; AUED-PIMENTEL et al., 2013; EVERSTINE et al., 2013; HIRASHIMA et al., 2013; STANKOVA et al., 2013; SOUZA et al., 2015).

O problema fundamental para assegurar a autenticidade do óleo é definir quais parâmetros devem ser checados para confirmar a identidade do produto. Em alguns casos, a adulteração é sutil e não é possível de ser detectada com apenas um único ensaio. Assim, normalmente é necessária uma combinação de diferentes técnicas (ULBERTH e BUCHGRABER, 2000).

São várias os ensaios usados para caracterizar a identidade de óleos vegetais, incluindo ácidos graxos, esteróis, tocoferóis, entre outros. Mas a técnica mais empregada na literatura é o perfil de AG.

1.2.1.1 Ácidos graxos

Os AG são os principais constituintes dos lipídeos nas dietas e derivam principalmente dos TAG. Os AGE são compostos por uma classe de moléculas que não são sintetizados pelos seres humanos e, por isso, devem estar obrigatoriamente presentes na alimentação, por serem indispensáveis ao bom funcionamento do organismo. Nesta categoria incluem-se o LA e o ALA, que são AGE primários das séries n-6 e n-3, respectivamente, substratos para produção de AGPI como o ácido araquidônico, eicosapentaenóico e docosahexaenóico (KUHNT et al., 2012). O GLA é um ácido graxo da série n-6 e precursor de AGE, pois está relacionado à síntese de ácido araquidônico (BALCH et al., 2003).

Em humanos, o LA e o ALA são necessários para manter, sob condições normais, as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Nos últimos anos, têm-se comprovado que dietas com quantidades adequadas de AGPI n-3 e n-6 desempenham papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares e aterosclerose, doenças inflamatórias crônicas, inibição da vasoconstrição e agregação plaquetária, no crescimento fetal e desenvolvimento neural, ação anti-inflamatória e antitrombótica, ação sobre a prevenção do câncer e participação nas funções imuno-moduladoras. Baixas concentrações ou ausência desses componentes aceleram o processo de envelhecimento e aumentam a probabilidade de desenvolvimento de várias doenças degenerativas e cardiovasculares (PERINI et al., 2010).

No geral, o procedimento para análise de AG em óleos envolve duas etapas: preparação ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) e quantificação. Diferentes métodos para preparação de EMAG são descritos na literatura e envolvem uma transesterificação ou uma hidrólise (saponificação) seguida de esterificação dos AG livres. Os métodos oficiais recomendados pela *Association of Official Analytical Chemistry* (AOAC) e *American Oil Chemists' Society* (AOCS) utilizam como catalisador o trifluoreto de boro em metanol, o qual é tóxico, instável e pode formar produtos secundários (AOAC, 1969b, revisado em 2012; AUED-PIMENTEL, 2007; AOCS, 2009b). Outros métodos têm sido propostos, que usam soluções preparadas com reagentes mais baratos e menos agressivos (BANNON et al., 1982;

IAL, 2005; HIRASHIMA et al., 2013). Para separação e quantificação dos EMAG usualmente utiliza-se cromatógrafo a gás (CG) com detector de ionização de chama (DIC).

Cada óleo vegetal possui um perfil de AG característico. Para cada ácido graxo existe uma faixa de concentração comumente encontrada, descrita na literatura ou permitida por legislação. Além disso, os AGT podem ser formados no processo de refino dos óleos e a quantidade depende, principalmente, dos teores de AGPI presentes e da temperatura e do tempo utilizados no processo de desodorização. São formados principalmente AGT com duas e três insaturações (18:2 e 18:3) (AUED-PIMENTEL et al., 2009). Assim, a avaliação dos AG pode indicar a adulteração de óleos extraídos a frio com óleos refinados ou com outros tipos de óleos (HIRASHIMA et al., 2013).

STANKOVA et al. (2013) analisaram 51 óleos vegetais da República Tcheca e nem todos os produtos apresentaram um perfil de AG representativo de seus óleos como, por exemplo, o de semente de abóbora. HIRASHIMA et al. (2013) avaliaram 21 óleos encapsulados comercializados na cidade de São Paulo e nove amostras estavam adulteradas com outros óleos.

1.2.2 Parâmetros de qualidade de óleos vegetais

Depois da deterioração microbiana, a oxidação é a segunda causa mais importante da deterioração de alimentos. A oxidação pode acarretar na alteração de sabor e odor, além da redução do valor nutritivo (REGITANO–D'ARCE, 2010).

A reação de oxidação é afetada por fatores como: composição de AG, grau de insaturação dos AG, pró-oxidantes (metais), antioxidantes (naturais ou sintéticos), superfície exposta ao oxigênio e condições de armazenagem (temperatura, luz, umidade). É difícil avaliar o efeito de um fator específico no processo de oxidação, pois pode haver ação simultânea. Mas sabe-se que quanto maior o grau de insaturação dos AG presentes, maior a intensidade de oxidação.

Os primeiros produtos de oxidação são os hidroperóxidos. Estes sofrem novas reações produzindo compostos de peso molecular semelhante, menor e maior, ditos produtos secundários. Os produtos primários de oxidação são inodoros que, ao se quebrarem, geram compostos secundários de odor desagradável (REGITANO–D'ARCE, 2010).

O processo de refino, especialmente na neutralização e na desodorização, tende a diminuir os teores de AG livres e peróxidos, respectivamente. Em alguns óleos, como de soja, este

processo é essencial para melhorar o aroma e a estabilidade dos óleos (CAMARGO et al., 2012; KHATTAB e ZEITOUN, 2013).

1.2.2.1 Índice de acidez

A determinação do IA pode fornecer um dado importante na avaliação do estado de conservação do óleo. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, pode alterar a concentração dos íons hidrogênio (IAL, 2005). Além disso, o óleo vegetal que passa pelo processo de refino tende a apresentar valores inferiores aos óleos extraídos a frio, devido ao processo de neutralização empregado (MORETTO e FEET, 1998).

Durante a oxidação lipídica, ácidos graxos de cadeia curta são formados pela oxidação secundária de aldeídos insaturados e outros produtos originados da quebra de hidroperóxidos. Ainda outros ácidos graxos podem ser formados pela quebra de triglicerídeos. Este processo promove o aumento da acidez nos óleos (POKORNY, 2005).

Diferentes ensaios têm sido propostos para determinação de ácidos graxos livres em óleos vegetais, mas boa parte das metodologias oficiais sugere a quantificação por titulação. As amostras são dissolvidas em solventes apolares ou com solubilidade média, adicionados de álcool previamente neutralizado (etanol ou metanol), que facilitarão a posterior neutralização com uma base (hidróxido de sódio ou de potássio) na titulação. A fenolftaleína é usada como indicador. O resultado é expresso em miligramas de KOH necessários para neutralizar os ácidos graxos livres em 1 g de amostra (POKORNY, 2005).

Segundo a AOCS (2009a), a amostra deve ser diluída em uma mistura de isopropanol-tolueno e titulada com hidróxido de potássio (KOH). Já a AOAC (1940, revisada em 2012), indica a diluição da amostra em álcool e titulação com hidróxido de sódio (NaOH), enquanto a metodologia 325/IV, do IAL (2005), sugere a diluição da amostra em mistura éter-álcool e titulação com NaOH.

1.2.2.2 Índice de peróxido

O IP é um parâmetro que indica a presença de produtos primários de oxidação nos óleos. O produto mais importante formado nesta etapa são os hidroperóxidos. Uma típica representação gráfica da cinética da reação lipídica, com formação e degradação de hidroperóxidos, é apresentada na Figura 2. Esta curva pode ser dividida em três períodos:

- ✓ Período de indução: a velocidade de oxidação é extremamente baixa (medida pelo consumo de oxigênio ou valor de peróxido);
- ✓ Fase ativa da peroxidação (fase exponencial): a taxa de oxidação aumenta drasticamente até o máximo de peróxidos. A taxa de decomposição de hidroperóxidos é significativamente baixa, e uma pequena quantidade de produtos de oxidação secundários é formada;
- ✓ Fase ativa da decomposição de hidroperóxidos (fase estacionária de consumo de oxigênio): a taxa de degradação de hidroperóxidos é maior que sua formação. Esta fase é marcada pelo aumento exponencial na formação de produtos secundários de oxidação.

Figura 2 - Representação gráfica da cinética da reação lipídica (Extraída de KAMAL-ELDIN e YANISHLIEVA, 2005)

Para estimar a presença de hidroperóxidos nos óleos, métodos titulométricos foram propostos e têm sido utilizados até hoje por serem rápidos e simples; até mesmo a metodologia oficial 965.33 da AOAC (1969a, revisada em 2012) indica a titulação iodométrica, em que o iodo liberado (da reação de hidroperóxidos com uma solução de iodeto de potássio) é titulado

com solução padronizada de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$), usando amido como indicador. É expresso em termos de miliequivalentes de O_2 por kg de óleo.

1.2.2.3 Valor de p-anisidina

A decomposição de hidroperóxidos produz uma variedade de substâncias que pode causar a alteração do sabor dos óleos, e consequente deterioração. A quebra dos hidroperóxidos forma radicais alcoxi, que sofrem quebra nas ligações C-C formando aldeídos, acetonas, álcoois, hidrocarbonetos, ésteres, furanos e lactonas. Os hidroperóxidos podem reagir novamente com o oxigênio, formando produtos secundários como epoxihidroperóxidos, cetohidroperóxidos, peróxidos cíclicos e endoperóxidos bicíclicos, além de poderem se condensar em dímeros e polímeros, responsáveis pelo aroma típico de materiais oxidados (REGITANO-D'ARCE, 2010).

A análise de óleos na região do ultravioleta pode fornecer indicações importantes sobre a formação de produtos de oxidação. Compostos carbonílicos, principalmente aldeídos e cetonas, são os produtos de oxidação lipídica mais reativos, que podem facilmente reagir com aminas aromáticas como p-anisidina (POKORNY et al., 2005). O AV é definido, por convenção, como 100 vezes a absorbância medida a 350 nm em cubeta de 1 cm contendo solução de 1 g de óleo em 100 mL de mistura de solvente e reagente p-anisidina. O reagente p-anisidina forma um produto de condensação com aldeídos, principalmente 2-alcenais e 2,4-alcadienais, sob condições ácidas (AOCS, 2011).

1.2.2.4 Valor total de oxidação (Totox)

O totox é obtido por cálculo matemático e combina os resultados dos índices de peróxido e os valores de p-anisidina. É um parâmetro bastante utilizado na indústria para verificar a qualidade dos óleos e gorduras pois demonstra a conservação dos mesmos quanto à oxidação: o valor de peróxidos apresenta o potencial de degradação, enquanto o de p-anisidina, o estado de degradação efetivo (REGITANO-D'ARCE, 2010).

1.3 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) representam uma família de mais de 100 compostos orgânicos, formados por carbono e hidrogênio, contendo dois ou mais anéis aromáticos condensados (Quadro 1). São produzidos por combustão incompleta da matéria orgânica, por uma série de complexas reações químicas (RENGARAJAN et al., 2015).

Quadro 1 – Nome e estrutura molecular de alguns HPAs (adaptado de BANSAL e KIM, 2015)

Nome	Estrutura molecular	Nome	Estrutura molecular
Benzo(a)antraceno		Benzo(b)fluoranteno
Criseno		Benzo(a)pireno

No ambiente, são provenientes de fontes naturais (queima natural de florestas e emissões vulcânicas) ou, principalmente, de fontes antropogênicas (queima do carvão, escapamento de veículos, óleos lubrificantes usados em motores, fumaças de cigarro, etc.). Os humanos estão expostos aos HPAs tanto por fontes dietéticas como não dietéticas, mas a primeira forma é considerada a de maior relevância (BANSAL e KIM, 2015).

Estudos epidemiológicos com humanos e com animais de laboratório indicam que a exposição aos HPAs é um dos fatores responsáveis pelo aumento de câncer ao qual a população está exposta, pois eles têm mostrado efeitos carcinogênicos, mutagênicos e potencial imunossupressante. Dentre os HPAs, o mais conhecido e extensivamente estudado é o benzo(a)pireno (BaP) (IARC, 2010, 2012; SU et al., 2013; RENGARAJAN et al., 2015).

1.3.1 Toxicidade dos HPAs

Uma vez absorvido em humanos e animais, os HPAs são distribuídos para vários órgãos e tecidos, especialmente nos ricos em lipídeos. Em seguida, são metabolicamente ativados e, desta maneira, tornam-se reativos a grupos nucleofílicos presentes em macromoléculas celulares. Alguns HPAs são considerados pró-carcinogênicos, ou seja, precisam de ativação metabólica para exercer as funções sobre o material genético (PURCARO et al., 2013).

A biotransformação dos HPAs abrange uma série de reações realizadas por enzimas distribuídas por todos os tecidos, especialmente no fígado. O objetivo desta transformação é fazer com que um determinado metabólito seja mais hidrofílico que o seu precursor, e com isso facilitar a excreção do mesmo por meio dos fluidos biológicos. Embora este mecanismo tenha a intenção de desintoxicação, alguns HPAs são transformados em substâncias que têm elevado poder de se ligar covalentemente ao DNA. A formação de adutos pode provocar a mutação genética, com atividade na promoção de tumores, além dos riscos de más formações para embriões e fetos (MEIRE et al., 2007; PURCARO et al., 2013).

Várias organizações internacionais têm avaliado os riscos dos HPAs para humanos, animais e meio ambiente, de acordo com suas ocorrências, carcinogenicidades e exposição. O Comitê Conjunto da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* e *World Health Organization* (FAO/WHO) de Peritos em Aditivos Alimentares (JECFA) identifica 13 como genotóxicos e carcinogênicos: benzo(a)antraceno (BaA), criseno (Cri), 5-metilcriseno, benzo(j)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(k)fluoranteno, BaP, dibenzo(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,e)pireno, dibenzo(a,i)pireno e dibenzo(a,h)pireno (JECFA, 2005). A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classifica o BaP no grupo 1, como carcinogênico para humanos, enquanto compostos como BaA, BbF e Cri estão no grupo 2B, possíveis carcinogênicos para humanos (IARC, 2010, 2012).

1.3.2 Contaminação dos óleos por HPAs

Os alimentos podem ser contaminados por HPAs devido à presença no solo, ar e água. Também podem ser depositados nestes produtos durante o processo de defumação ou de secagem. Além disso, podem ser formados durante certos tipos de processamento aos quais os

alimentos podem ser submetidos, como secagem, grelha, tostagem, torrefação e fritura, devido à pirólise direta dos nutrientes (BANSAL e KIM, 2015).

Os HPAs têm sido encontrados nas mais diferentes categorias de alimentos e bebidas (VEYRAND et al., 2013). Em estudo realizado na Espanha com vários produtos, os maiores níveis de ocorrência foram verificados em carnes e derivados (38,99 µg/kg), seguidos pelos óleos e gorduras (18,75 µg/kg) e lácteos (7,57 µg/kg) (DOMINGO et al., 2010).

Devido à natureza lipofílica dos HPAs, produtos como óleos e gorduras podem facilmente ser contaminados. As principais rotas de contaminação dos óleos vegetais podem ser atribuídas aos seguintes processos: (a) deposição atmosférica dos HPAs sobre as plantas, (b) contaminação das plantas por meio do solo, (c) secagem das sementes oleaginosas com fumaça de combustão ou (d) contaminação devido à extração do óleo com solventes (CAMARGO et al., 2011; BANSAL e KIM, 2015).

A secagem da matéria-prima é uma das primeiras etapas utilizadas no processo de obtenção dos óleos, empregada para o controle de umidade, e considerada uma importante fonte para contaminação de óleos vegetais (Figura 1). Se a secagem ocorre de forma natural (sol e vento), a potencial origem dos HPAs será o meio ambiente, com procedência de solo, água e/ou ar contaminados. Se a secagem ocorre de forma artificial (usando diferentes combustíveis), o contato com os produtos de combustão pode resultar na contaminação das matérias-primas. Assim, óleos vegetais extraídos a frio podem ser contaminados nesta etapa (ROSZKO et al., 2012; CIECIERSKA e OBIEDZINSKI, 2013; BANSAL e KIM, 2015).

A presença de HPAs em diferentes tipos de óleos vegetais comerciais tem sido verificada por diversos autores (PANDEY et al., 2004; CAMARGO et al., 2011; ROSZKO et al., 2012; CIECIERSKA e OBIEDZINSKI, 2013; KANG et al., 2014; JIANG et al., 2015). PANDEY et al. (2004), por exemplo, avaliaram 296 amostras na Índia, e os maiores e menores valores encontrados para os HPAs foram, respectivamente, no azeite de oliva extra-virgem e óleos vegetais refinados. Quanto à contaminação em óleos vegetais de fontes não convencionais, os estudos são muito limitados. Este mesmo estudo indicou que 100% dos óleos de linhaça e cártamo estavam contaminados por HPAs, e 90% dos óleos de coco. O criseno foi o hidrocarboneto mais comum nas amostras de linhaça e cártamo, com médias de 20,7 e 26,6 µg/kg, respectivamente. O BaP foi encontrado em 25,5% das amostras, com maior concentração no cártamo (2,6 µg/kg) (PANDEY et al., 2004).

CIECIERSKA e OBIEDZINSKI (2013) analisaram óleos vegetais não convencionais, extraídos a frio, incluindo óleos de linhaça e cártamo. Os valores variaram de 23,41 a 234,30 µg/kg, e o hidrocarboneto mais frequente foi o fenantreno. As concentrações de BaP variaram

de não detectado (ND) a 15,74 µg/kg. Outra pesquisa realizada com óleos de linhaça e borragem indicou que a soma dos 4 HPAs (BaA, Cri, BaP e BbF) estava abaixo de 10 µg/kg (ROSZKO et al., 2012).

1.3.3 Metodologias para análise dos HPAs

A metodologia oficial 973.30 da AOAC, indicada para análise de HPAs em alimentos, recomenda a separação por cromatografia em camada delgada e determinação espectrofotométrica no ultravioleta (UV), e apresenta como desvantagens uso de volumes elevados de solventes e baixa sensibilidade (AOAC, 1973, revisada em 2012). Assim, os ensaios vêm sofrendo modificações visando aumentar a eficiência, usando o mínimo de solventes, com pouca manipulação da amostra e no menor tempo possível (CAMARGO et al., 2011; PURCARO et al., 2012).

O procedimento geral envolve três estágios: extração, limpeza e quantificação. Dentre as técnicas de extração, a mais utilizada é a extração líquido-líquido. Após a extração, na purificação dos HPAs são comumente usados cartuchos de extração em fase sólida (SPE), devido à praticidade, rapidez e bons resultados. Para quantificação, são usados principalmente cromatógrafos a líquido, de alta eficiência (CLAE) ou de ultra eficiência (UFLC), com detectores de fluorescência (FL) ou espectrômetro de massa, ou CG, com diferentes detectores (PURCARO et al., 2013).

1.4 LEGISLAÇÕES SOBRE ÓLEOS VEGETAIS

As normas internacionais para óleos e gorduras são estabelecidas pelo *Codex Alimentarius*, uma comissão criada pela FAO/WHO. A *Codex Stan 210* é aplicada para óleos vegetais específicos, incluindo amostras autênticas de óleos de coco, cártamo, dentre outros. Esta apresenta os limites tolerados para parâmetros de qualidade (incluindo índices de acidez e peróxido) e identidade (perfil de ácidos graxos) (CODEX, 1999 revisada em 2015). O azeite de oliva deve atender aos requisitos da *Codex Stan 33* e a *Codex Stan 19* especifica os padrões

para óleos não cobertos pelas anteriores, especialmente para óleos extraídos a frio e refinados (CODEX, 1981a, 1981b revisadas em 2015).

No Brasil, os óleos especiais são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que é uma autarquia especial vinculada ao Ministério da Saúde. Óleos vegetais como cártamo, coco, linhaça e prímula devem ser registrados na ANVISA na categoria “novos alimentos”, segundo a Resolução RDC nº 16/1999. São alimentos sem tradição de consumo no país ou alimentos com substâncias já consumidas e que, entretanto, venham a ser adicionadas ou utilizadas em níveis muito superiores aos atualmente observados nos alimentos utilizados na dieta regular. Para estes produtos não são permitidas alegações de propriedade funcional e/ou de saúde (BRASIL, 1999; BRASIL, 2008).

Para óleos, gorduras e creme vegetal, encontra-se em vigor a Resolução RDC nº 270/2005, da ANVISA. Esta estabelece os requisitos específicos para índices de acidez e peróxido em óleos e gorduras, refinados e prensados a frio (não refinados), conforme descrito no Quadro 2, fundamentados nas normas do *Codex Alimentarius* (BRASIL, 2005).

Quadro 2 - Limites para os índices de acidez e peróxido em óleos refinados e prensados a frio segundo legislação do Ministério de Saúde brasileiro (BRASIL, 2005)

	Acidez (mg KOH/g de óleo)	Peróxido (meq/kg de óleo)
Óleos e gorduras refinados (exceto azeite de oliva refinado e óleo de bagaço de oliva refinado)	0,6	10
Óleos prensados a frio e não refinados	4,0	15

A necessidade de estabelecer limites máximos para HPAs em alimentos é imprescindível, considerando a toxicidade de alguns destes compostos. Assim, na Comunidade Europeia, existe um Comitê que avalia e estipula estes níveis em diferentes grupos alimentícios. O Regulamento nº 835/2011 preconiza os limites tolerados para quatro substâncias utilizadas como marcadores da presença destes contaminantes nos alimentos: BaA, Cri, BbF e BaP (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2011a).

Até então, o BaP era usado como o único marcador da ocorrência de HPAs mas foi observado, pela reavaliação da *European Food Safety Authority* (EFSA) em 2008, que 30% das amostras investigadas apresentam BaP negativo mas níveis significativos de outros carcinogênicos. No Regulamento citado, ainda é apontado um nível máximo separado para o BaP, com o intuito de levantar dados para comparação futura. Para óleos e gorduras vegetais, o

limite máximo para o BaP e para a soma dos 4 HPAs é 2,0 e 10,0 µg/kg, respectivamente. Devido à presença proporcionalmente maior de BaP e Cri no óleo de coco, a soma permitida para este óleo é de 20,0 µg/kg (EFSA, 2008; COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2011a). No Brasil, o único óleo contemplado por legislação é o bagaço de oliva, que deve apresentar um nível máximo para BaP de 2,0 µg/kg (BRASIL, 2003).

Dentre os óleos vegetais extraídos a frio, os de cártamo, coco, prímula e linhaça são os mais disponíveis no mercado, comercializados em farmácias e lojas de alimentos naturais, e apresentados em potes de vidro, plástico ou encapsulados. Estudos recentes com estes óleos destacaram a constante adulteração com óleos de menor valor (MOORE et al., 2012; AUED-PIMENTEL et al., 2013; HIRASHIMA et al., 2013; STANKOVA et al., 2013). Além disso, são escassos trabalhos sobre o estado de oxidação e a ocorrência de HPAs em óleos comerciais, especialmente os de fontes não convencionais.

A realização deste trabalho, que inclui os ensaios de perfil de ácidos graxos, índice de acidez, índice de peróxido, valor de p-anisidina, HPAs e o cálculo do valor total de oxidação poderão fornecer informações sobre a identidade, a qualidade e a contaminação dos óleos. Os resultados obtidos poderão contribuir para embasamento a agências e comissões competentes para atualizar dados sobre os óleos vegetais comercializados na cidade de São Paulo e dar subsídios para elaboração de legislações e reavaliação das já existentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- ✓ Avaliar as características de identidade e qualidade de óleos vegetais extraídos a frio e a contaminação por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a identidade dos óleos vegetais comerciais, a partir do perfil de ácidos graxos obtido em CG/DIC;
- ✓ Avaliar a qualidade dos óleos vegetais comerciais, a partir do índice de acidez, índice de peróxido, p-anisidina e valor total de oxidação (totox), sendo os dois primeiros obtidos por titulometria, o terceiro por espectrofotometria e o último por cálculo;
- ✓ Otimizar e validar a metodologia analítica para identificar e quantificar os HPAs (benzo(a)antraceno, criseno, benzo(b)fluoranteno e benzo(a)pireno) em UFLC/FL;
- ✓ Comparar os valores obtidos nas análises com as legislações vigentes dos produtos, quando aplicável, e com a literatura.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Amostras

Foram adquiridas 40 amostras de óleos vegetais, sendo 10 de cada tipo (coco, cártamo, prímula e linhaça), apresentadas em cápsulas gelatinosas ou em frascos maiores, de vidro. A aquisição destes produtos ocorreu durante o ano de 2014 de maneira aleatória, em lojas de produtos naturais e farmácias da cidade de São Paulo. O Quadro 3 apresenta as características destas amostras, incluindo tipo de óleo, marca codificada, forma de apresentação e outras informações, e na Figura 3 constam os óleos separados em frascos de vidro.

As amostras foram conservadas em seus frascos originais, protegidas de luz e estocadas a 4°C até às análises. Antes dos ensaios, alíquotas eram separadas em tubo cilíndrico de polipropileno, mantidas sob temperatura ambiente e homogeneizadas, antes da pesagem.

3.1.2 Padrões, reagentes e solventes

Dentre os solventes e reagentes que foram empregados, estão incluídos, como grau analítico: ácido acético, ácido sulfúrico, biftalato de potássio, cloreto de amônio, cloreto de sódio (NaCl), clorofórmio, éter de petróleo, fenolftaleína, hidróxido de potássio, hidróxido de sódio, iodeto de potássio, iso-octano, p-anisidina, sulfato de sódio e tiosulfato de sódio.

Foram utilizados os seguintes solventes grau cromatográfico: metanol, acetonitrila (ACN), N,N-dimetilformamida (DMF), etanol e acetona. O n-hexano empregado foi de grau nanograde[®], com certificação para análise de resíduos (Mallinckrodt, Inc., NJ, EUA). Também foi utilizada água deionizada pelo sistema de purificação Milli-Q, Millipore, e filtrada em membrana de nylon de 0,22 µm.

Para validação e verificação do método analítico para o índice de acidez, foi utilizado um padrão de ácido oleico (código O1008) da Sigma (St Louis, MO). Uma solução-padrão foi preparada em etanol, na concentração de 0,2 g/mL, e mantida em frasco âmbar a 4°C, estocada no máximo por uma semana.

Quadro 3 - Características dos óleos vegetais comerciais estudados

Tipo de óleo	Código	Marca codificada	Apresentação da embalagem ¹	Quantidade	Porção (g)	Fabricação		Preço/g de óleo
						Estado	Data	
coco	CO1	A	1	60 C-1000 mg	2	ES	mar-13	0,25
	CO2	B	1	60 C-1000 mg	4	NC	dez-12	0,58
	CO3	C	3	200 mL	12	AL	out-13	0,08
	CO4	C	3	200 mL	12	AL	ago-14	0,08
	CO5	D	3	200 mL	12	RS	out-14	0,08
	CO6	C	2	60 C-1000 mg	1	AL	mai-13	0,18
	CO7	E	1	60 C-1000 mg	4	SP	dez-12	0,27
	CO8	F	2	60 C-1000 mg	4	SP	abr-14	0,26
	CO9	G	2	60 C-1000 mg	4	SP	mar-14	0,31
	CO10	H	1	50 C-1000 mg	4	SP	mai-14	0,20
cártamo	CA1	I	1	120 C-1000 mg	4	SP	ago-13	0,24
	CA2	G	2	120 C-1000 mg	4	NC	out-13	0,17
	CA3	J	2	120 C-1000 mg	2	NC	out-13	0,17
	CA4	K	2	60 C-1250 mg	4	RS	mar-14	0,27
	CA5	L	1	60 C-1000 mg	3	SP	nov-13	0,28
	CA6	K	5	60 C-1250 mg	4	RS	fev-14	0,43
	CA7	M	1	90 C-1000 mg	3	SP	dez-13	0,24
	CA8	J	2	120 C-1000 mg	2	NC	set-13	0,15
	CA9	N	2	120 C-1000 mg	2	GO	jul-14	0,17
	CA10	O	2	120 C-1000 mg	4	NC	set-14	0,24
prímula	PR1	A	1	60 C-1000 mg	2	ES	set-13	0,32
	PR2	P	1	80 C-500 mg	1	SP	out-13	0,58
	PR3	Q	1	120 C-500 mg	1	SP	nov-12	0,42
	PR4	L	1	50 C-500 mg	1	RS	out-13	0,48
	PR5	A	1	60 C-1000 mg	2	ES	set-13	0,23
	PR6	N	2	120 C-500 mg	2	GO	jul-14	0,43
	PR7	R	2	60 C-500 mg	1	SP	mai-14	0,38
	PR8	J	1	60 C-500 mg	2	NC	dez-13	0,47
	PR9	H	1	60 C-500 mg	1	SP	abr-14	0,33
	PR10	S	1	90 C-500 mg	3	RS	ago-14	0,65
linhça	LI1	G	2	60 C-1000 mg	1	NC	jun-13	0,24
	LI2	P	1	40 C-1000 mg	9	SP	set-13	0,32
	LI3	Q	5	60 C-500 mg	1	SP	nov-12	0,36
	LI4	D	4	250 mL	14	RS	nov-12	0,06
	LI5	K	5	60 C-1250 mg	5	RS	dez-13	0,33
	LI6	K	2	70 C-1000 mg	3	RS	mar-14	0,25
	LI7	D	4	250 mL	14	RS	set-14	0,06
	LI8	G	2	60 C-1000 mg	1	NC	nov-13	0,22
	LI9	A	1	60 C-1000 mg	2	ES	jul-14	0,24
	LI10	J	1	60 C-1000 mg	1	NC	nov-13	0,24

¹Apresentação da embalagem: 1 - frasco de plástico opaco, 2 - frasco de plástico transparente, 3 - frasco de vidro transparente, 4 - frasco de vidro âmbar, 5 - blisters em caixa de papelão; Abreviaturas: C - cápsulas; AL - Alagoas; ES - Espírito Santo; GO - Goiás; NC - não consta; RS - Rio Grande do Sul; SP - São Paulo

Figura 3 - Óleos analisados - A: coco, B: cártamo, C: prímula, D: linhaça

Para identificação dos EMAG foram utilizados os seguintes padrões: mix de 37 EMAG (Fame Mix, código: CRM47885), variando de 4:0 a 24:0, da marca Supelco (Bellefonte, PA, EUA), mistura dos isômeros *cis-trans* dos EMAG linoleico (código: CRM47791) e linolênico (código: CRM47792) da marca Supelco (Bellefonte, PA, EUA), TAG 11:0 (código: T5534), EMAG elaídico (18:1, 9t, código: 46903), ácido linoleico conjugado (CLA) (18:2, 9c, 11t e 18:2 10t, 12c, código: O5632) e EMAG tridecanoato (13:0, código: T0627), da marca Sigma (St Louis, MO). Na verificação da metodologia analítica de AG, foi usada uma mistura de EMAG indicada para identificação e quantificação de óleos (RM-1, 100 mg, AOCS Reference Mixtures, código: O7006). As soluções de padrões foram preparadas na concentração de 1,0 mg/mL, todas em n-hexano, e mantidas em frasco âmbar a -18°C, estocadas por no máximo uma semana, quando usadas na quantificação.

Para identificação e quantificação dos HPAs, foram utilizados os seguintes padrões individuais: benzo(a)antraceno (código: 40070), criseno (código: 40074), benzo(b)fluoranteno (código: 40072) e benzo(a)pireno (código: CRM40071), da marca Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Foram preparadas soluções individuais de HPAs, em acetonitrila, na concentração aproximada de 40 µg/mL (para BbF, Cri e BaP) e 36 µg/mL (para BaA), e mantidas em frasco

âmbar a -18°C, permanecendo estáveis durante os 3 meses de análises. A partir destas foi preparado um mix, em frasco âmbar, dos 4 HPAs em acetonitrila, que foi usado como solução de trabalho, com concentração de 40 ng/mL (para BaA e BaP), 60 ng/mL (para Cri) e 160 ng/mL (para BbF), preparado a cada necessidade analítica, e mantido a -18°C por no máximo um mês.

3.1.3 Vidrarias

- ✓ Balões volumétricos de 10,0; 25,0; 50,0 e 100,0 mL
- ✓ Béquer de 20, 50, 150 e 500 mL
- ✓ Buretas de 10,0 e 25,0 mL
- ✓ Erlenmeyer de 50, 125 e 250 mL
- ✓ Funil de separação de 125 mL, com tampa
- ✓ Pipetas volumétricas de 1,0; 5,0; 10,0 mL
- ✓ Provetas de 10, 25, 50 e 100 mL
- ✓ Seringas de vidro de 10 mL
- ✓ Tubos de centrífuga, com tampas, de 20 mL
- ✓ Tubos de ensaio

3.1.4 Equipamentos e acessórios

- ✓ Agitador de tubo tipo “vortex”, modelo Genius 3, marca Gehaka
- ✓ Balança analítica - capacidade de pesagem $\pm 0,0001$ g, modelo Adventurer, marca Ohaus
- ✓ Balança analítica - capacidade de pesagem $\pm 0,0001$ g, modelo AY220, marca Shimadzu
- ✓ Banho-maria com controle de temperatura entre 70-80°C, marca Nova Técnica
- ✓ Bloco de extração em fase sólida, marca Waters
- ✓ Cartucho de extração em fase sólida Bond Elut C18, 500 mg, 3 mL, marca Agilent
- ✓ Coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de ácido nitrotereftálico modificado por polietilenoglicol, DB-FFAP (15 m x 0,1 mm x 0,10 μ m), marca J&W Scientific, Agilent

- ✓ Coluna cromatográfica para cromatógrafo a líquido de ultra eficiência, Zorbax Eclipse PAH (100 mm x 2,1 mm x 1,8 μ m), marca Agilent
- ✓ Concentrador e centrífuga a vácuo, modelo 5301, marca Eppendorf
- ✓ Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG/DIC) e injetor split/splitless, modelo CG-2010, marca Shimadzu
- ✓ Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência, marca Shimadzu, composto pelos módulos: bomba modelo LC-30AD Nexera, injetor automático modelo SIL-30AC Nexera, degaseificador modelo DGU-20A, forno modelo CTO-20A, detector de fluorescência modelo RF-20A e detector de arranjo de diodos (DAD) modelo SPD-M20A
- ✓ Espectrofotômetro, modelo UV-1650 PC, marca Shimadzu
- ✓ Membranas filtrantes de PTFE, 0,20 μ m de poro, 15 mm de diâmetro
- ✓ Pipeta Pasteur de polipropileno de 3 mL
- ✓ Pipetador automático (50 μ L a 200 μ L e 200 μ L a 1000 μ L)
- ✓ Pré-coluna cromatográfica para cromatógrafo a líquido de ultra eficiência, Eclipse Plus (5 mm x 2,1 mm x 1,8 μ m), marca Agilent
- ✓ Seringas descartáveis de 1 mL
- ✓ Suporte universal
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca, com capacidade para 50 mL
- ✓ Vials, com capacidade para 2,0 mL, com tampa e septo de teflon/silicone

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Ácidos graxos

3.2.1.1 Condições cromatográficas para análise

Os padrões e amostras comerciais foram analisados em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama e injetor split/splitless modelo GC-2010, marca Shimadzu (Figura 4). As condições cromatográficas aplicadas foram: gás de arraste: hidrogênio, fluxo constante: 0,27 mL/min, volume de injeção: 1 μ L, temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 260°C, razão de divisão da amostra: 1:350. A separação dos compostos ocorreu em uma coluna capilar de sílica fundida (15 m x 0,1 mm, 0,1 μ m, DB-FFAP, J&W Scientific da Agilent) com

programação de temperatura: 100°C (1 min); 45°C/min até 155°C (21 min); 15°C/min até 240°C (1 min); 1,5°C/min até 243°C (1 min).

3.2.1.2 Identificação e quantificação dos componentes

Os EMAG foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões comerciais, quando disponíveis, além da análise de óleos autênticos de coco, cártamo, prímula, linhaça, soja, oliva e peixe, que possuem perfis de EMAG característicos. Também foi utilizado o trabalho de MASOOD et al. (2005) para verificar a ordem de eluição dos compostos, uma vez que utilizaram a mesma coluna cromatográfica (DB-FFAP, Agilent). Os picos foram integrados e quantificados usando software GC Solution (Shimadzu). A quantificação foi realizada por normalização de área e os resultados foram expressos em porcentagens relativas (% p/p) de EMAG.

3.2.1.3 Preparação dos ésteres metílicos de ácidos graxos

Os ácidos graxos foram transformados em EMAG através da reação de transesterificação proposta por HARTMAN e LAGO, com modificações (HARTMAN e LAGO, 1973; IAL, 2005). A metodologia foi escolhida após testes de otimização do procedimento da reação de esterificação. As análises foram realizadas em triplicata. Cerca de 33 mg da gordura foi diluída com 1 mL de n-hexano e saponificada com 1,3 mL de solução de NaOH (0,5 mol/L, em metanol) a 60°C, em seguida foi esterificada com 1,7 mL de “reagente de esterificação” (contendo cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico) na mesma temperatura. Solução saturada de cloreto de sódio (2 mL) foi adicionada e a fase orgânica (superior) diluída na proporção de 1:4 com n-hexano, separada em vial e, então, submetida à análise cromatográfica.

Figura 4 - Cromatógrafo a gás (GC-2010, Shimadzu) usado na análise de ácidos graxos

3.2.1.4 Validação

A validação na análise de AG incluiu os seguintes parâmetros: linearidade, exatidão, precisão do método (repetitividade e precisão intermediária), precisão do sistema cromatográfico, desempenho da reação de transesterificação, limites de detecção e quantificação. As determinações dos critérios se basearam nos trabalhos de PETROVIC et al. (2010), CAMARGO et al. (2011) e CRUZ-HERNANDEZ et al. (2013).

Adquiriu-se uma mistura de EMAG (RM-1, AOCS Reference Mixtures) com composição semelhante aos AG encontrados nos seguintes óleos: milho, algodão, papoula, arroz, cártamo, gergelim, soja, girassol e nozes. Para verificar a linearidade do método, foram preparadas soluções, em n-hexano, em cinco diferentes concentrações, em triplicata: 10.000 (solução estoque), 8.000, 6.000, 4.000, 2.000 e 1.000 $\mu\text{g/mL}$. Considerando que esta mesma mistura é indicada para identificação e quantificação de óleos, e apresenta um certificado com as % p/p dos EMAG que a constituem, foram preparadas soluções na concentração de 4000 $\mu\text{g/mL}$, em quadruplicata, para avaliação da exatidão das porcentagens obtidas.

Foi realizada a recuperação do 11:0 (TAG) em quatro diferentes níveis, adicionando diversas alíquotas do padrão no óleo de linhaça (LI1), cada nível em triplicata (equivalente a 155, 258, 361 e 464 μg em 33 mg de óleo). Para cálculo da recuperação, fundamentando-se no trabalho de CRUZ-HERNANDEZ et al. (2013), também foi adicionado o padrão 13:0 (EMAG) (358 μg em 33 mg de óleo) e a recuperação calculada de acordo com a equação:

$$\text{Recuperação 11:0 TAG (\%)} = 100 \times \frac{m_{13:0} \times A_{11:0} \times R_{11:0} \times S_{11:0}}{A_{13:0} \times m_{11:0}}$$

onde $m_{13:0}$ é a massa do padrão de EMAG 13:0 adicionada à solução (μg), $A_{11:0}$ é a área do pico do 11:0 obtida na análise cromatográfica, $R_{11:0}$ é o fator de resposta relativo do 13:0 para 11:0, $S_{11:0}$ é o fator estequiométrico para converter 11:0 de TAG em EMAG (0,993), $A_{13:0}$ é a área do pico do 13:0 obtida na análise cromatográfica, $m_{11:0}$ é a massa do padrão de TAG 11:0 adicionada à solução (μg).

A precisão avalia a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, repetidos para uma mesma amostra, em condições definidas. Para avaliar este item, foram realizados experimentos de repetibilidade e precisão intermediária para a amostra de linhaça (LI1) analisada em triplicata, no mesmo dia e em 3 dias diferentes, por um mesmo analista, em um mesmo equipamento e os resultados foram avaliados a partir dos coeficientes de variação (CV) obtidos.

Também foi avaliada a precisão do sistema cromatográfico a partir da injeção do mesmo extrato de amostra de referência (RM-1, AOCS) por quatro vezes, durante três períodos consecutivos (manhã, tarde e noite).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do método foram estimados considerando a relação sinal-ruído de 3:1 e 10:1, respectivamente, usando as soluções de RM-1 (AOCS).

Nas amostras comerciais, foi realizado o teste de desempenho da reação de transesterificação usando as soluções independentes de padrão de TAG 11:0 e EMAG 13:0, com o objetivo de verificar se a reação de transesterificação estava satisfatória para a conversão de TAG em EMAG. Foi adicionada uma massa próxima a 350 μg de cada padrão em 33 mg de óleo. O desempenho foi calculado como a recuperação do 11:0 (TAG) de acordo com a equação:

$$\text{Desempenho da reação (\%)} = 100 \times \frac{m_{13:0} \times A_{11:0} \times R_{11:0} \times S_{11:0}}{A_{13:0} \times m_{11:0}}$$

onde $m_{13:0}$ é a massa do padrão de EMAG 13:0 adicionada à solução (μg), $A_{11:0}$ é a área do pico do 11:0 obtida na análise cromatográfica, $R_{11:0}$ é o fator de resposta relativo do 13:0 para 11:0, $S_{11:0}$ é o fator estequiométrico para converter 11:0 de TAG em EMAG (0,993), $A_{13:0}$

é a área do pico do 13:0 obtida na análise cromatográfica, m11:0 é a massa do padrão de TAG 11:0 adicionada à solução (µg).

3.2.2 Índice de acidez

3.2.2.1 Determinação do índice de acidez

A metodologia 325/IV, descrita no livro Métodos físico-químicos para análise de alimentos, do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005), foi utilizada para a determinação deste índice. Pesou-se cerca de 3,0 g da amostra de óleo vegetal em frasco erlenmeyer e foram adicionados 25 mL de solução de éter-álcool (2:1, v/v). Após adicionar três gotas de indicador (fenolftaleína), titulou-se com solução de NaOH 0,01 mol/L, até atingir a coloração rósea. Uma prova em branco foi realizada nas mesmas condições descritas, sem a presença da amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para as amostras em que o volume de solução de NaOH 0,01 mol/L adicionado foi superior a 10,0 mL, a determinação foi repetida usando solução padronizada de NaOH 0,1 mol/L. A padronização da solução de NaOH foi realizada previamente usando biftalato de potássio, segundo metodologia oficial 936.16 da AOAC (1936, revisado em 2012).

Nas amostras de óleo de linhaça, foi necessária adição de 75 mL de solução de éter-álcool (2:1, v/v), previamente neutralizada, para facilitar a visualização do ponto de viragem. O índice de acidez, em mg KOH/g, foi obtido através da fórmula:

$$IA = \frac{(A - B) \times M \times 56,1}{m}$$

onde A: volume (mL) da solução de NaOH gasto na titulação da amostra, B: volume (mL) da solução de NaOH gasto na titulação do branco, M: molaridade da solução de NaOH, m: massa (g) de óleo.

Figura 5 - Análise titrimétrica do índice de acidez em óleo vegetal

3.2.2.2 Validação da metodologia

Neste trabalho, considerando a disponibilidade comercial do padrão analítico de ácido oleico, foi possível validar o método titulométrico para determinação do IA, incluindo os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, limite de quantificação, exatidão e precisão (repetitividade e precisão intermediária). Para fortificação das amostras, foi usada uma solução de ácido oleico (0,2 g/mL), preparada em etanol.

A linearidade do método foi determinada pela adição de solução de ácido oleico no branco do ensaio (solução de éter-álcool) em cinco níveis de concentrações, totalizando 15 ensaios. A seletividade foi avaliada pela adição de padrões em quatro diferentes níveis em dois grupos: branco e amostra de óleo de cártamo (CA1), em concentrações idênticas: branco, 1, 3, 5 e 7 g oleico/100 g. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, totalizando 15 ensaios. Foi verificada a variação de volume de hidróxido de sódio versus a concentração de ácido oleico.

O limite de quantificação foi estimado considerando a resolução da bureta usada na titulação. A exatidão da metodologia foi verificada através da avaliação da recuperação de uma amostra fortificada de óleo de cártamo, em 4 níveis de concentração (1, 3, 5 e 7 g de ácido oleico/100 g) em triplicata. Para avaliar a precisão do método (repetibilidade e precisão intermediária), a mesma amostra foi fortificada em diferentes níveis de concentração e o CV avaliado no mesmo dia e em dois dias diferentes, sendo a análise realizada por um único analista.

3.2.3 Índice de peróxido

O IP foi determinado de acordo com a metodologia oficial 965.33 da AOAC (1969a, revisado em 2012). Neste ensaio, o iodo liberado da reação de hidroperóxidos com iodeto de potássio foi titulado com solução padronizada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, usando amido como indicador.

Foram utilizados 5,0 g do óleo, dissolvidos em 30 mL de solução de ácido acético-clorofórmio (3:2, v/v), seguida da adição de 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Após repouso (1 minuto, ao abrigo da luz), foram adicionados 30 mL de água destilada e a mistura foi titulada com solução padronizada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 mol/L, agitando continuamente até a coloração tornar-se amarelo-clara. Neste ponto, adicionou-se 0,5 mL de solução de amido 1%, e continuou-se adicionando solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, até a cor azul desaparecer. Uma prova em branco foi realizada nas mesmas condições descritas, sem a presença da amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para as amostras em que o volume de solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 mol/L adicionado foi superior a 10,0 mL, a determinação foi repetida usando solução padronizada de 0,1 mol/L. A padronização da solução foi realizada previamente usando como padrão primário dicromato de potássio, segundo metodologia oficial 942.27 da AOAC (1942, revisado em 2012).

A concentração de peróxidos, em meq O_2 /kg, foi obtida através da fórmula:

$$IP = \frac{(A - B) \times M \times 1000}{m}$$

onde A: volume (mL) da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na titulação da amostra, B: volume (mL) da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ gasto na titulação do branco, M: molaridade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, m: massa (g) de óleo.

Figura 6 - Análise titrimétrica do índice de peróxido em óleo vegetal

3.2.4 Valor de p-anisidina

Este índice determina a quantidade de aldeídos em óleos, pela reação destes compostos com p-anisidina em solução de ácido acético, e leitura da absorbância a 350 nm. A metodologia para determinação do valor de AV exige a utilização de um espectrofotômetro adequado para leitura a 350 nm. Desta forma, foi realizado previamente um estudo de verificação do equipamento.

3.2.4.1 Verificação do desempenho do espectrofotômetro

Para verificação do desempenho do espectrofotômetro modelo UV-1650 PC (Shimadzu) foi usada a metodologia 403/IV, descrita em Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005), com modificações. Foram preparadas soluções de dicromato de potássio, em ácido sulfúrico 0,009 M, nas concentrações 0,015, 0,03, 0,0625, 0,125, 0,250 e 0,500 mmol/L. Cada solução foi preparada em triplicata.

Foram realizadas leituras das absorbâncias destas soluções a 350 nm, usando como branco a solução de ácido sulfúrico 0,009 mol/L. O fator de correção (CF) do espectrofotômetro foi calculado conforme equação abaixo:

$$CF = \frac{\varepsilon_{teor}}{\varepsilon_{exp}} = \frac{3160}{\varepsilon_{exp}}$$

onde ε_{teor} : absorptividade molar teórica do dicromato de potássio (3160 L/mol.cm) e ε_{exp} : absorptividade molar experimental, obtida a partir do coeficiente angular da curva entre os valores de absorbância e as concentrações das soluções de dicromato de potássio.

3.2.4.2 Determinação do valor de p-anisidina

O valor de anisidina foi determinado de acordo com a metodologia oficial Cd 18-90 da AOCS (2011), com modificações.

Pesou-se cerca de 0,5 g de óleo em recipiente de 50 mL e a amostra foi dissolvida em 11,0 mL de iso-octano. Foi medida a absorbância de 2,5 mL da solução a 350 nm, usando cubeta em espectrofotômetro, empregando o solvente como branco (Ab). Adicionou-se 0,5 mL do reagente p-anisidina (C=2,5 mg/mL, preparado em ácido acético glacial) nas cubetas de iso-octano e de solução de amostra, agitando lentamente, deixando a solução no escuro por 10 minutos. Foi realizada uma nova leitura espectrofotométrica da solução, usando o solvente após reação como branco (As). Todas as análises foram realizadas em triplicata. O valor de p-anisidina foi calculado de acordo com a fórmula:

$$AV = \frac{V \times (1,2As - Ab)}{m}$$

onde V: volume (mL) de iso-octano, As: absorbância da solução de gordura após reação com reagente p-anisidina, Ab: absorbância da solução de gordura, m: massa (g) de óleo.

3.2.5 Valor total de oxidação (Totox)

O totox foi calculado a partir dos valores do índice de peróxido e de p-anisidina, usando a equação (REGITANO-D'ARCE, 2010):

$$Totox = 2 \times IP + AV$$

onde IP: valor do índice de peróxido (meq/kg), AV: valor de p-anisidina

3.2.6 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

3.2.6.1 Condições cromatográficas para análise

Os padrões e amostras foram analisados em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência, marca Shimadzu, com detecção por fluorescência (Figura 7). As condições cromatográficas aplicadas foram: temperatura do forno a 30°C, injeção automática de 2 µL, fluxo: 0,4 mL/min, fase móvel acetonitrila:água, com gradiente de eluição conforme Quadro 4. A separação dos compostos ocorreu na coluna Zorbax Eclipse PAH (100 mm x 2,1 mm, 1,8 µm, Agilent), protegida por coluna de guarda (5 mm x 2,1 mm, 1,8 µm, Eclipse Plus, Agilent).

A detecção foi obtida com detector de fluorescência, e os comprimentos de onda de excitação e emissão empregados foram: 270 nm e 390 nm (para BaA e Cri) e 290 nm e 430 nm (para BbF e BaP). O tempo de análise foi de 27,0 min.

Quadro 4 - Gradiente de eluição da fase móvel para análise de HPAs

Tempo (min)	Concentração da fase móvel (%)	
	Acetonitrila	Água
0	65	35
0,9	65	35
7,0	75	25
17,0	75	25
20,0	100	0
24,0	100	0
27,0	65	35

3.2.6.2 Identificação e quantificação dos componentes

Os compostos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões individuais dos HPAs. Os picos foram integrados e quantificados usando software LabSolutions (Shimadzu). A quantificação foi realizada por padronização externa com curva de calibração, construída a partir da injeção de soluções-padrão com concentrações variadas, preparadas em acetonitrila, a partir da solução de trabalho.

As identidades dos padrões dos HPAs também foram verificadas através da comparação dos respectivos espectros obtidos por DAD com a literatura.

3.2.6.3 Procedimento de extração dos HPAs

A metodologia foi escolhida após testes de otimização e validação. Cerca de 0,5 g de óleo foram dissolvidos e transferidos para funil de separação 125 mL, com auxílio de 5 mL de n-hexano, e os HPAs foram extraídos com duas porções de 5 mL de mistura de DMF-água (9:1, v/v). Os extratos combinados foram diluídos com água para a proporção de 1:2 (v/v) de DMF-água e a solução foi submetida à etapa de limpeza, usando cartucho de extração em fase sólida.

O procedimento de limpeza consistiu no uso de bloco de extração em fase sólida (Waters) e SPE de C18 (500 mg, 3 mL, Bond Elut, Agilent), pré-condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de mistura de DMF-água (1:2, v/v). O extrato da amostra foi então passado pelo cartucho, seguido por limpeza com 10 mL de mistura de DMF-água (1:2, v/v) e 10 mL de água. O cartucho foi seco com ajuda de centrifugação por 25 min. Os analitos foram eluídos do SPE usando 10 mL de n-hexano, com fluxo máximo de 2 mL/min, e concentrados sob gás N₂. O resíduo foi dissolvido em 500 µL de acetonitrila, filtrado em membrana de 0,22 µm e acondicionado em vials para posterior análise cromatográfica. Para amostras que apresentaram concentrações acima do limite da curva de calibração, o volume de dissolução foi ajustado a fim de obter resultados dentro da faixa de trabalho.

As análises foram realizadas em duplicata, com duas injeções de cada extrato. A cada dia de análises realizadas, foi incluída uma prova em branco, para verificação da contaminação dos solventes e água utilizados. Para descontaminação das vidrarias, foram usados para enxague: água deionizada, etanol, acetona e n-hexano.

Figura 7 - Cromatógrafo a líquido de ultra eficiência (Shimadzu) usado na análise de HPAs

3.2.6.4 Validação

Para verificar as características de desempenho do método, foi realizada a validação de acordo com o Guia do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2010) e CAMARGO et al. (2011), incluindo os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade, exatidão (recuperação), precisão do método (repetitividade e precisão intermediária), precisão do sistema cromatográfico, limites de detecção e quantificação.

A linearidade do método foi determinada por preparações, em triplicatas verdadeiras, de seis níveis de concentrações de padrões dos HPAs preparados em acetonitrila, conforme descrito no Quadro 5, totalizando 18 ensaios. Foi verificada a variação de área versus as concentrações dos HPAs.

A seletividade foi avaliada pela adição, em concentrações idênticas, de padrões em cinco diferentes níveis em dois grupos: branco e amostra de óleo de cártamo (CA1). Todos os ensaios foram realizados em triplicata (Quadro 5). Foi verificada a variação de área versus as concentrações dos HPAs e comparadas as inclinações das curvas de calibração.

A exatidão da metodologia foi verificada através da avaliação da recuperação, para o mesmo de óleo de cártamo, sendo avaliada em quatro diferentes níveis de concentração, em triplicata (Quadro 5). Para avaliar a precisão do método (repetibilidade e precisão intermediária), a amostra foi fortificada em dois níveis de concentração (Quadro 5) e o CV

avaliado no mesmo dia e em dois dias diferentes, sendo a análise realizada por um único analista em um mesmo equipamento.

Também foi avaliada a precisão do sistema cromatográfico a partir da injeção da mesma amostra de óleo de cártamo fortificada com diferentes concentrações de HPAs (2 µg/kg para BaA e BaP, 3 µg/kg para Cri e 8 µg/kg para BbF) por quatro vezes, durante três dias consecutivos.

Quadro 5 - Informações sobre as faixas de concentração de HPAs usadas na validação para os ensaios de linearidade, seletividade, exatidão e precisão

	BaA e BaP	Cri	BbF	Nº níveis
Linearidade (ng/mL)	0,25-5,00	0,30-7,50	1,00-20,00	6
Seletividade (µg/kg)	0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 5,00	0,30; 0,75; 1,50; 3,00; 7,50	1,00; 2,00; 4,00; 8,00; 20,00	5
Exatidão (µg/kg)	0,25; 1,00; 2,00; 5,00	0,30; 1,50; 3,00; 7,50	1,00; 4,00; 8,00; 20,00	4
Precisão (µg/kg)	0,25; 2,00	0,30; 3,00	1,00; 8,00	2

BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno

Para cálculo dos limites de detecção e quantificação, foram usados os desvio-padrão (s) obtidos das concentrações de seis replicatas, nos menores níveis de concentração do ensaio de seletividade. Os LD e LQ foram calculados conforme as equações:

$$LD = 3 \times s$$

$$LQ = 10 \times s$$

onde s: desvio-padrão.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados expressos das análises foram apresentados como média e desvio-padrão. Quando adequado, foram aplicados os testes t de *Student*, ANOVA, *Tukey* e correlação de *Pearson* como ferramentas estatísticas, usando o programa *Action 2.5*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PARÂMETRO DE IDENTIDADE DE ÓLEOS VEGETAIS – ÁCIDOS GRAXOS

4.1.1 Otimização das condições analíticas

A otimização de um método precede a validação, já que as condições analíticas, uma vez otimizadas, não devem ser alteradas após a validação. Foram realizadas otimizações das condições cromatográficas e do método de esterificação.

4.1.1.1 Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram otimizadas usando uma solução preparada a partir de uma mistura de 37 padrões de EMAG disponível comercialmente, além de padrões individuais de isômeros *cis/trans* do 18:2, 18:3 e do CLA não presentes neste mix. As condições cromatográficas aplicadas, em CG/DIC, foram: gás de arraste: hidrogênio, fluxo constante: 0,27 mL/min, volume de injeção: 1 µL, temperatura do injetor: 250°C, temperatura do detector: 260°C. A separação dos compostos ocorreu em uma coluna capilar de sílica fundida (15 m x 0,1 mm x 0,1 µm, DB-FFAP, J&W Scientific, Agilent). Foram testadas várias programações de temperatura, e o Quadro 6 apresenta as condições inicial (Método 1, baseada no estudo de MASOOD et al., 2005) e final (Método 2) de trabalho. Os EMAG foram identificados pela comparação dos tempos de retenção com padrões comerciais, quando disponíveis, além da análise de óleos autênticos de coco, cártamo, prímula, linhaça, soja, oliva e peixe, que possuem perfis de EMAG característicos. Também foi utilizado o trabalho de MASOOD et al. (2005) para verificar a ordem de eluição dos compostos, uma vez que utilizaram a mesma coluna cromatográfica (DB-FFAP, Agilent).

A Figura 8 apresenta um cromatograma do mix dos componentes de EMAG e a Tabela 1 apresenta informações sobre os parâmetros obtidos na análise. O método escolhido (Método 2, Quadro 6) permitiu a separação de 35 dos 37 componentes presentes na mistura, com uma resolução dos ésteres metílicos superior a 1,0, para a maior parte dos EMAG. O número de pratos teóricos obtido foi superior a 3000/m de coluna para a maioria dos EMAG avaliados, o

mesmo encontrado por AUED-PIMENTEL (2007) usando coluna de 100 m, expressando a eficiência da coluna cromatográfica.

Quadro 6 - Condições cromatográficas para análise de EMAG por CG/DIC

Condições	Método 1	Método 2
Rampa de temperatura	100°C (0,5 min); 25°C/min até 195°C; 3°C/min até 205°C; 8°C/min até 230°C (4 min); 50°C/min até 245°C (0,5 min)	100°C (1 min); 45°C/min até 155°C (21 min); 15°C/min até 240°C (1 min); 1,5°C/min até 243°C (1 min)
Razão de divisão da amostra	1:150	1:350
Tempo de análise	17,2 min	34,4 min

Figura 8 - Cromatograma obtido pela análise por CG/DIC da mistura de 37 padrões certificados de EMAG (Fame Mix, Supelco), concentração de 1 mg/mL, com programação de temperatura do Método 2 (Quadro 6)

Tabela 1 - Resultados do desempenho da coluna DB-FFAP (15 m x 0,1 mm x 0,1 μ m), para separação da mistura de 37 padrões EMAG empregando as condições cromatográficas do Método 2 (Quadro 6)

Nº do pico	Ácido graxo	Tempo de retenção (min)	Número de pratos teóricos	Resolução
1	4:0	0,992	17877	-
2	6:0	1,338	32147	11,65
3	8:0	1,967	70281	21,19
4	10:0	2,719	121852	24,78
5	11:0	3,200	142992	14,83
6	12:0	3,836	160513	17,67
7	13:0	4,726	163789	21,00
8	14:0	6,025	162637	24,48
9	14:1 (9c)	6,598	168792	9,26
10	15:0	7,949	147191	18,41
11	15:1 (10c)	8,787	154413	9,75
12	16:0	10,843	145757	20,31
13	16:1 (7c)	11,599	153045	6,52
14	17:0	15,136	146375	25,62
15	17:1 (10c)	16,216	150651	6,66
16	18:0	21,619	130330	26,65
17	18:1 (9c)	22,583	121515	3,88
18	18:1 (9t)	22,893	145666	1,25
19	18:2 (9c, 12c)	24,868	951138	11,58
20	18:2 (9t, 12t)	25,117	1168087	2,56
21	18:3 (6c, 9c, 12c)	25,598	1681312	5,61
22	18:3 (9c, 12c, 15c)	26,293	2730747	9,77
23	20:0	27,509	4457755	21,06
24	20:1 (11c)	27,651	4573466	2,76
25	20:2	28,118	6229477	9,68
26	20:3 (8c, 11c, 14c)	28,346	6113694	5,02
27	21:0 + 20:3 (11c, 14c, 17c)	28,528	5662868	3,89
28	20:4 (5c, 8c, 11c, 14c)	28,700	6698591	3,73
29	20:5 (5c, 8c, 11c, 14c, 17c)	29,083	6181020	8,43
30	22:0	29,375	5425641	6,04
31	22:1 (13c)	29,510	5749909	2,72
32	22:2 (13c, 16c)	29,931	5370362	8,36
33	23:0	30,302	3969048	6,61
34	24:0	31,361	0	-
35	22:6 (4c, 7c, 10c, 13c, 16c, 19c)	31,389	0	-
36	24:1 (15c)	31,569	3491436	-

Quanto à eluição dos isômeros *cis/trans* 18:2 e 18:3, a programação de temperatura escolhida não promoveu a separação completa dos isômeros, no entanto promoveu a separação dos isômeros *cis* dos *trans*, importante para identificar e quantificar tais componentes (Figura 9).

Figura 9 - Cromatogramas obtidos pela análise por CG/DIC da mistura de padrões de isômeros *cis/trans* dos EMAG 18:2 e 18:3 na programação de temperatura utilizada (Método 2, Quadro 6). Símbolos: A: 18:2 (9*c*,12*c*); B: Outros isômeros *cis/trans* do 18:2; C: 18:3 (9*c*,12*c*,15*c*); D: Outros isômeros *cis/trans* do 18:3

Também foi injetado um padrão contendo isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA), e os tempos de retenção dos principais isômeros (18:2, 9*c*, 11*t* e 18:2, 10*t*, 12*c*) foram 26,67 min e 26,85 min, não coincidentes com nenhum EMAG até então analisado. A Figura 10 apresenta um cromatograma do padrão.

Figura 10 - Cromatograma obtido pela análise por CG/DIC de padrão de isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA) na programação de temperatura utilizada (Método 2, Quadro 6)

A coluna DB-FFAP (15 m x 0,1 mm x 0,1 μ m, Agilent), já usada na literatura para análise de EMAG em amostras biológicas (MASOOD et al., 2005; STARK e JUNIOR, 2005), mostrou-se satisfatória para o ensaio com óleos vegetais. Para separação dos EMAG, são usadas colunas de sílica fundida com fases estacionárias de alta polaridade e normalmente longas (100 m), para reduzir o risco de co-eluição em misturas complexas de isômeros de AG (RUIZ-RODRIGUEZ et al., 2010). Colunas capilares denominadas rápidas como a DB-FFAP, com tamanho, diâmetro e espessura de filme reduzidos, é uma nova geração de colunas que apresentam eficiência similar à obtida na técnica convencional, mas suportam trabalhar com pressões maiores e, principalmente, permitem um rápido aumento na taxa de aquecimento ou resfriamento. Desta maneira, traz inúmeros benefícios relacionados, como um menor tempo de análise cromatográfica (cerca de duas vezes menor em relação às colunas de 100 m), diminuição de gastos analíticos e aumento da produtividade do laboratório. Seu emprego mostra-se promissor na análise de alimentos (DESTAILLATS e CRUZ-HERNANDEZ, 2007).

4.1.1.2 Otimização do procedimento de esterificação

Foram realizados ensaios para avaliação da metodologia ao reduzir as quantidades de massa de óleo e reagentes empregados no método original de transesterificação (IAL, 2005). O objetivo foi evitar a saturação da coluna cromatográfica, uma vez que a usada é do tipo rápida e possui tamanho, diâmetro e espessura de filme reduzidos (DB-FFAP). Além disso, seria possível usar uma menor quantidade de reagentes e gerar menos resíduos.

Usando uma amostra comercial de óleo de linhaça (LI1), todas as quantidades empregadas na metodologia original (A) foram reduzidas em metade (B) e um terço (C), segundo descrito no Quadro 7. O extrato orgânico de todos os procedimentos foi diluído na proporção de 1:4 com n-hexano.

Quadro 7 - Massas de óleo e quantidade de reagentes utilizados em diferentes procedimentos para avaliação do método de esterificação

Procedimento	Massa de óleo (mg)	Volume hexano (mL)	Volume NaOH (mL)	Volume esterificante (mL)	Volume NaCl (mL)
A	100,0	3,0	4,0	5,0	6,0
B	50,0	1,5	2,0	2,5	3,0
C	33,0	1,0	1,3	1,7	2,0

A Tabela 2 apresenta os valores obtidos, em % p/p de EMAG, para os principais ácidos graxos encontrados neste óleo de linhaça. Utilizou-se o teste t de *Student* para a comparação das médias entre os grupos ($\alpha=0,05$). A análise estatística indicou que não houve diferença significativa entre o procedimento A e C. Desta forma, foi escolhido o procedimento C para análise das amostras comerciais.

Tabela 2 – Composição de ácidos graxos, % p/p de EMAG, encontrada em amostra de linhaça (LI1), usando diferentes procedimentos

	Procedimento					
	A		B		C	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
16:0	5,105 ^a	0,069	5,062 ^a	0,020	5,113 ^a	0,058
18:0	3,913 ^a	0,163	3,994 ^a	0,160	3,966 ^a	0,131
18:1, 9c	19,418 ^a	0,133	19,313 ^a	0,060	19,434 ^a	0,222
18:2 c	14,066 ^a	0,249	13,882 ^a	0,050	13,949 ^a	0,126
18:3 c	55,738 ^a	0,563	55,867 ^a	0,324	55,751 ^a	0,308

Valores expressos como média de cinco replicatas; DP: desvio-padrão; Médias seguidas da mesma letra, na linha, não possuem diferença significativa ($p>0,05$, teste t *Student*)

4.1.2 Validação

Para o estudo de linearidade, soluções diluídas de RM-1 (AOCS), com concentrações variando de 1000 a 10000 µg/mL, foram analisadas. A equação foi obtida através da regressão linear pelos métodos dos mínimos quadrados, do tipo $y = ax + b$. Os coeficientes de regressão linear e as equações de reta obtidas para cada EMAG presente no material estão apresentados na Tabela 3. O coeficiente de correlação quadrado (r^2) fornece a ideia percentual de correlação dos pontos com a reta e, quanto mais próximo de 1, melhor é o modelo matemático expresso pela reta. De um modo geral, um r^2 superior ou igual a 0,995 é requerido para considerar o método linear (GUIMARÃES et al., 2010). Na faixa de estudo, foi encontrada uma boa linearidade com valores superiores a 0,998. A Figura 11 apresenta o perfil de ácidos graxos de uma solução de RM-1 (AOCS) com 4000 µg/mL.

Tabela 3 - Coeficientes relacionados às curvas de calibração, construídas em soluções com diferentes concentrações (1000 a 10000 µg/mL) a partir da mistura RM-1 (AOCS)

	16:0	18:0	18:1, 9c	18:2	18:3	20:0
Inclinação (a)	3,1932	1,6536	18,6649	26,7552	1,5608	1,6234
Intercepto (b)	-25,0475	-264,6286	-516,9503	-2362,5152	-3,8542	-49,1805
r	0,9991	0,9990	0,9999	0,9997	0,993	0,9998
r ²	0,9983	0,9980	0,9998	0,9994	0,9986	0,9996
n	15	15	15	15	15	15
Faixa de concentração (µg/mL)	60-600	30-300	350-3500	500-5000	30-300	30-300

Figura 11 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC para o material RM-1, AOCS (C=4000 µg/mL)

A Tabela 4 apresenta os resultados da exatidão para o RM-1 (AOCS), obtidos a partir da % p/p de EMAG. Os valores médios encontrados variaram de 99,6 a 100,6% e foram considerados adequados.

Tabela 4 - Resultados encontrados na exatidão para o material RM-1 (AOCS)

	16:0	18:0	18:1, 9c	18:2 c	18:3 c	20:0
Média (% p/p EMAG)	6,002	2,999	34,997	49,995	2,989	3,019
DP	0,010	0,005	0,004	0,011	0,003	0,003
Valor do certificado (% p/p EMAG)	6,0	3,0	35,0	50,0	3,0	3,0
Exatidão (%)	100,0	100,0	100,0	100,0	99,6	100,6

Valores expressos como média de quatro replicatas; DP: desvio-padrão

Foi realizada a recuperação do TAG 11:0, adicionando-se diferentes alíquotas do padrão, referentes a quatro níveis, em triplicata. A Tabela 5 apresenta as quantidades adicionadas e os resultados de recuperação: os valores variaram de 94,51% a 95,25%, e foram considerados aceitáveis.

Tabela 5 - Recuperação do padrão 11:0 (TAG), com fortificação em diferentes níveis, para amostra de óleo de linhaça (LI1)

Nível	Quantidade de 11:0 (TAG) adicionado (µg)	Recuperação (%)		
		Média (%)	DP (%)	CV (%)
1	155,0	94,83	1,81	1,91
2	258,0	94,51	1,80	1,90
3	361,0	95,03	0,82	0,86
4	464,0	95,25	0,56	0,59

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; CV: coeficiente de variação

A repetibilidade e a precisão intermediária foram avaliadas a partir dos CV obtidos para as % p/p dos principais EMAG na amostra de linhaça (LI1), e os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 6. Os coeficientes de variação obtidos, para o mesmo dia e entre dias, foram abaixo de 1,5% e considerados satisfatórios.

Para verificar a precisão do sistema cromatográfico, foi realizada a injeção do mesmo extrato de amostra de referência (RM-1, AOCS) por quatro vezes, durante três períodos consecutivos. Foi avaliado o CV dos tempos de retenção e das áreas dos picos. Os valores de CV encontrados para as áreas, dentro do mesmo período e entre períodos, foram inferiores a 5,0% e, para os tempos de retenção, inferiores a 0,06%, indicando a elevada precisão do sistema.

Tabela 6 - Resultados obtidos nos ensaios de precisão (repetibilidade e precisão intermediária) para os EMAG usando amostra de óleo de linhaça (LI1)

	Repetibilidade CV (%)			Precisão intermediária CV (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	
16:0	0,82	0,93	0,42	0,91
18:0	0,50	1,19	0,51	1,44
18:1, 9c	0,55	0,89	0,18	0,73
18:2 c	0,33	0,61	0,03	0,50
18:3 c	0,57	0,50	0,08	0,42

Valores expressos como média de três replicatas; CV: coeficiente de variação

Na avaliação do desempenho da reação de transesterificação, a faixa de recuperação do 11:0 (TAG) variou entre 90,7 e 104,7%, com média de 95,6%, e estavam adequados, dentro da variabilidade sugerida de $100,0 \pm 20,0\%$ (CRUZ-HERNANDEZ et al., 2013). Segundo CRUZ-HERNANDEZ et al. (2013), quando valores estão fora desta faixa, pode indicar problemas durante a reação, como uma reação incompleta ou degradação por hidrólise, e o procedimento analítico deve ser repetido para que resultados satisfatórios sejam obtidos.

Os valores calculados para os limites de detecção e quantificação foram de 0,030% e de 0,100%, respectivamente, indicando que o método é sensível para a proposta sugerida.

4.1.3 Perfil de AG em amostras comerciais

As Tabelas 7 a 10 apresentam o perfil de AG para os diferentes óleos vegetais analisados.

Os resultados encontrados para os óleos de coco revelaram que 9 amostras apresentaram os perfis dentro dos limites estabelecidos pelo *Codex*, caracterizados pelo alto conteúdo de ácidos láurico e mirístico (CODEX 1999, revisada em 2015). O óleo CO5 apresentou uma porcentagem maior de ácido α -linolênico (0,652%), o que indica uma suposta adulteração com algum outro óleo vegetal que apresente maior teor deste AG (Tabela 7). A Figura 12 apresenta o perfil de ácidos graxos de uma amostra de óleo de coco.

Para os óleos de cártamo analisados, os dados indicaram que 6 amostras (CA1, CA3, CA5, CA7, CA8, CA9) apresentaram elevados teores de ácido linoleico, característico deste óleo; os teores de ALA foram superiores ao limite da legislação, no entanto muito próximos a ele e semelhantes aos encontrados na literatura (VOSOUGHKIA et al., 2011). Quatro amostras (CA2, CA4, CA6, CA10) estavam em desacordo para vários EMAG em comparação com os limites estabelecidos pelo *Codex* (Tabela 8), sendo assim consideradas adulteradas por este ensaio. Para estas amostras, o perfil encontrado para a amostra CA2 estava muito próximo da CA10, e a amostra CA4 da CA6, sendo que todas apresentaram teores acima do permitido para o ácido oleico (OL) e ALA, e menores para LA. Mas não foi possível distinguir, através desta análise, qual o tipo de adulterante usado, sugerindo uma possível mistura de óleos que, para ser caracterizada, também seriam necessárias outras análises. As Figuras 13 e 14 apresentam cromatogramas obtidos para amostras de óleo de cártamo.

Quanto às amostras de primula, apenas uma possuía o perfil característico para este óleo (PR10), com elevado teor de LA e de GLA, e nove (90%) estavam com um perfil diferenciado

(Tabela 9). A amostra PR9 apresentou o GLA, no entanto o teor foi abaixo do comumente encontrado na literatura (FIRESTONE, 2005); para os outros AG desta amostra, os OL e ALA apresentaram maiores teores e LA menor, indicando uma possível mistura. Nas demais 8 amostras, o GLA não apareceu no perfil, e houve variação fora da faixa esperada para as porcentagens de demais ácidos graxos, como o esteárico, OL, LA e ALA; em seis delas (PR1, PR4, PR5, PR6, PR7 e PR8) foi possível identificar um perfil compatível com o característico de óleo de soja. As Figuras 15 e 16 apresentam cromatogramas obtidos para amostras de óleo de prímula.

Já para os óleos de linhaça analisados, todas as amostras apresentaram teores elevados de ALA, variando de 49,949 a 59,377% (Tabela 10), característico deste produto. Os teores de ALA foram superiores a 52%, valor mínimo indicado por FIRESTONE (2005), para 6 amostras. Os valores para os ácidos esteárico, OL, LA e ALA estavam fora da faixa apresentada por FIRESTONE (2005) para algumas das amostras, no entanto estavam compatíveis com os encontrados por RACZYK et al. (2015). A Figura 17 apresenta o perfil de ácidos graxos de uma amostra de óleo de linhaça.

Algumas diferenças foram encontradas para determinados AG nos óleos de cártamo e linhaça, especialmente para OL, LA e ALA, que estavam fora da faixa sugerida, seja pela legislação ou por FIRESTONE (2005), no entanto foram compatíveis com outros trabalhos da literatura e, por isso, estes óleos foram considerados autênticos. Deve-se considerar que a variedade de genótipos existentes para as plantas, suas origens e o meio ambiente em que foram cultivadas podem influenciar no perfil de AG dos óleos produzidos pelas mesmas (CHOO et al., 2007). Em estudos realizados com diferentes genótipos de cártamo e linhaça, houve diferença significativa no perfil de AG dos óleos extraídos (WAKJIRA et al., 2004; VOSOUGHKIA et al., 2011).

O problema fundamental para assegurar a autenticidade do óleo é definir quais parâmetros devem ser checados para confirmar a identidade do produto. Analisando as variações das faixas permitidas pela legislação do *Codex*, é possível verificar que, para a maioria dos EMAG, existe uma grande amplitude entre os limites inferior e superior. Em alguns casos, a adulteração é sutil e não é possível de ser detectada com apenas um único ensaio. Embora a análise de AG seja a técnica mais empregada na literatura para caracterizar a identidade de óleos vegetais, é essencial e necessária uma combinação de diferentes técnicas juntamente com este ensaio, incluindo esteróis, tocoferóis, triglicerídeos, dentre outras, para confirmação (ULBERTH e BUCHGRABER, 2000; AUED-PIMENTEL et al., 2013; HIRASHIMA et al., 2013).

Assim, a partir da análise do perfil de AG, pode-se concluir que, do total de 40 óleos vegetais analisados, 14 (35%) não se encontravam dentro do perfil característico que os declarados em seus rótulos. Em uma revisão sobre adulterações de alimentos nos EUA desde 1980, foi observado que os óleos e gorduras apresentaram uma expressiva quantidade de incidentes, sendo a quarta categoria com maior número de casos, após a de peixes e frutos do mar, produtos lácteos e sucos de frutas (EVERSTINE et al., 2013).

A avaliação da autenticidade de óleos e gorduras é uma questão importante, seja para consumidores, fabricantes de alimentos e autoridades regulatórias. Alguns óleos de alto valor, especialmente os extraídos a frio, podem sofrer adulteração, seja intencionalmente ou acidentalmente. Mas, normalmente, a adulteração ocorre de forma intencional, visando lucro. A adulteração pode ocorrer pela adição ou substituição por outros óleos, de menor valor nutritivo e comercial, gerando não apenas perdas econômicas, mas também uma diminuição dos benefícios para a saúde (EVERSTINE et al., 2013).

Em estudos nacionais já realizados com as categorias de óleos deste estudo, foi encontrada uma alta incidência de adulteração. Para os óleos encapsulados, 5 amostras de cártamo (8), 3 de linhaça (6) e 1 de prímula (5) estavam adulteradas, e as adulterações ocorreram pela adição de óleo de soja ou pela presença de CLA (HIRASHIMA et al., 2013). Em trabalho realizado com óleo de coco, uma de cinco amostras tratava-se de uma mistura de óleo de coco e soja (AUED-PIMENTEL et al., 2013).

Nos óleos de cártamo autênticos, não foi detectada a presença de CLA. A Figura 18 mostra uma sobreposição de cromatogramas do padrão de CLA e uma amostra autêntica de óleo de cártamo (CA5), comprovando que não foi verificada a presença daquele componente na amostra. O CLA é um grupo de isômeros do ácido linoleico, que são obtidos pela isomerização alcalina e hidrogenação de óleos contendo elevada proporção de LA, como o óleo de cártamo e de soja, produzindo principalmente isômeros 18:2 (18:2, 9c, 11t) e 18:2 (18:2, 10t, 12c). No Brasil não é permitida a venda de óleos contendo CLA desde 2007, uma vez que estudos não foram conclusivos sobre sua eficiência e segurança para uso (BRASIL, 2007; HIRASHIMA et al., 2013). No entanto, no trabalho realizado por HIRASHIMA et al. (2013), foi detectada a presença de CLA em óleos rotulados como cártamo.

Tabela 7 - Composição de ácidos graxos (% p/p de EMAG) obtidos para os diferentes óleos de coco analisados

	CO1		CO2		CO3		CO4		CO5		CODEX (2015)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Mínimo	Máximo
C6	0,457 ^a	0,028	0,381 ^b	0,011	0,329 ^c	0,008	0,316 ^c	0,001	0,268 ^d	0,003	<0,05	0,7
C8	7,298 ^a	0,272	5,600 ^b	0,075	6,662 ^c	0,051	7,008 ^{a,d}	0,042	6,310 ^e	0,068	4,6	10
C10	6,088 ^a	0,104	4,808 ^b	0,032	5,764 ^c	0,015	6,346 ^d	0,024	5,067 ^e	0,024	5,0	8,0
C12	52,181 ^a	0,059	49,611 ^b	0,523	50,447 ^c	0,075	52,227 ^a	0,080	47,479 ^d	0,133	45,1	53,2
C14	17,693 ^a	0,154	19,549 ^b	0,106	18,527 ^c	0,026	17,461 ^a	0,037	19,296 ^d	0,052	16,8	21,0
C16	7,649 ^a	0,086	9,491 ^b	0,170	8,430 ^c	0,014	7,742 ^a	0,037	8,586 ^{c,d}	0,053	7,5	10,2
C18	2,884 ^a	0,051	4,007 ^b	0,126	3,009 ^{a,b}	0,006	2,972 ^{a,b}	0,019	2,798 ^{a,c}	0,038	2,0	4,0
C18:1c	4,635 ^a	0,080	5,593 ^b	0,156	5,535 ^b	0,030	4,898 ^c	0,019	7,218 ^d	0,055	5,0	10,0
C18:2c	0,946 ^a	0,021	0,748 ^b	0,007	1,098 ^c	0,014	0,876 ^{a,c}	0,041	2,145 ^d	0,053	1,0	2,5
C18:3c	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<u>0,652^a</u>	0,020	<0,05	0,2
C20	0,104 ^a	0,018	0,130 ^b	0,008	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,05	0,2
C20:1	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,05	0,2
C22:0	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,05	<0,05
C24:0	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,05	<0,05
Outros	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-	-
<i>Trans</i>	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-	-
Saturados	94,354	-	93,577	-	93,296	-	94,182	-	89,935	-	-	-
Monoinsaturados	4,657	-	5,622	-	5,567	-	4,925	-	7,263	-	-	-
Poli-insaturados	0,946	-	0,748	-	1,134	-	0,896	-	2,797	-	-	-

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; *Trans*: 18:2t + 18:3t; Amostras em negrito: consideradas possivelmente adulteradas pelo ensaio de AG; Valores sublinhados: fora da faixa permitida pela legislação; Médias seguidas da mesma letra, na linha, não possuem diferença significativa (Teste de *Tukey*, 5%)

continua

Tabela 7 - Composição de ácidos graxos (% p/p de EMAG) obtidos para os diferentes óleos de coco analisados (continuação)

	CO6		CO7		CO8		CO9		CO10		CODEX (2015)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Mínimo	Máximo
C6	0,300 ^{c,d}	0,008	0,317 ^c	0,004	0,312 ^c	0,009	0,322 ^c	0,004	0,309 ^c	0,011	<0,05	0,7
C8	6,748 ^{c,d}	0,106	6,879 ^{c,d}	0,076	6,889 ^{c,d}	0,055	6,876 ^{c,d}	0,022	6,907 ^{c,d}	0,082	4,6	10
C10	5,240 ^f	0,029	5,283 ^{f,g}	0,021	5,326 ^{g,h}	0,025	6,107 ^a	0,014	5,430 ^h	0,035	5,0	8,0
C12	48,149 ^e	0,043	48,361 ^e	0,134	48,426 ^e	0,157	51,741 ^a	0,114	48,600 ^e	0,094	45,1	53,2
C14	19,491 ^{b,d}	0,053	19,726 ^b	0,048	19,100 ^d	0,067	18,109 ^e	0,039	19,211 ^d	0,079	16,8	21,0
C16	8,436 ^{c,d}	0,035	8,403 ^{c,d}	0,036	8,306 ^c	0,059	7,967 ^c	0,040	8,306 ^c	0,068	7,5	10,2
C18	2,704 ^c	0,014	2,717 ^c	0,032	2,685 ^c	0,031	2,882 ^{a,b}	0,026	2,697 ^c	0,015	2,0	4,0
C18:1c	6,839 ^e	0,037	6,417 ^f	0,043	6,900 ^e	0,106	4,944 ^c	0,051	6,598 ^f	0,058	5,0	10,0
C18:2c	1,898 ^e	0,070	1,701 ^f	0,007	1,875 ^e	0,039	0,816 ^{b,c}	0,017	1,731 ^g	0,016	1,0	2,5
C18:3c	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	0,133 ^b	0,014	<0,100	-	<0,05	0,2
C20	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,05	0,2
C20:1	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,05	0,2
C22:0	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,05	<0,05
C24:0	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,05	<0,05
Outros	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-	-
<i>Trans</i>	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-	-
Saturados	91,190	-	91,809	-	91,163	-	94,117	-	91,517	-	-	-
Monoinsaturados	6,873	-	6,450	-	6,935	-	4,971	-	6,666	-	-	-
Poli-insaturados	1,919	-	1,721	-	1,903	-	0,949	-	1,767	-	-	-

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; *Trans*: 18:2t + 18:3t; Médias seguidas da mesma letra, na linha, não possuem diferença significativa (Teste de Tukey, 5%)

Tabela 8 - Composição de ácidos graxos (% p/p de EMAG) obtidos para os diferentes óleos de cártamo analisados

	CA1		CA2		CA3		CA4		CA5		CODEX (2015)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Mínimo	Máximo
14:0	0,104 ^a	0,002	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	0,103 ^a	0,001	<0,05	0,2
16:0	6,481 ^a	0,050	<u>8,811^b</u>	0,019	6,234 ^c	0,034	<u>8,897^b</u>	0,027	6,511 ^a	0,055	5,3	8,0
16:1c	<0,100	-	0,108 ^a	0,007	<0,100	-	0,131 ^b	0,006	0,101 ^a	0,004	<0,05	0,2
17:0	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,05	0,1
17:1	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,05	0,1
18:0	2,602 ^a	0,025	<u>3,662^b</u>	0,019	2,564 ^{a,c}	0,032	<u>3,710^b</u>	0,009	2,583 ^{a,c}	0,009	1,9	2,9
18:1c	14,656 ^a	0,070	<u>31,703^b</u>	0,039	14,426 ^c	0,049	<u>41,160^d</u>	0,035	14,730 ^a	0,035	8,4	21,3
18:2c	73,567 ^a	0,158	<u>50,015^b</u>	0,059	74,701 ^c	0,057	<u>37,581^d</u>	0,065	73,424 ^a	0,064	67,8	83,2
18:3c	0,141 ^a	0,003	<u>3,784^b</u>	0,013	0,113 ^a	0,006	<u>6,123^c</u>	0,022	0,145 ^a	0,018	<0,05	0,1
20:0	0,399 ^a	0,007	0,349 ^b	0,005	0,369 ^b	0,005	0,468 ^c	0,013	0,422 ^{a,d}	0,018	0,2	0,4
20:1	0,174 ^a	0,006	0,175 ^a	0,003	0,152 ^b	0,007	0,218 ^c	0,006	0,205 ^c	0,016	0,1	0,3
22:0	0,320 ^a	0,014	0,581 ^b	0,025	0,268 ^c	0,002	0,396 ^d	0,005	0,320 ^a	0,008	<0,05	1,0
24:0	0,122 ^a	0,018	0,183 ^b	0,002	0,101 ^a	0,010	0,165 ^b	0,006	0,120 ^a	0,013	<0,05	0,2
24:1	0,141 ^a	0,006	<0,100	-	0,148 ^a	0,004	<0,100	-	0,135 ^a	0,002	<0,05	0,2
Outros	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	0,141	-	<0,100	-	-	-
<i>Trans</i>	1,147	-	0,416	-	0,689	-	0,750	-	1,114	-	-	-
Saturados	10,063	-	13,730	-	9,656	-	13,781	-	10,089	-	-	-
Monoinsaturados	15,065	-	32,041	-	14,824	-	41,623	-	15,171	-	-	-
Poli-insaturados	73,707	-	53,799	-	74,814	-	43,704	-	73,569	-	-	-

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; *Trans*: 18:2t + 18:3t; Amostras em negrito: consideradas possivelmente adulteradas pelo ensaio de AG; Valores sublinhados: fora da faixa permitida pela legislação; Médias seguidas da mesma letra, na linha, não possuem diferença significativa (Teste de *Tukey*, 5%)

continua

Tabela 8 - Composição de ácidos graxos (% p/p de EMAG) obtidos para os diferentes óleos de cártamo analisados (continuação)

	CA6		CA7		CA8		CA9		CA10		CODEX (2015)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Mínimo	Máximo
14:0	<0,100	-	<0,100	-	0,101 ^a	0,002	0,107 ^a	0,001	<0,100	-	<0,05	0,2
16:0	<u>8,674^d</u>	0,025	6,393 ^{a,e}	0,005	6,339 ^e	0,031	6,382 ^e	0,025	5,493 ^f	0,007	5,3	8,0
16:1c	0,175 ^c	0,011	0,109 ^a	0,004	0,104 ^a	0,002	0,104 ^a	0,001	<0,100	-	<0,05	0,2
17:0	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,05	0,1
17:1	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,05	0,1
18:0	<u>3,319^d</u>	0,017	2,518 ^c	0,033	2,403 ^e	0,027	2,539 ^{a,c}	0,023	<u>3,121^f</u>	0,005	1,9	2,9
18:1c	<u>41,201^d</u>	0,048	13,559 ^e	0,018	11,326 ^f	0,052	13,455 ^e	0,054	<u>31,804^g</u>	0,063	8,4	21,3
18:2c	<u>36,990^e</u>	0,058	75,580 ^f	0,021	78,207 ^g	0,113	75,244 ^h	0,099	<u>55,141ⁱ</u>	0,052	67,8	83,2
18:3c	<u>6,955^d</u>	0,004	0,148 ^a	0,006	0,110 ^a	0,024	0,121 ^a	0,004	<u>2,576^e</u>	0,008	<0,05	0,1
20:0	0,449 ^{c,d}	0,014	0,393 ^{a,e}	0,008	0,368 ^{b,c}	0,003	0,438 ^d	0,005	0,289 ^f	0,004	0,2	0,4
20:1	0,236 ^c	0,007	0,148 ^b	0,005	0,161 ^{a,b}	0,000	0,162 ^{a,b}	0,004	0,216 ^c	0,000	0,1	0,3
22:0	0,391 ^d	0,008	0,249 ^c	0,002	0,292 ^{a,c}	0,001	0,312 ^a	0,008	0,729 ^e	0,027	<0,05	1,0
24:0	0,160 ^b	0,017	0,110 ^a	0,017	0,115 ^a	0,004	0,109 ^a	0,004	0,266 ^c	0,003	<0,05	0,2
24:1	<0,100	-	0,140 ^a	0,011	0,154 ^a	0,003	0,154 ^a	0,003	<0,100	-	<0,05	0,2
Outros	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-	-
<i>Trans</i>	1,067	-	0,513	-	0,280	-	0,815	-	<0,100	-	-	-
Saturados	13,149	-	9,787	-	9,642	-	9,914	-	10,000	-	-	-
Monoinsaturados	41,735	-	13,955	-	11,744	-	13,875	-	32,133	-	-	-
Poli-insaturados	43,945	-	75,728	-	78,317	-	75,365	-	57,717	-	-	-

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; *Trans*: 18:2t + 18:3t; Amostras em negrito: consideradas possivelmente adulteradas pelo ensaio de AG; Valores sublinhados: fora da faixa permitida pela legislação; Médias seguidas da mesma letra, na linha, não possuem diferença significativa (Teste de Tukey, 5%)

Tabela 9 - Composição de ácidos graxos (% p/p de EMAG) obtidos para os diferentes óleos de prímula analisados

	PR1		PR2		PR3		PR4		PR5		FIRESTONE (2005)
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
14:0	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	0,279 ^a	0,005	0,286 ^a	0,001	0,07
16:0	<u>10,712^a</u>	0,022	<u>11,526^b</u>	0,060	<u>10,601^a</u>	0,027	<u>10,871^c</u>	0,077	<u>10,867^c</u>	0,035	6-10
16:1c	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	0,04
17:0	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-
17:1	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-
18:0	<u>4,374^a</u>	0,019	<u>3,099^b</u>	0,034	<u>3,878^c</u>	0,050	<u>3,951^{c,d}</u>	0,041	<u>3,984^d</u>	0,008	1,5-3,5
18:1c	<u>26,759^a</u>	0,075	<u>27,158^b</u>	0,085	<u>25,968^c</u>	0,134	<u>25,606^c</u>	0,013	<u>25,917^c</u>	0,013	5-12
18:2c	<u>50,348^a</u>	0,130	<u>52,076^b</u>	0,159	<u>50,994^c</u>	0,193	<u>50,853^c</u>	0,138	<u>50,417^a</u>	0,258	65-80
18:3 n-6	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	8-14
18:3 n-3	<u>5,579^a</u>	0,022	<u>2,908^b</u>	0,011	<u>3,913^c</u>	0,045	<u>5,534^a</u>	0,058	<u>5,655^a</u>	0,308	0,2
20:0	0,428 ^a	0,007	0,445 ^a	0,015	0,456 ^{a,b}	0,014	0,387 ^{b,c}	0,010	0,387 ^{b,c}	0,003	0,3
20:1	0,183 ^a	0,004	0,169 ^a	0,002	0,175 ^a	0,006	0,177 ^a	0,010	0,190 ^a	0,003	0,2
22:0	0,473 ^a	0,005	0,234 ^b	0,011	0,454 ^{a,c}	0,022	0,444 ^a	0,001	0,456 ^d	0,001	0,1
24:0	0,179 ^a	0,011	0,144 ^a	0,011	0,164 ^a	0,008	0,157 ^a	0,009	<0,100	-	0,1
Outros	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	0,626	-	0,608	-	-
<i>Trans</i>	0,656	-	1,928	-	3,051	-	0,922	-	0,997	-	-
Saturados	16,323	-	15,581	-	15,703	-	16,164	-	16,088	-	-
Monoinsaturados	27,073	-	27,459	-	26,274	-	25,902	-	26,234	-	-
Poli-insaturados	55,927	-	54,984	-	54,907	-	56,387	-	56,072	-	-

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; *Trans*: 18:2t + 18:3t; Amostras em negrito: consideradas possivelmente adulteradas pelo ensaio de AG; Valores sublinhados: fora da faixa comumente encontrada (FIRESTONE, 2005); Médias seguidas da mesma letra, na linha, não possuem diferença significativa (Teste de *Tukey*, 5%)

continua

Tabela 9 - Composição de ácidos graxos (% p/p de EMAG) obtidos para os diferentes óleos de prímula analisados (continuação)

	PR6		PR7		PR8		PR9		PR10		FIRESTONE
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	(2005)
14:0	<0,100	-	0,131 ^b	0,004	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	0,07
16:0	<u>11,943^d</u>	0,014	9,434 ^e	0,019	<u>10,956^c</u>	0,021	8,465 ^f	0,035	6,381 ^g	0,068	6-10
16:1c	<u>0,132^a</u>	0,013	<0,100	-	<u>0,105^a</u>	0,004	<0,100	-	<0,100	-	0,04
17:0	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-
17:1	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-
18:0	2,137 ^e	0,016	<u>3,698^f</u>	0,005	<u>4,482^g</u>	0,033	3,124 ^b	0,013	1,891 ^h	0,037	1,5-3,5
18:1c	<u>28,174^d</u>	0,025	<u>26,413^a</u>	0,012	<u>27,725^b</u>	0,036	<u>18,103^e</u>	0,037	7,141 ^f	0,126	5-12
18:2c	<u>49,014^d</u>	0,016	<u>49,806^e</u>	0,059	<u>48,337^f</u>	0,082	<u>61,366^g</u>	0,020	72,747 ^h	0,160	65-80
18:3 n-6	<u><0,100</u>	-	<u><0,100</u>	-	<u><0,100</u>	-	<u>4,281^a</u>	0,020	9,786 ^b	0,045	8-14
18:3 n-3	<u>4,915^d</u>	0,010	<u>7,462^e</u>	0,012	<u>4,199^c</u>	0,019	<u>2,813^b</u>	0,011	0,471 ^f	0,085	0,2
20:0	0,479 ^b	0,001	0,380 ^c	0,020	0,507 ^d	0,002	0,371 ^c	0,001	0,296 ^e	0,005	0,3
20:1	0,197 ^a	0,001	0,197 ^a	0,011	0,193 ^a	0,003	0,220 ^b	0,003	0,352 ^c	0,034	0,2
22:0	0,196 ^e	0,001	0,508 ^f	0,005	0,545 ^g	0,001	0,442 ^{c,d}	0,004	0,121 ^h	0,002	0,1
24:0	0,155 ^a	0,001	0,183 ^a	0,007	0,187 ^a	0,005	0,118 ^a	0,003	<0,100	-	0,1
Outros	<0,100	-	0,171 ^a	-	<0,100	-	<0,100	-	0,545 ^b	-	-
<i>Trans</i>	2,492	-	1,418	-	2,508	-	0,414	-	<0,100	-	-
Saturados	15,024	-	14,401	-	16,849	-	12,654	-	8,850	-	-
Monoinsaturados	28,541	-	26,743	-	28,069	-	18,448	-	7,571	-	-
Poli-insaturados	53,930	-	57,268	-	52,537	-	68,459	-	83,004	-	-

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; *Trans*: 18:2t + 18:3t; Amostras em negrito consideradas possivelmente adulteradas pelo ensaio de AG; Valores sublinhados: fora da faixa comumente encontrada (FIRESTONE, 2005); Médias seguidas da mesma letra, na linha, não possuem diferença significativa (Teste de *Tukey*, 5%)

Tabela 10 - Composição de ácidos graxos (% p/p de EMAG) obtidos para os diferentes óleos de linhaça analisados

	LI1		LI2		LI3		LI4		LI5		FIRESTONE (2005)
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
14:0	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-
16:0	5,113 ^a	0,058	4,971 ^a	0,010	5,838 ^b	0,043	6,073 ^c	0,002	5,949 ^{b,d}	0,040	5,7-7
16:1c	<0,100	-	<0,100	-	0,125 ^a	0,005	0,350 ^b	0,005	0,118 ^a	0,010	-
17:0	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-
17:1	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-
18:0	3,966 ^a	0,131	2,783 ^b	0,058	4,499 ^c	0,009	4,696 ^d	0,090	4,635 ^{c,d}	0,015	3-4
18:1c	19,434 ^a	0,222	14,272 ^b	0,050	18,441 ^c	0,039	21,234 ^d	0,012	23,610 ^e	0,028	20-20,3
18:2c	13,949 ^a	0,126	16,957 ^b	0,029	14,421 ^c	0,009	13,873 ^a	0,005	14,377 ^c	0,047	17-17,3
18:3c	55,751 ^a	0,308	59,377 ^b	0,055	55,584 ^a	0,082	52,528 ^c	0,042	50,023 ^d	0,033	52-54
20:0	0,105 ^a	0,016	0,108 ^a	0,007	0,149 ^b	0,003	0,226 ^c	0,008	0,206 ^d	0,009	0-0,1
20:1	0,117 ^a	0,011	0,103 ^a	0,003	<0,100	-	0,138 ^b	0,003	0,165 ^c	0,007	-
22:0	0,141 ^a	0,064	0,115 ^a	0,034	0,150 ^a	0,007	0,181 ^a	0,010	0,188 ^a	0,008	-
24:0	0,264 ^a	0,133	0,224 ^a	0,011	0,331 ^b	0,016	0,280 ^a	0,012	0,321 ^b	0,011	-
24:1	0,178 ^a	0,011	0,195 ^b	0,010	0,100	0,010	<0,100	-	<0,100	-	-
Outros	0,685	-	0,473		<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-
<i>Trans</i>	0,125	-	0,281	-	0,165	-	0,194	-	0,182	-	-
Saturados	9,662	-	8,289	-	11,068	-	11,604	-	11,399	-	-
Monoinsaturados	19,828	-	14,623	-	18,757	-	21,920	-	23,961	-	-
Poli-insaturados	69,700	-	76,334	-	70,005	-	66,237	-	64,401	-	-

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; *Trans*: 18:2t + 18:3t; Valores sublinhados: fora da faixa comumente encontrada (FIRESTONE, 2005); Médias seguidas da mesma letra, na linha, não possuem diferença significativa (Teste de *Tukey*, 5%)

continua

Tabela 10 - Composição de ácidos graxos (% p/p de EMAG) obtidos para os diferentes óleos de linhaça analisados (continuação)

	LI6		LI7		LI8		LI9		LI10		FIRESTONE
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	(2005)
14:0	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	0,150	0,002	-
16:0	6,011 ^{c,d}	0,100	6,035 ^{c,d}	0,020	5,822 ^b	0,018	6,000 ^{c,d}	0,024	5,971 ^{b,d}	0,013	5,7-7
16:1c	0,107 ^a	0,005	0,660 ^c	0,005	0,187 ^d	0,008	0,218 ^e	0,003	0,232 ^e	0,009	-
17:0	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-
17:1	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	-
18:0	4,616 ^{c,d}	0,100	4,768 ^{d,e}	0,006	4,740 ^{d,e}	0,039	4,658 ^{c,d}	0,031	4,846 ^e	0,029	3-4
18:1c	23,738 ^e	0,079	23,311 ^f	0,072	20,968 ^d	0,062	21,566 ^{d,g}	0,052	21,785 ^g	0,017	20-20,3
18:2c	14,428 ^c	0,033	12,408 ^d	0,020	13,291 ^e	0,018	14,793 ^f	0,023	13,467 ^e	0,007	17-17,3
18:3c	49,949 ^d	0,283	51,230 ^e	0,086	53,793 ^f	0,137	51,549 ^e	0,120	52,080 ^c	0,027	52-54
20:0	0,202 ^d	0,002	0,283 ^e	0,001	0,193 ^d	0,003	0,186 ^d	0,002	0,206 ^d	0,007	0-0,1
20:1	0,166 ^e	0,003	0,245 ^f	0,004	0,124 ^b	0,001	0,132 ^b	0,009	0,145 ^b	0,006	-
22:0	0,188 ^a	0,006	0,240 ^a	0,002	0,168 ^a	0,006	0,186 ^a	0,004	0,185 ^a	0,002	-
24:0	0,244 ^{a,b}	0,008	0,167 ^a	0,008	0,121 ^a	0,006	0,118 ^a	0,007	0,132 ^a	0,005	-
24:1	<0,100	-	<0,100	-	<0,100	-	0,106 ^c	0,006	0,101 ^c	0,015	-
Outros	<0,100	-	0,264	-	0,200	-	0,219	-	0,465	-	-
<i>Trans</i>	0,187	-	0,160	-	0,182	-	0,170	-	0,182	-	-
Saturados	11,364	-	11,646	-	11,187	-	11,248	-	11,544	-	-
Monoinsaturados	24,053	-	24,292	-	21,346	-	22,021	-	22,263	-	-
Poli-insaturados	64,377	-	63,639	-	67,085	-	66,342	-	65,546	-	-

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; *Trans*: 18:2t + 18:3t; Valores sublinhados: fora da faixa comumente encontrada (FIRESTONE, 2005); Médias seguidas da mesma letra, na linha, não possuem diferença significativa (Teste de *Tukey*, 5%)

Figura 12 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de coco (CO1)

Figura 13 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de cártamo (CA5)

Figura 14 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de cártamo (CA6), considerada possivelmente adulterada pelo ensaio de AG

Figura 15 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de prímula (PR10)

Figura 16 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de prímula (PR1), considerada possivelmente adulterada pelo ensaio de AG

Figura 17 - Cromatograma obtido pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de linhaça (LI6)

Figura 18 - Sobreposição de cromatogramas obtidos pela análise em CG/DIC de EMAG da amostra de óleo de cártamo autêntica (CA5) e do padrão do ácido linoleico conjugado (CLA)

O óleo de coco pode ser submetido a adulteração com outros óleos mais baratos, como de palma ou banha de porco (ROHMAN e CHE MAN, 2012). No óleo de linhaça, os adulterantes mais utilizados são os óleos de soja e de girassol refinado (SOUZA et al., 2015). E para azeites de oliva, a adulteração mais comum é a adição de outros óleos vegetais de menor valor comercial, principalmente quando o azeite é enlatado no Brasil (AUED-PIMENTEL et al., 2002). O Brasil produz óleos de coco e linhaça, e foram estes produtos que apresentaram uma menor variação dos perfis de AG em relação à legislação ou literatura. Mas os óleos de cártamo e primula são importados e os rótulos dos produtos indicam que são encapsulados no país, o que pode aumentar a chance de fraudes. Todos os produtos adquiridos eram de origem nacional, e não indicavam nos seus rótulos informações sobre a origem dos óleos. Além disso, alguns dos óleos encapsulados apresentavam o local de fabricação como o de envase e/ou encapsulamento (Quadro 3).

Em óleos vegetais poli-insaturados refinados, os AGT predominantes são os 18:2 e 18:3. Durante o processo de refino dos óleos vegetais, na etapa de desodorização, óleos com duas ou três insaturações são menos resistentes às condições de temperatura, tempo e pressão empregados, sendo as duplas ligações podendo se isomerizar da forma *cis* para *trans* (AUED-PIMENTEL et al., 2009; HOU et al., 2012). Além disso, os AGT podem ser formados durante a etapa de secagem das sementes (BRUHL, 1996). Assim, elevadas proporções em óleo extraído a frio pode estar relacionada às diferenças de técnicas de processamento dos óleos, ou pode ser um indicativo da existência de adulteração com óleo refinado (BRUHL, 1996; HOU et al., 2012).

O único óleo que apresenta limites estabelecidos pela legislação para AGT é o azeite de oliva. Para os extra virgens, que não passaram pelo processo de refino, o limite para a soma de isômeros *trans* 18:2 e 18:3 não deve exceder 0,05%, enquanto que para azeite de oliva, composto de azeite de oliva virgem e refinado, não deve exceder 0,30% (CODEX 1981a, revisada em 2015).

Os valores de AGT individuais constam nas Tabelas de 7 a 10 e a Tabela 11 apresenta a ocorrência de AGT nos óleos estudados. Todas as amostras de coco e uma de prímula (PR10) apresentaram *trans* abaixo de 0,05%. Fundamentando-se nos valores citados para azeite de oliva, estes óleos poderiam ser considerados extra virgens.

Os teores para linhaça variaram de 0,125 a 0,281%. Para os óleos de cártamo, os valores para as amostras consideradas possivelmente autênticas pelo ensaio de AG (0,280 a 1,147%) foram mais altos do que as possivelmente adulteradas (0,082 a 1,067%). Já as amostras de prímula possivelmente adulteradas apresentaram proporções ainda mais altas (0,414 a 3,051%). Em estudo realizado por AUED-PIMENTEL et al. (2009), foram encontrados valores para AGT em óleos refinados (soja, girassol, canola e milho) de 0,20 a 5,10%, muito próximos aos encontrados por HOU et al. (2012), cujos resultados para os óleos (soja, girassol, canola e milho) variaram de 0,14 a 4,76 g/100g. Desta forma, sugere-se que boa parte das possíveis fraudes tenham ocorrido pela adição ou substituição com óleos refinados. Além disso, para os óleos classificados como possivelmente autênticos (linhaça e cártamo), os valores de AGT encontrados foram considerados elevados. Segundo BRUHL (1996), uma detecção de *trans* em concentrações superiores a 0,1% é uma prova segura de que o óleo passou por tratamento inadequado durante o processamento, seja o aquecimento das sementes, o refino ou uma mistura com óleos refinados. A Figura 19 apresenta uma sobreposição de cromatogramas da amostra PR6 e dos padrões de isômeros do ácido linoleico e linolênico, indicando os AGT quantificados.

Cabe ressaltar que os AGT estão incluídos entre os fatores dietéticos de risco para doenças cardiovasculares, sendo seu principal efeito metabólico aumentar o colesterol total e a LDL, além de diminuir a lipoproteína de alta densidade (HDL), e como resultado há um aumento significativo da relação da LDL/HDL (FREIRE et al., 2013).

Tabela 11 - Ocorrência de ácidos graxos *trans* nos óleos vegetais estudados

		$x \leq 0,05\%$	$0,05 < x \leq 0,3\%$	$0,3 < x \leq 1,0\%$	$1,0 < x \leq 2,0\%$	$2,0 < x \leq 3,0\%$
Coco	Possivelmente autênticas* (n=9)	9 (100%)	-	-	-	-
	Possivelmente Adulterada* (n=1)	1 (100%)	-	-	-	-
	Geral (n=10)	10 (100%)	-	-	-	-
Cártamo	Possivelmente autênticas* (n=6)	-	1 (17%)	3 (50%)	2 (33%)	-
	Possivelmente adulteradas* (n=4)	-	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)	-
	Geral (n=10)	-	2 (20%)	5 (50%)	3 (30%)	-
Prímula	Possivelmente autêntica* (n=1)	1 (100%)	-	-	-	-
	Possivelmente adulteradas* (n=9)	-	-	4 (45%)	2 (22%)	3 (33%)
	Geral (n=10)	1 (10%)	-	4 (40%)	2 (20%)	3 (30%)
Linhaça (n=10)		-	10 (100%)	-	-	-
GERAL (n=40)		11 (27,5%)	12 (30%)	9 (22,5%)	5 (12,5%)	3 (7,5%)

* Pelo ensaio de ácidos graxos

Figura 19 - Sobreposição de cromatogramas obtidos pela análise em CG/DIC para uma amostra de óleo de primula (PR6) e padrões de isômeros do ácido linoleico (18:2) e linolênico (18:3)

4.2 PARÂMETROS DE QUALIDADE DE ÓLEOS VEGETAIS

4.2.1 Índice de acidez

4.2.1.1 Otimização das condições analíticas

A metodologia da AOAC (1940, revisada em 2012), que indica a diluição da amostra em álcool e titulação com NaOH, foi testada, no entanto a solução ficou turva, o que dificultou a visualização do ponto de viragem. Optou-se por não testar a metodologia da AOCS (2009a), considerando a toxicidade do solvente empregado (tolueno). Assim, a metodologia escolhida foi a descrita pelo IAL (2005), que recomenda a diluição da amostra em mistura éter-álcool e titulação com hidróxido de sódio.

Também foram testadas diferentes massas de óleo a serem utilizadas no ensaio. Embora a metodologia do IAL indique uma tomada de 2,0 g, foram testadas: um, dois e três gramas. Cada teste foi realizado com uma amostra de óleo de soja comercial, em triplicata. A Tabela 12 apresenta os valores de IA obtidos nestes testes. O CV para 3,0 g foi menor, sugerindo que esta deveria ser a massa a ser pesada.

Tabela 12 - Índices de acidez obtidos para diferentes massas de óleo vegetal

Massa de óleo (g)	IA (mg KOH/g)		
	Média	DP	CV (%)
1,0	0,132 ^a	0,017	12,6
2,0	0,124 ^a	0,014	11,1
3,0	0,125 ^a	0,007	5,3

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; CV: coeficiente de variação; Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não possuem diferença significativa ($p > 0,05$, teste t *Student*)

4.2.1.2 Validação do método

A avaliação da linearidade de um método pode ser verificada pela preparação da curva padrão, adicionando padrões do analito ao branco do ensaio. Assim, foram adicionados diferentes volumes de solução de ácido oleico ($C = 0,2 \text{ g/mL}$) no branco do ensaio (solução de éter-álcool). O gráfico dos resultados dos ensaios (volume de NaOH adicionado em função da concentração do analito) está apresentado na Figura 20, o de variância dos resíduos ao longo da

curva de calibração na Figura 21, e a estatística da curva de calibração está apresentada na Tabela 13.

Foi verificada a ausência de valores discrepantes pelo teste de *Grubbs*, com 99% de confiança. Para avaliar a variância dos resíduos ao longo da curva de calibração, foi aplicado o teste de *Cochran*. A curva de calibração apresentou comportamento homocedástico ($C_{cal}=0,75$ foi menor que $C_{tab}=0,79$), ou seja, ao longo da faixa de trabalho apresentou variâncias semelhantes. Os valores dos resíduos foram lançados em gráfico e verificou-se que a distribuição dos mesmos foi aleatória, livre de tendências (Figura 21). Foi calculado o modelo matemático através da regressão linear, e a linearidade entre os volumes de titulante e concentração de ácido oleico foi demonstrada pelo r^2 obtido, superior a 0,995 (Tabela 13).

Figura 20 - Linearidade - Curvas de calibração para a determinação do índice de acidez, resposta em volume de NaOH, em mL, e concentração em g oleico por 100 g

Figura 21 - Gráfico de resíduos da curva de calibração para a determinação do índice de acidez, concentração em g oleico por 100 g

A fim de avaliar a interferência da matriz (óleo) na análise, foi realizado o ensaio de seletividade. A estatística das curvas de calibração no branco do ensaio e em óleo vegetal podem ser verificadas na Tabela 13. Foi verificada a ausência de valores discrepantes pelo teste de *Grubbs*, com 99% de confiança, para os dados da seletividade. Foi realizado teste t pareado, com 95% de confiança, e as inclinações foram homogêneas entre o branco do ensaio e amostra, sendo o $t_{cal}=0,45$ menor que o $t_{tab}=2,14$. Assim, não foi detectada a interferência de matriz.

Tabela 13 - Resultados do estudo de validação do método para a determinação do índice de acidez em óleos vegetais, quanto aos critérios de linearidade e seletividade, em diferentes níveis de concentração (1 a 7 g oleico/100 g de amostra)

	Branco ensaio (éter-álcool)	Óleo de cártamo
Inclinação (a)	0,9258	0,9222
Intercepto (b)	0,0541	0,0833
r	0,9997	0,9984
r ²	0,9994	0,9968
n	15	15

Para estimar o limite de quantificação do método, considerou-se a resolução de 0,05 mL para a bureta de 10,0 mL. Desta forma, este foi o volume mínimo avaliado, medido com precisão, que poderia ser adicionado para ocasionar uma mudança de coloração no meio, além do volume adicionado ao branco. Convertendo a diferença de volume, equivale a 0,01 mg KOH/g de óleo ou 0,005 g oleico/100 g (usando fator de conversão de 1,99).

A exatidão do procedimento analítico foi determinada através de experimentos de recuperação pela fortificação da amostra de óleo de cártamo com solução de ácido oleico em diferentes níveis de concentração, no mesmo dia (Dia 1 - Tabela 14). Os valores encontrados variaram de 102,91 a 105,29%, estando adequados ao longo da faixa estudada. A mesma tabela também apresenta os resultados para avaliar a precisão do método (repetibilidade e precisão intermediária), na amostra fortificada em dois níveis de concentração (1 e 3 g de ácido oleico/100 g). O CV foi avaliado no mesmo dia e em dois dias diferentes, sendo os valores inferiores a 10,0%. Foi realizado um teste t de *Student* entre os dois dias, e não houve diferença significativa entre os resultados.

Tabela 14 - Resultados do estudo de validação do método para a determinação do índice de acidez em óleos vegetais, quanto critérios de exatidão e precisão

Nível de fortificação (g oleico/100 g)	Dia 1		Dia 2		Entre dias	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
1	102,91 ^a	3,19	111,65 ^a	7,66	107,28 ^a	7,00
3	105,29 ^a	1,16	105,94 ^a	0,80	105,61 ^a	0,81
5	105,06	4,88	-	-	-	-
7	104,54	0,73	-	-	-	-

Valores expressos como média de três replicatas; CV: coeficiente de variação; Médias seguidas da mesma letra, na linha, não possuem diferença significativa ($p > 0,05$, teste t *Student*)

4.2.1.3 Análise do índice de acidez em amostras comerciais

A Tabela 15 apresenta os valores para os IA dos diferentes óleos vegetais analisados. A acidez é um dos índices que sugere a qualidade dos óleos vegetais, pois está associada à caracterização do estado de conservação dos grãos, durante a colheita e armazenamento, e de qualidade de matéria-prima, indicando a deterioração de óleos e gorduras (REGITANO-D'ARCE, 2010).

Tabela 15 - Índices de acidez (mg KOH/g de óleo) para os diferentes óleos vegetais analisados

Óleos de Coco			Óleos de Cártamo			Óleos de Prímula			Óleos de Linhaça		
	Média	DP		Média	DP		Média	DP		Média	DP
CO1	0,382 ^a	0,024	CA1	0,448 ^a	0,028	PR1	0,308 ^a	0,031	LI1	2,084 ^a	0,120
CO2	0,146 ^b	0,014	CA2	2,811 ^b	0,191	PR2	0,163 ^b	0,005	LI2	1,425 ^b	0,058
CO3	0,385 ^a	0,004	CA3	0,134 ^c	0,005	PR3	0,209 ^b	0,002	LI3	5,246 ^c	0,162
CO4	0,272 ^c	0,006	CA4	1,273 ^d	0,018	PR4	0,363 ^a	0,014	LI4	3,175 ^{d,g}	0,088
CO5	0,590 ^d	0,006	CA5	0,387 ^a	0,009	PR5	0,445 ^c	0,005	LI5	10,625 ^e	0,122
CO6	1,203 ^e	0,024	CA6	1,142 ^d	0,023	PR6	0,112 ^b	0,008	LI6	12,778 ^f	0,251
CO7	1,616 ^f	0,019	CA7	0,114 ^c	0,008	PR7	1,293 ^d	0,021	LI7	3,409 ^d	0,070
CO8	1,087 ^g	0,041	CA8	0,097 ^c	0,001	PR8	0,462 ^c	0,006	LI8	2,617 ^g	0,087
CO9	0,104 ^b	0,001	CA9	0,182 ^c	0,001	PR9	0,357 ^a	0,013	LI9	2,465 ^g	0,042
CO10	1,062 ^g	0,036	CA10	1,733 ^e	0,024	PR10	0,687 ^e	0,037	LI10	2,760 ^g	0,159
Média	0,685	0,018	Média	0,832	0,031	Média	0,440	0,014	Média	4,658	0,116
Mediana	0,488	-	Mediana	0,418	-	Mediana	0,360	-	Mediana	2,968	-
Mínimo	0,104	0,001	Mínimo	0,097	0,001	Mínimo	0,112	0,008	Mínimo	1,425	0,058
Máximo	1,616	0,019	Máximo	2,811	0,191	Máximo	1,293	0,021	Máximo	12,778	0,251

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; Amostras em negrito: consideradas possivelmente adulteradas, de acordo com o ensaio de ácidos graxos; Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não possuem diferença significativa (Teste de *Tukey*, 5%)

A presença de AG livres é resultante da hidrólise de alguns TAG e esta ocorrência indica a perda de integridade da molécula, antes neutra e apolar (REGITANO-D'ARCE, 2010). Além disso, estes AG podem ser pró-oxidantes, devido ao efeito catalítico relacionado ao grupo carboxílico, formando radicais livres (FREGA et al., 1999).

Os valores variaram de 0,097 a 12,778 mg KOH/g, sendo o menor valor encontrado no óleo de cártamo (CA8) e o maior no de linhaça (LI6). As amostras de prímula apresentaram a menor média geral (0,440 mg KOH/g), com valores variando de 0,112 a 1,293 mg KOH/g, enquanto que as de linhaça a maior média geral (4,658 mg KOH/g), e resultados variando de 1,425 a 12,778 mg KOH/g. Os IA apresentaram valores médios e medianos próximos dentro do mesmo grupo, com exceção das amostras de linhaça, pois três óleos apresentaram valores mais elevados que os demais (LI3, LI5, LI6). A média das amostras de cártamo foi superior às médias encontradas para óleo de coco e prímula.

No Brasil, a Resolução RDC nº 270, de 22/09/2005, da ANVISA, estabelece os requisitos para óleos e gorduras, fundamentados nas normas do *Codex Alimentarius* (BRASIL, 2005; CODEX 1981b, revisada em 2015). Para óleos prensados a frio e não refinados, o índice de acidez não deve ser superior a 4 mg KOH/g de óleo, enquanto que para óleos refinados o valor máximo é de 0,6 mg KOH/g. Três óleos de linhaça (7,5%) apresentaram valores acima do limite estipulado para óleos prensados a frio (LI3, LI5 e LI6) e todos os óleos de cártamo, prímula e coco estavam satisfatórios, pois apresentaram valores inferiores. Os resultados para alguns óleos estavam inclusive inferiores ao limite estabelecido para óleos refinados: 6 amostras de óleo de cártamo, 8 de prímula e 6 de coco apresentaram valores abaixo de 0,6 mg KOH/g.

Avaliando os valores médios das amostras, considerando a categoria de cada grupo, a sequência decrescente dos índices de acidez obtidos para os óleos foi: linhaça > cártamo > coco > prímula.

4.2.2 Índice de peróxido - Resultados em amostras comerciais

A Tabela 16 apresenta os valores para os IP dos diferentes óleos vegetais analisados.

Tabela 16 - Índices de peróxidos (meq/kg de óleo) para os diferentes óleos vegetais analisados

Óleos de Coco			Óleos de Cártamo			Óleos de Prímula			Óleos de Linhaça		
	Média	DP		Média	DP		Média	DP		Média	DP
CO1	< LQ	-	CA1	4,86 ^a	0,03	PR1	2,25 ^a	0,08	LI1	1,39 ^a	0,14
CO2	< LQ	-	CA2	0,87 ^b	0,06	PR2	4,25 ^b	0,70	LI2	<u>16,67^b</u>	0,53
CO3	< LQ	-	CA3	1,72 ^c	0,25	PR3	4,13 ^b	0,12	LI3	<u>23,61^c</u>	0,60
CO4	< LQ	-	CA4	0,62 ^b	0,01	PR4	<u>27,22^c</u>	1,33	LI4	0,19 ^d	0,04
CO5	0,28 ^a	0,02	CA5	6,63 ^d	0,02	PR5	5,83 ^d	0,38	LI5	0,99 ^a	0,15
CO6	0,15 ^b	0,01	CA6	0,61 ^b	0,13	PR6	6,04 ^d	0,36	LI6	2,93 ^e	0,01
CO7	< LQ	-	CA7	13,01 ^e	0,63	PR7	3,92 ^b	0,08	LI7	0,40 ^f	0,01
CO8	< LQ	-	CA8	3,59 ^f	0,03	PR8	<u>104,81^f</u>	0,67	LI8	1,69 ^a	0,10
CO9	< LQ	-	CA9	2,70 ^g	0,23	PR9	2,03 ^a	0,09	LI9	0,55 ^f	0,03
CO10	0,61	0,01	CA10	2,57 ^g	0,08	PR10	1,95 ^a	0,07	LI10	1,92 ^a	0,13
Média	0,10	0,01	Média	3,72	0,15	Média	16,24	0,39	Média	5,03	0,17
Mediana	< LQ	-	Mediana	2,64	-	Mediana	4,19	-	Mediana	1,54	-
Mínimo	< LQ	-	Mínimo	0,61	0,13	Mínimo	1,95	0,07	Mínimo	0,19	0,04
Máximo	0,61	0,01	Máximo	13,01	0,63	Máximo	104,81	0,67	Máximo	23,61	0,60

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; LQ: limite de quantificação (0,10 meq/kg); Amostras em negrito: consideradas possivelmente adulteradas, de acordo com o ensaio de ácidos graxos; Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não possuem diferença significativa (Teste de Tukey, 5%)

O IP é um dos métodos mais utilizados para indicar o grau de oxidação dos óleos, verificando o estágio inicial de oxidação. Mesmo sendo totalmente inodoros e sem gosto, a presença de peróxidos e hidroperóxidos é uma indicação de deterioração do sabor prestes a ocorrer, visto serem instáveis. A instabilidade da forma oxidada é grande, e pode variar segundo a exposição do óleo a temperatura e a luz (REGITANO–D’ARCE, 2010).

Os IP apresentaram uma grande variação dos valores para os óleos analisados, variando abaixo do LQ (para boa parte das amostras de óleo de coco) a 104,81 meq/kg (PR8). Os índices de peróxidos apresentaram valores médios e medianas próximos dentro do mesmo grupo, com exceção das amostras de prímula e linhaça, que apresentaram algumas amostras com valores mais elevados que a média.

Para estimar o limite de quantificação do método, considerou-se a resolução de 0,05 mL para a bureta de 10,0 mL. Desta forma, este foi o volume mínimo avaliado, medido com precisão, que poderia ser adicionado para ocasionar uma mudança de coloração no meio, além do volume adicionado ao branco. Convertendo a diferença de volume, equivale a 0,10 meq/kg de óleo.

No Brasil, a Resolução RDC nº 270, de 22/09/2005, da ANVISA, estabelece os requisitos para óleos e gorduras, fundamentados nas normas do *Codex Alimentarius* e, para óleos prensados a frio e não refinados, o índice de peróxido não deve ser superior a 15 meq/kg de óleo (BRASIL, 2005; CODEX 1981b, revisada em 2015). Quatro óleos (10%) estavam acima

do limite estabelecido, sendo dois de linhaça (LI2 e LI3) e dois de prímula (PR4 e PR8). O valor máximo estipulado para óleos refinados na mesma legislação é de 10 meq/kg: apenas a amostra CA7 apresentou um valor intermediário de 13,01 meq/kg.

Avaliando os valores médios das amostras, considerando a categoria de cada grupo, a sequência decrescente dos índices de peróxido obtidos para os óleos foi: prímula > linhaça > cártamo > coco.

Deve-se ter cautela para avaliar valores baixos para o índice de peróxido, pois podem indicar que o óleo está na fase inicial ou final de oxidação, uma vez que os teores tendem a diminuir na fase final da reação. Assim, a avaliação dos valores de p-anisidina e totox poderão indicar o estado real de oxidação dos produtos (KAMAL-ELDIN e YANISHLIEVA, 2005).

4.2.3 Valor de p-anisidina

4.2.3.1 Verificação do desempenho do espectrofotômetro

A Figura 22 apresenta, de forma gráfica, os resultados de absorbância em função das concentrações das soluções de dicromato de potássio. A absorvidade molar experimental (ϵ_{exp}) encontrada foi de 3072,4448 L/mol.cm (coeficiente angular da reta) e o valor do fator de correção foi de 1,0285, dentro do intervalo de aceitabilidade considerado apropriado ($0,95 < CF < 1,05$) (IAL, 2005). Logo, o espectrofotômetro demonstrou-se adequado para leitura a 350 nm.

Figura 22 - Curva obtida entre os resultados de absorbância e as concentrações das soluções de dicromato de potássio

4.2.3.2 Resultados de p-anisidina em amostras comerciais

Os valores de p-anisidina estão apresentados na Tabela 17. O AV é um resultado obtido de uma medida espectrofotométrica que mede produtos de oxidação secundária presentes em óleos e gorduras. Os valores variaram de <LQ a 12,98 (PR10). Os menores resultados foram das amostras de óleo de coco, variando de <LQ a 0,51. Para os óleos de linhaça, os valores encontrados também foram baixos (<0,10), em sua maioria. O maior valor encontrado foi para a amostra PR10 (12,98), que apresentava um odor alterado.

Os valores das médias e das medianas estavam próximos dentro do mesmo grupo. A média geral das amostras de prímula foi um pouco superior à mediana, pois três amostras apresentaram valores mais elevados (PR8, PR9 e PR10). Avaliando os valores médios das amostras, considerando a categoria de cada grupo, a sequência decrescente dos valores de AV obtidos para os óleos foi: prímula > cártamo > linhaça > coco.

A legislação não estabelece limite para o AV, seja na ANVISA ou no *Codex*. No entanto, em conjunto com o IP, pode ser calculado o totox, usado com frequência na indústria para controle de qualidade de óleos (REGITANO–D'ARCE, 2010).

Tabela 17 - Valores de p-anisidina para os diferentes óleos vegetais analisados

Óleos de Coco			Óleos de Cártamo			Óleos de Prímula			Óleos de Linhaça		
	Média	DP		Média	DP		Média	DP		Média	DP
CO1	< LQ	-	CA1	2,76 ^a	0,06	PR1	2,03 ^a	0,06	LI1	< LQ	-
CO2	< LQ	-	CA2	2,05 ^b	0,03	PR2	3,48 ^b	0,01	LI2	5,49 ^a	0,05
CO3	0,22 ^a	0,02	CA3	5,92 ^c	0,11	PR3	4,02 ^c	0,01	LI3	< LQ	-
CO4	0,13 ^b	0,02	CA4	2,91 ^a	0,02	PR4	3,61 ^b	0,09	LI4	0,12 ^b	0,04
CO5	0,17 ^{a,b}	0,02	CA5	2,88 ^a	0,06	PR5	2,73 ^d	0,11	LI5	< LQ	-
CO6	0,43 ^c	0,01	CA6	1,88 ^b	0,02	PR6	3,85 ^c	0,04	LI6	< LQ	-
CO7	0,21 ^a	0,01	CA7	8,21 ^d	0,11	PR7	1,90 ^a	0,07	LI7	< LQ	-
CO8	0,32 ^d	0,01	CA8	5,47 ^e	0,05	PR8	8,87 ^e	0,05	LI8	< LQ	-
CO9	< LQ	-	CA9	6,15 ^f	0,02	PR9	8,92 ^e	0,03	LI9	< LQ	-
CO10	0,51 ^e	0,04	CA10	1,38 ^g	0,04	PR10	12,98 ^f	0,07	LI10	0,10 ^b	0,04
Média	0,20	0,02	Média	3,96	0,05	Média	5,24	0,05	Média	0,57	0,04
Mediana	0,19	-	Mediana	2,90	-	Mediana	3,73	-	Mediana	< LQ	-
Mínimo	< LQ	-	Mínimo	1,38	0,04	Mínimo	1,90	0,07	Mínimo	< LQ	-
Máximo	0,51	0,04	Máximo	8,21	0,11	Máximo	12,98	0,07	Máximo	5,49	0,05

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; LQ: limite de quantificação (abaixo do branco do ensaio, 0,10); Amostras em negrito: consideradas possivelmente adulteradas, de acordo com o ensaio de ácidos graxos; Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não possuem diferença significativa (Teste de Tukey, 5%)

4.2.4 Valor de total de oxidação (Totox) - Resultados em amostras comerciais

A Tabela 18 apresenta os valores de totox para as amostras analisadas. Os valores variaram de <LQ a 218,49 (PR8).

A literatura recomenda que os óleos devem possuir valores inferiores a 10, pois resultados superiores indicam que os óleos possuem baixa estabilidade (REGITANO-D'ARCE, 2010). O único grupo que apresentou todos os valores de acordo com a recomendação foi o óleo de coco, com resultados variando de abaixo do LQ a 1,73. Quinze óleos vegetais (38%) apresentaram resultados superiores, sendo 2 de linhaça, 5 de cártamo e 8 de prímula. Avaliando os valores médios das amostras, considerando a categoria de cada grupo, a sequência decrescente do totox para os óleos foi: prímula > cártamo > linhaça > coco.

Tabela 18 - Valores de totox para os diferentes óleos vegetais analisados

Óleos de Coco		Óleos de Cártamo		Óleos de Prímula		Óleos de Linhaça	
CO1	<LQ	CA1	<u>12,48</u>	PR1	6,52	LI1	2,77
CO2	<LQ	CA2	3,78	PR2	<u>11,98</u>	LI2	<u>38,84</u>
CO3	0,22	CA3	9,36	PR3	<u>12,29</u>	LI3	<u>47,22</u>
CO4	0,13	CA4	4,15	PR4	<u>58,05</u>	LI4	0,51
CO5	0,72	CA5	<u>16,14</u>	PR5	<u>14,39</u>	LI5	1,98
CO6	0,73	CA6	3,10	PR6	<u>15,93</u>	LI6	5,85
CO7	0,21	CA7	<u>34,23</u>	PR7	9,73	LI7	0,80
CO8	0,32	CA8	<u>12,65</u>	PR8	<u>218,49</u>	LI8	3,38
CO9	<LQ	CA9	<u>11,56</u>	PR9	<u>12,99</u>	LI9	1,10
CO10	1,73	CA10	6,52	PR10	<u>16,88</u>	LI10	3,94
Média	0,41	Média	11,40	Média	37,73	Média	10,64
Mediana	0,22	Mediana	10,46	Mediana	13,69	Mediana	3,08
Mínimo	< LQ	Mínimo	3,10	Mínimo	6,52	Mínimo	0,51
Máximo	1,73	Máximo	34,23	Máximo	218,49	Máximo	47,22

Valores calculados a partir da média dos valores de índices de peróxido (IP) e p-anisidina (AV); LQ: limite de quantificação; Amostras em negrito: consideradas possivelmente adulteradas, de acordo com o ensaio de ácidos graxos

4.2.5 Discussão quanto aos índices de qualidade das amostras (acidez, peróxido, p-anisidina e totox)

A Tabela 19 apresenta os resultados gerais para os índices de qualidade, incluindo acidez, peróxido, p-anisidina e totox, para todas as amostras analisadas. O ideal é que estes parâmetros

sejam avaliados e discutidos em conjunto, pois poderão indicar a qualidade real do produto em relação à oxidação.

Quanto aos índices de acidez, os menores resultados obtidos foram para os óleos de prímula e os maiores para linhaça. Para os índices de peróxido, p-anisidina e tototox, os menores valores foram para óleo de coco, enquanto que os maiores para prímula.

Tabela 19 - Resultados gerais para índices de qualidade nos óleos vegetais analisados

		Coco (n=10)	Cártamo (n=10)	Prímula (n=10)	Linhaça (n=10)
Acidez (mg KOH/g)	Média	0,685	0,832	0,440	4,658
	Mediana	0,488	0,418	0,360	2,968
	Mínimo	0,104	0,097	0,112	1,425
	Máximo	1,616	2,811	1,293	12,778
Peróxido (meq/kg)	Média	0,10	3,72	16,24	5,03
	Mediana	< LQ	2,64	4,19	1,54
	Mínimo	< LQ	0,61	1,95	0,19
	Máximo	0,61	13,01	104,81	23,61
p-anisidina	Média	0,20	3,96	5,24	0,57
	Mediana	0,19	2,90	3,73	< LQ
	Mínimo	< LQ	1,38	1,90	< LQ
	Máximo	0,51	8,21	12,98	5,49
Tototox	Média	0,41	11,40	37,73	10,64
	Mediana	0,22	10,46	13,69	3,08
	Mínimo	< LQ	3,10	6,52	0,51
	Máximo	1,73	34,23	218,49	47,22

LQ: limite de quantificação

O único grupo de amostras que não apresentou problemas com os índices de qualidade avaliados foi o coco. Para as amostras de óleo de linhaça, duas (LI2 e LI3) apresentaram valores acima da legislação para peróxido, enquanto que comparando os resultados dentro do mesmo grupo para p-anisidina, a amostra LI2 estava mais elevada. Quanto aos índices de acidez, três amostras (LI3, LI5 e LI6) apresentaram valores superiores ao limite da legislação. A amostra LI2 já se apresentava em um estado de oxidação secundária, enquanto a LI3 em um estágio de oxidação primário. No total, quatro amostras (40%) não apresentaram resultados satisfatórios para os índices avaliados.

Para os óleos de prímula, oito amostras (80%) apresentaram valores de totox acima do recomendado. As amostras PR9 e PR10 foram em consequência do elevado teor de p-anisidina e, as demais em consequência principalmente dos valores de peróxidos mais elevados: as amostras PR4 e PR8, por exemplo, apresentaram IP acima da legislação. Mas a amostra que indicou estar em um estágio de oxidação mais avançado que as demais foi a PR10.

Para os óleos de cártamo, todos estavam de acordo com a legislação para os índices de acidez e peróxido. Cinco amostras (50%) apresentaram valores de totox acima do recomendado, e foram consideradas possivelmente autênticas pelo ensaio de AG, e os valores elevados foram em consequência ora pelos resultados de p-anisidina (CA7, CA8, CA9), ora de peróxidos (CA1, CA5), ora de ambos (CA7). Assim, estas amostras se apresentaram em estágio de oxidação tanto primário quanto secundário.

A oxidação lipídica pode causar diversas deficiências nutricionais, como a redução de AGPI, vitamina A, carotenoides, tocoferóis e vitamina C, além da interação de produtos de oxidação secundária com biomoléculas (especialmente proteínas), diminuindo a absorção das mesmas. Dentre as implicações patológicas, os hidroperóxidos e aldeídos podem causar alterações nos sistemas enzimáticos e distúrbios nos níveis séricos de diversas enzimas (FERRARI, 1998).

Os resultados deste trabalho foram comparados com estudos já publicados com óleos vegetais e o Quadro 8 apresenta um resumo dos valores da literatura para acidez, peróxido e p-anisidina. Os valores encontrados na literatura são bastante diversificados, uma vez que as amostras analisadas também são, já que foram analisados desde óleos comerciais até os extraídos das sementes. Para acidez, os valores médios encontrados no atual estudo para os óleos de coco foram compatíveis com os apresentados no Quadro 8, os de cártamo compatíveis com AYDENIZ et al. (2014), os de prímula menores que os apresentados na revisão de Christie (1999), enquanto que para linhaça a média foi elevada, comparada aos apresentados, mas a mediana bem próxima dos valores descritos por RACZYG et al. (2015) e BARROSO et al. (2014).

Nos óleos de linhaça, 3 amostras apresentaram valores elevados e acima do permitido pela legislação para índice de acidez, o que ocasionou a elevação da média em relação a mediana. Condições de alta umidade durante a armazenagem podem desencadear oxidação enzimática na linhaça: enzimas, como lipoxigenase, podem promover oxidação suficiente para afetar a qualidade da semente. Além disso, o teor de umidade das oleaginosas pode influenciar o desempenho do processamento na prensagem a frio: baixos teores de umidade resultam em um melhor rendimento do processo, no entanto gera uma maior fricção das sementes dentro da

prensa, ocasionando geração de calor e, portanto, aumento a temperatura do óleo, o que pode alterar a qualidade pois a oxidação pode ser desencadeada (NOVELLO e POLLONIO, 2011).

Quanto ao peróxido, os valores para óleos de coco e primula foram menores que os apresentados (Quadro 8), e para cártamo compatíveis com PRESCHA et al. (2014) e AYDENIZ et al. (2014). Já para p-anisidina, os valores para os óleos de cártamo foram próximos aos encontrados da literatura, enquanto que para coco e linhaça inferiores.

Quadro 8 - Valores para índices de acidez, peróxido e p-anisidina em óleos vegetais citados na literatura

Referência	Local	Óleos analisados	Acidez (mg KOH/g)	Peróxido (meq/kg)	p-anisidina
CHRISTIE et al. (1999)	-	Primula (revisão)	2-6	<1-12	4-8
CHOO et al. (2007)	Nova Zelândia	Linhaça	0,50-1,96	0,5-3,0	0,36-0,74
MARINA et al. (2009)	Malásia	Coco	0,26-0,50	0,21-0,63	0,16-0,49
DAYRIT et al. (2011)	Filipinas	Coco	0,047-0,337	0,27-3,39	-
POPA et al. (2012)	Romênia	Linhaça	0,80	0,95	-
BARROSO et al. (2014)	Brasil	Linhaça	2,82-3,02	0,50-1,22	-
AYDENIZ et al. (2014)	Turquia	Cártamo	0,94	3,81	-
PRESCHA et al. (2014)	Polônia	Vários óleos, incluindo cártamo e linhaça Cártamo Linhaça	0,14-0,23 0,08-0,26	2,26-6,27 0,50-0,69	0,53-5,80 0,53-1,72
KUMAR e KRISHNA (2015)	Índia	Coco	0,01-2,02	0-2,70	-
RACZYK et al. (2015)	Polônia	Linhaça	0,51-3,20	0,48-1,63	0,28-1,50

Os baixos valores encontrados para os índices de peróxido, p-anisidina e tototox nos óleos de coco já eram esperados, uma vez que estes óleos possuem alto teor de ácidos graxos saturados, especialmente de ácido láurico e, desta forma, são mais resistentes à oxidação. No entanto, o óleo de coco é mais susceptível a um tipo de rancidez conhecida como hidrolítica, causada pela combinação de umidade e presença de micro-organismos. Ácidos graxos de cadeia curta, como láuricos, são atacados pelos fungos produzindo inicialmente ácidos graxos de cadeia curta, que podem elevar os índices de acidez e então formar cetonas e álcoois alifáticos

(KUMAR e KRISHNA, 2015). Os resultados encontrados foram considerados satisfatórios pela legislação.

Os resultados encontrados para p-anisidina e totox indicaram que estes ensaios devem ser utilizados como parâmetros para avaliação da oxidação dos óleos. Alguns óleos foram considerados adequados para os índices de acidez e peróxido, de acordo com a legislação, no entanto tiveram valores de totox superiores ao recomendado pela literatura devido aos respectivos resultados de p-anisidina. O AV mede o estágio de oxidação secundária dos óleos, e esta metodologia mostrou-se adequada para estimar a conservação destes produtos.

Os maiores problemas de oxidação foram encontrados em óleos poli-insaturados. Devido ao elevado grau de insaturação dos óleos de linhaça (cerca de 50% de ácido α -linolênico), cártamo (cerca de 75% de ácido linoleico) e prímula (aproximadamente 72% de ácido linoleico e 11% de ácido γ -linolênico), eles são mais suscetíveis à oxidação uma vez que a insaturação dos ácidos graxos é um dos fatores que mais contribuem para a oxidação dos óleos (REGITANO-D'ARCE, 2010). Para óleos de cártamo, os maiores valores para peróxido e p-anisidina foram nos óleos que apresentaram elevados teores de poli-insaturados. Para a amostra de prímula PR10, que apresentou um teor de poli-insaturados superior que as demais, o maior problema foi a oxidação secundária.

Foi realizado um estudo estatístico com os dados obtidos para verificar se existia correlação entre os índices qualidade analisados e teor de poli-insaturados nas amostras, utilizando o teste de correlação de *Pearson*. A correlação foi considerada moderada com valores entre 0,50 e 0,80, e forte acima de 0,80. Foi possível verificar, com os óleos poli-insaturados (cártamo, prímula e linhaça) uma correlação positiva entre AGPI e p-anisidina: considerando cada grupo de óleo, as correlações foram moderadas para prímula ($r=0,778$, $p<0,05$) e cártamo ($r=0,681$, $p<0,05$) e forte para linhaça ($r=0,999$, $p<0,05$). Assim, verifica-se que quanto maiores os teores de AGPI, maiores os teores de AV, e maior é a tendência de oxidação dos óleos, especialmente a oxidação secundária.

Uma maneira de prevenir a oxidação dos óleos é o uso de antioxidantes, que devem ser adicionados logo no início do processo ao óleo. O tipo de antioxidante a ser utilizado e suas concentrações máximas são regulamentados pela ANVISA. Nos óleos, são permitidos antioxidantes sintéticos (como BHA, BHT e TBHQ) ou naturais (como os tocoferóis) (REGITANO-D'ARCE, 2010). Dentre os produtos analisados, apenas 6 óleos de cártamo (CA1, CA4, CA5, CA6, CA7, CA10) declaravam em seus rótulos a adição de tocoferóis. No entanto, 50% destes apresentaram totox acima do recomendado para a literatura (CA1, CA5 e CA7). Uma sugestão é de que a quantidade de tocoferol adicionada não foi suficiente para suprir

o efeito da oxidação. Mas a adição destes aditivos é uma maneira de melhorar a estabilidade dos óleos, especialmente os poli-insaturados, frente a processos oxidativos.

Com o objetivo de verificar se poderia haver relação entre os índices de qualidade e as datas de fabricação dos produtos, foi realizado um teste de correlação de *Pearson* entre estes parâmetros. A ideia seria que amostras mais antigas poderiam ter índices mais elevados para os parâmetros avaliados. Não foi observada correlação entre os índices de qualidade e data de fabricação. A Figura 23 apresenta os dados em um diagrama de dispersão e, visualmente, não foram verificadas tendências. Constata-se, inclusive, que mesmo amostras mais recentes apresentaram índices mais elevados. Uma razão destes valores estarem dispersos seria de que as datas de fabricação dos produtos são as de envase dos mesmos, e não de extração do óleo, e não é possível saber as condições as quais os óleos foram submetidos antes do envase, nem mesmo suas origens, uma vez que o local de fabricação declarado é o de envase.

Figura 23 - Diagrama de dispersão entre índices de qualidade e data de fabricação dos óleos

Também pode ser observado, durante a aquisição das amostras, que os óleos comercializados estavam sendo armazenados em exposição à luz, e até mesmo ao sol, dependendo da hora do dia e da localização de venda. Em estudo realizado sobre a deterioração

de óleos vegetais expostos a diferentes condições de armazenamento, foi verificado que os óleos que ficaram expostos à luz sofreram maior alteração em relação à acidez e peróxido, enquanto que os que ficaram ao abrigo de luz tiveram um menor aumento quanto a esses parâmetros, concluindo assim que não é aconselhável armazenar o óleo exposto à luz, pois com o passar do tempo, alguns índices de qualidade podem ser alterados, gerando produto de qualidade inferior à desejada (THODE FILHO et al., 2014).

Considerando o tipo de apresentação dos óleos insaturados, não foi verificada uma tendência de aumento dos índices em determinadas embalagens. Uma suposição seria que embalagens transparentes poderiam expor mais os óleos à luz, tendo como consequência um aumento dos índices. A análise estatística (Teste de *Tukey*, 5%) entre as embalagens com maior frequência de apresentação, plástico opaco (Forma 1) e transparente (Forma 2), indicou que não houve diferença entre os índices de qualidade avaliados. As inconformidades foram verificadas em diferentes tipos de embalagens: frasco de plástico opaco, transparente ou mesmo blisters em caixa de papelão. A única embalagem que não apresentou problemas foi o frasco de vidro âmbar (amostras LI4 e LI7). A literatura indica que as mudanças no índice de peróxido são significativamente maiores em embalagens plásticas às de vidro (TAWFIK e HUYGHEBAERT, 1999); no entanto, a amostragem de embalagens de vidro neste trabalho foi pequena frente às demais e, além disso, as amostras eram de mesma marca, com fabricações em períodos diferentes, assim os valores inferiores podem estar relacionados também ao controle de qualidade da empresa.

4.3 HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

4.3.1 Otimização das condições analíticas

Considerando as diversas condições testadas por diferentes autores para análise de HPAs em óleos vegetais (BARRANCO et al., 2003; CAMARGO et al., 2011; PURCARO et al., 2012), alguns testes foram realizados com o objetivo de escolher a condição mais adequada para ser aplicada neste trabalho.

4.3.1.1 Espectros UV dos HPA

As identidades dos padrões dos HPAs foram confirmadas através da comparação dos espectros UV com os apresentados na literatura para cada hidrocarboneto (GONZALEZ et al., 2007). A aquisição dos espectros foi realizada em um detector DAD acoplado em série aos módulos do UFLC e foram usados padrões preparados em acetonitrila nas concentrações de 3, 4 e 6 ppm, sendo os sinais monitorados de 190 a 400 nm. Os espectros UV dos HPAs estão apresentados na Figura 24 e foram compatíveis com os encontrados no citado trabalho.

Figura 24 - Curvas espectrais dos HPAs, obtidas no detector de arranjo de diodos, para os padrões de benzo(a)antraceno (BaA), criseno (Cri), benzo(b)fluoranteno (BbF), benzo(a)pireno (BaP), em concentrações variadas

4.3.1.2 Otimização cromatográfica

As condições cromatográficas foram otimizadas usando padrões de HPAs disponíveis comercialmente e amostra comercial de óleo de cártamo (CA1), em cromatógrafo a líquido de ultra eficiência com detecção por fluorescência.

Primeiramente foi estudada a possibilidade de separação dos HPAs com a coluna XR-ODSIII (75 mm x 2,0 mm x 1,6 μ m, Shim-pack, Shimadzu). No entanto, esta coluna não apresentou desempenho satisfatório, devido à coeluição dos compostos BaA e Cri, ainda que diversas tentativas de mudanças de fluxo e composição de fase móvel fossem realizadas.

Então, procedeu-se à análise na coluna Zorbax Eclipse PAH (100 mm x 2,1 mm x 1,8 μ m), precedida de pré-coluna (Eclipse Plus, 5 mm x 2,1 mm x 1,8 μ m, Agilent), utilizada por PURCARO et al. (2012). Esta coluna apresentou uma melhor separação para os 4 HPAs em relação à coluna anterior. Foram avaliados diferentes fluxos e variações de composição de fase móvel, incluindo gradientes, e o Quadro 9 apresenta as condições de trabalho inicial (Método 1, do trabalho de PURCARO et al., 2012) e final (Método 2). A condição escolhida (Método 2) permitiu a separação dos compostos, com resultados satisfatórios para resolução e tempos de retenção.

Quadro 9 - Condições cromatográficas testadas, quanto à composição da fase móvel, para análise de HPAs por UFLC/FL

Método	Composição da fase móvel, Acetonitrila (A) e Água
1	0,9 min: isocrático 50% A; 0,9-2,4 min: gradiente linear até 60% A; 2,4-5,4 min: gradiente linear até 75% A; 5,4-7,4 min: isocrático 75% A; 7,4-15,4 min: gradiente linear até 100% A; 15,4-18,9 min: isocrático 100% A; retomando as condições iniciais
2	0,9 min: isocrático 65% A; 0,9-7,0 min: gradiente linear até 75% A; 7,0-17,0 min: isocrático 75% A; 17,0-20,0 min: gradiente linear até 100% A; 20,0-24,0 min: isocrático 100% A; retomando as condições iniciais

Também foram estudados diferentes comprimentos de onda (λ) de excitação e emissão para os HPAs conforme descrito no Quadro 10. Propondo usar um mesmo comprimento de onda para análise de BaA e Cri, e de BbF e BaP, conforme normalmente utilizado na literatura, foi escolhido um conjunto de λ que apresentassem os maiores valores de áreas para cada par de HPAs. Assim, os λ escolhidos foram da condição A (Quadro 10) e, na análise dos óleos, não

foi verificada a presença de interferentes nos tempos de retenção de eluição dos padrões. A Figura 25 apresenta o cromatograma obtido com as condições padronizadas para uma mistura de padrões de HPAs e para uma amostra contaminada com os 4 HPAs, com variadas concentrações, e a Tabela 20 apresenta informações sobre os parâmetros obtidos na análise cromatográfica da mistura de padrões.

Quadro 10 - Condições cromatográficas testadas, quanto aos comprimentos de onda, para análise de HPAs por UFLC/FL

Método	Comprimentos de onda (excitação-emissão)	
	BaA e Cri	BbF e BaP
A	270-390	290-430
B	270-385	256-446
C	260-390	260-460
D	290-404	290-410

BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno

Além disso, foi verificado o volume mais adequado para injeção. Por sugestão da literatura, para evitar saturação dos sítios de interação da coluna, sugere-se não injetar um volume superior a 1% do volume da coluna vazia. O volume máximo para injeção calculado para a coluna Zorbax Eclipse PAH foi de 3 μ L, e o volume usado para injeção de 2 μ L.

Figura 25 - Cromatograma obtido pela análise em UFLC/FL para mistura de padrões de HPAs e amostra contaminada, com concentrações variadas: 1 – Benzo(a)antraceno (C=10,0 μ g/kg), 2 – Criseno (C=15,0 μ g/kg), 3 – Benzo(b)fluoranteno (C=40,0 μ g/kg) e 4 – Benzo(a)pireno (C=10,0 μ g/kg)

Tabela 20 - Resultados do desempenho da coluna Zorbax Eclipse PAH (100 mm x 2,1 mm x 1,8 μ m), para separação da mistura de 4 padrões de HPAs

Nº do pico	HPA	Tempo de retenção (min)	Número de pratos teóricos	Resolução
1	Benzo(a)antraceno	8,092	16864	-
2	Criseno	8,816	19901	2,90
3	Benzo(b)fluoranteno	11,724	29275	12,00
4	Benzo(a)pireno	14,185	39597	8,80

A coluna Zorbax Eclipse PAH (100 mm x 2,1 mm x 1,8 μ m) apresentou desempenho satisfatório, com um tempo total de análise de 27,0 min. O uso de UFLC em comparação com o CLAE traz inúmeros benefícios, permitindo melhorar a resolução, aumentar a produtividade do laboratório devido aos menores tempos de análises e reduzir drasticamente o consumo de solventes e os custos (PURCARO et al., 2013).

4.3.1.3 Otimização do procedimento de extração

Foram testadas as metodologias de CAMARGO et al. (2011) e BARRANCO et al. (2003), com análises de brancos, amostras de óleo de cártamo (CA1), brancos fortificados e amostras de óleo de cártamo (CA1) fortificadas.

Foram realizados ensaios para diluição dos extratos combinados da extração líquido-líquido para a proporção de 1:1 (v/v) de DMF-água e para 1:2 (v/v). Foram avaliados os valores de recuperação obtidos das análises de brancos e de amostras fortificadas (com 4 μ g/kg de cada analito). Para o branco, os resultados foram adequados usando as duas soluções, variando de 74,5 a 92,9% e 85,2 a 97,0%, respectivamente para as soluções com proporção 1:1 (v/v) e 1:2 (v/v). No entanto, usando a proporção de 1:1 (v/v) na amostra, os valores obtidos apresentaram coeficientes de variação elevados, o que não ocorreu para a proporção 1:2 (v/v). Desta forma, optou-se por utilizar a proporção de 1:2 (v/v) de DMF-água nas extrações das amostras.

Uma etapa importante do procedimento foi a secagem adequada dos cartuchos de SPE. Quando ainda existia a presença de água nos cartuchos, a etapa de evaporação do n-hexano era prejudicada, e os valores de recuperação menores. Este fato também foi detectado por BARRANCO et al. (2003). Retirando o máximo de água usando o bloco de extração em fase

sólida (Waters), com vácuo, seguido por centrifugação a vácuo por 25 min, foram obtidos valores de recuperação superiores a 70%.

Também foi testado o volume mais adequado de n-hexano para eluir os componentes do cartucho de SPE. Foi avaliada uma amostra contaminada com os 4 HPAs (4 µg/kg), e o volume de n-hexano utilizado foi de 12,0 mL, separado em 4 frações de 3,0 mL. Foi verificado que 96,1% dos HPAs eluíram na 1ª fração, enquanto 2,6% foram eluídos na 2ª fração, 0,9% na terceira e menos que 0,4% na 4ª fração. Assim, 99,6% dos HPAs foram eluídos com 9,0 mL, um valor de recuperação aceitável para esta faixa de concentração. Adotou-se utilizar este volume de n-hexano para eluição dos HPAs do SPE.

4.3.2 Validação

A linearidade foi avaliada em seis diferentes níveis, em triplicata, e a Tabela 21 apresenta dados das curvas de calibração. As equações foram obtidas através da regressão linear pelos métodos dos mínimos quadrados, do tipo $y = ax + b$. Os gráficos das áreas obtidas nos ensaios em função das concentrações dos analitos estão apresentados na Figura 26. A linearidade entre as áreas e as concentrações de cada HPA foi demonstrada pelos valores dos r^2 superiores a 0,995 (GUIMARÃES et al., 2010).

Foi verificada a ausência de valores discrepantes pelo teste de *Grubbs*, com 99% de confiança. Para avaliar as variâncias dos resíduos ao longo das curvas de calibração, foi aplicado o teste de Cochran. As curvas de calibração apresentaram comportamento homocedástico (C_{cal} foi menor que C_{tab}), ou seja, ao longo da faixa de trabalho apresentaram variâncias semelhantes. Os valores dos resíduos foram lançados em gráfico e verificou-se que a distribuição dos mesmos foi aleatória, livre de tendências (Figura 27).

Tabela 21 - Resultados do estudo de validação do método para a determinação dos HPAs, quanto aos critérios de linearidade, usando padrões preparados em acetonitrila, em diferentes níveis de concentração

	BaA	Cri	BbF	BaP
Inclinação (a)	25290,4190	14264,0301	5876,4718	24044,1496
Intercepto (b)	-1038,7721	-1057,9584	-196,3531	-1690,4720
R	0,9996	0,9993	1,0000	0,9997
r ²	0,9992	0,9987	0,9999	0,9995
C calculado	0,7111	0,6627	0,5485	0,6399
C tabelado	0,7218	0,7218	0,7218	0,7218
Faixa de concentração (ng/mL)	0,25-5,00	0,30-7,50	1,00-20,00	0,25-5,00
N	18	18	18	18

BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno

Figura 26 - Linearidade - Curvas de calibração para a determinação dos HPAs usando padrões preparados em acetonitrila, resposta em área, concentração em ng/mL

Figura 27 - Gráfico de resíduos das curvas de calibração para a determinação dos HPAs usando padrões preparados em acetonitrila, concentração em ng/mL

A fim de avaliar a interferência da matriz (óleo) na análise, foi realizado o ensaio de seletividade. Foram medidas as áreas de 5 níveis de concentração de padrão, na presença e na ausência de matriz. Para os dados na ausência de matriz, foram considerados os resultados de linearidade. As estatísticas das curvas de calibração em óleo vegetal podem ser verificadas na Tabela 22. Não foram verificados valores discrepantes pelo teste de *Grubbs*, com 99% de confiança. Foi realizado teste t pareado, com 95% de confiança, e as inclinações foram homogêneas entre o branco do ensaio e amostra, sendo o *t* cal menor que *t* tab. Assim não foi detectada a interferência de matriz, para os quatro analitos, e foram usadas para cálculos as curvas de calibração obtidas com os padrões preparados em acetonitrila.

Tabela 22 - Resultados do estudo de validação do método para a determinação dos HPAs em óleos vegetais, quanto aos critérios de seletividade, em diferentes níveis de concentração

	BaA	Cri	BbF	BaP
Inclinação (a)	23374,2433	15147,5323	5387,6404	20391,6985
Intercepto (b)	1410,2285	-1352,7161	902,0979	1246,2730
R	0,9994	0,9988	0,9997	0,9996
r ²	0,9987	0,9975	0,9993	0,9992
t calculado	1,409	0,636	1,890	1,302
t tabelado	2,110	2,110	2,110	2,110
Faixa de concentração (µg/kg)	0,25 - 5,00	0,30 - 7,50	1,0 - 20,0	0,25 - 5,00
N	15	15	15	15

BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno

Os limites de detecção e quantificação foram calculados usando os desvios-padrão de amostras fortificadas e estão descritos na Tabela 23. Os LQ para todos os HPAs condizem com os primeiros pontos da curva de calibração do estudo de linearidade.

A exatidão do procedimento analítico foi determinada através de experimentos de recuperação pela fortificação da amostra de óleo de cártamo em quatro diferentes níveis de concentração, no mesmo dia (Dia 1 - Tabela 23). Os valores encontrados variaram de 80,13 a 100,04%. De acordo com os critérios de performance para métodos de análise de HPAs, valores aceitáveis para recuperação devem estar entre 50 e 120% (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2011b). Assim, a exatidão do método foi considerada adequada.

A Tabela 23 apresenta ainda os resultados para avaliar a precisão do método (repetibilidade e precisão intermediária), em uma amostra de óleo de cártamo fortificada em dois níveis de concentração. O coeficiente de variação foi avaliado no mesmo dia e em dois dias diferentes, sendo os valores inferiores a 10%. Foi realizado um teste t de *Student* entre os dois dias, e não houve diferença significativa entre os resultados. Assim, considerou-se que o método atendia aos critérios de precisão.

Tabela 23 - Resultados do estudo de validação do método para a determinação dos HPAs em óleos vegetais, quanto aos limites de detecção, quantificação, critérios de exatidão e precisão

	LD ($\mu\text{g/kg}$)	LQ ($\mu\text{g/kg}$)	Nível de fortificação ($\mu\text{g/kg}$)	Dia 1		Dia 2		Entre dias	
				Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
BaA	0,08	0,25	0,25	80,13 ^a	3,86	80,32 ^a	7,97	80,22	5,92
			1,00	94,79	1,74	-	-	-	-
			2,00	99,10 ^a	3,33	103,96 ^a	2,30	101,53	2,82
			5,00	87,84	6,26	-	-	-	-
Cri	0,09	0,30	0,30	94,34 ^a	1,08	87,19 ^a	8,40	90,76	4,74
			1,50	94,62	9,17	-	-	-	-
			3,00	97,02 ^a	2,45	103,93 ^a	1,76	100,93	2,10
			7,50	84,16	1,80	-	-	-	-
BbF	0,30	1,00	1,00	99,69 ^a	2,22	115,11 ^a	1,91	107,40	2,06
			4,00	97,93	1,99	-	-	-	-
			8,00	100,04 ^a	2,29	99,12 ^a	1,18	99,58	1,74
			20,00	89,45	8,68	-	-	-	-
BaP	0,08	0,25	0,25	89,77 ^a	6,36	79,35 ^a	4,66	84,56	5,51
			1,00	99,31	1,33	-	-	-	-
			2,00	88,77 ^a	1,55	87,66 ^a	5,64	88,22	3,60
			5,00	87,44	4,57	-	-	-	-

Valores expressos como média de três replicatas; CV: coeficiente de variação; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação; BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Médias seguidas da mesma letra, na linha, não possuem diferença significativa ($p > 0,05$, teste t *Student*)

Também foi avaliada a recuperação nas outras amostras de óleos (coco, prímula e linhaça), fortificadas em um mesmo nível (2 $\mu\text{g/kg}$ para BaA e BaP, 3 $\mu\text{g/kg}$ para Cri e 8 $\mu\text{g/kg}$ para BbF), realizada em triplicata. Os valores estão apresentados na Tabela 24, e variaram entre 74,12 e 104,84%, e foram considerados adequados.

Para verificar a precisão do sistema cromatográfico, foi realizada a injeção, por quatro vezes, de uma mesma amostra de óleo de cártamo fortificada, durante três dias consecutivos. Foi avaliado o CV dos tempos de retenção e das áreas dos picos. Os valores encontrados para o coeficiente de variação das áreas, dentro do mesmo período e entre períodos, foram inferiores a 3,5% e, para os tempos de retenção, inferiores a 0,1%, indicando a elevada precisão do sistema.

Tabela 24 - Resultados de recuperação e coeficientes de variação para óleos de coco, prímula e linhaça

Óleo	BaA		Cri		BbF		BaP	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
Coco	83,34	4,90	86,98	6,47	89,14	1,48	74,12	0,92
Prímula	103,35	5,36	104,84	4,55	102,46	3,46	92,60	2,24
Linhaça	85,23	4,41	90,82	4,24	91,21	3,92	77,16	2,68

Valores expressos como média de três replicatas; CV: coeficiente de variação; BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Coco: CO4; Prímula: PR10; Linhaça: LI4

4.3.3 Análise de HPAs em amostras comerciais

O método validado foi aplicado para análise de amostras comerciais de óleos vegetais. As Tabelas 25 a 28 apresentam as médias e desvios-padrão das concentrações encontradas nos óleos, incluindo as concentrações individuais de cada HPA e a soma dos 4 HPAs. As Figuras 28 a 32 exibem os cromatogramas do branco do ensaio e das amostras de óleos vegetais.

De forma a organizar os dados para melhor discussão, a Tabela 29 apresenta a ocorrência de HPAs nos óleos vegetais, por faixa de concentração e na Figura 33 constam os perfis médios dos 4 HPAs analisados, por tipo de óleo.

Os resultados indicaram que 39 das 40 amostras (97,5%) estavam contaminadas com algum dos quatro HPAs analisados. O BaA, o Cri e o BaP foram detectados em 90% dos óleos, enquanto o BbF em 85%. No entanto, os valores encontrados para Cri foram superiores aos outros HPAs, com concentrações variando de ND a 14,99 µg/kg, seguido pelo BaA, com teores entre ND a 9,50 µg/kg.

Para BaA, Cri e BbF, os maiores resultados encontrados foram na amostra PR4, respectivamente, 9,50; 14,99 e 5,95 µg/kg, que resultou no maior valor encontrado para a soma dos 4 HPAs (34,56 µg/kg). Já para BaP, o maior valor foi na amostra PR5, com 4,18 µg/kg. Cinco amostras (12,5%) apresentaram valores abaixo do limite de quantificação para todos os HPAs, sendo duas de óleo de linhaça (LI3 e LI8) e três de coco (CO2, CO4 e CO8). Avaliando os resultados médios das amostras, considerando a categoria de cada grupo, a sequência decrescente dos valores das somas dos 4 HPAs foi: prímula > linhaça > cártamo > coco.

Nos óleos de cártamo, as concentrações obtidas para a soma dos 4 HPAs variaram de 0,97 a 17,77 µg/kg. O BaA apresentou concentrações abaixo de 2 µg/kg para 80% das amostras, somente dois óleos (CA2 e CA10) estavam acima. Para Cri, 4 amostras (40%) apresentaram

teores acima de 2 µg/kg. Para BbF, três amostras (CA2, CA8 e CA10) estavam acima do LQ. Os valores estavam abaixo de 0,5 µg/kg para BaP em 60% dos óleos. Para a soma, 20% dos óleos apresentaram valores acima de 10 µg/kg.

Os óleos de primula apresentaram teores mais elevados para todos os HPAs analisados, com exceção da amostra PR8, a única a apresentar teores próximos ao LQ. Os valores para a soma dos 4 HPAs variaram de 0,30 a 34,56 µg/kg. Assim como nos outros óleos, o HPA predominante foi o Cri, seguido pelo BaA. Dentre todos os óleos, esta foi a categoria que apresentou os maiores valores para BaP e as maiores porcentagens de contribuição. A amostra PR10, considerada autêntica pelo ensaio de AG, também apresentou teores elevados para BaA (2,94 µg/kg) e Cri (4,30 µg/kg).

Para os óleos de linhaça, os valores encontrados para BbF e BaP foram inferiores a 0,5 µg/kg para 60 e 80% das amostras, respectivamente. Os valores mais elevados para BaA e Cri foram encontrados nas amostras LI5 e LI6, o que refletiu nos resultados mais altos encontrados para a soma. Estas duas amostras interferiram para a variação encontrada entre a média (4,27 µg/kg) e mediana (2,25 µg/kg) da soma dos 4 HPAs, que apresentou valores variando de 0,98 a 15,41 µg/kg.

Nos óleos de coco, os níveis foram significativamente baixos para a soma dos 4 HPAs, variando de abaixo do LD a 4,95 µg/kg, com três amostras apresentando teores abaixo do LQ (CO2, CO4, CO8). O HPA predominante foi o Cri. Os maiores valores para os 4 HPAs foram encontrados nas amostras CO1 e CO9, no entanto a soma não ultrapassou 5 µg/kg.

A literatura e a legislação indicam que o óleo de coco pode apresentar um valor para a soma dos 4 HPAs relativamente maior que outros óleos, devido à presença proporcionalmente maior de BaA e Cri, considerando o processo de secagem a que o fruto pode ser submetido (WEGRZYN et al., 2006; COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2011a). No entanto, neste trabalho, não foram encontrados valores elevados para os HPAs, com resultados individuais abaixo de 2 µg/kg e, para a soma dos 4 HPAs, abaixo de 5 µg/kg.

O Regulamento nº 835/2011 preconiza os limites tolerados para os HPAs, sendo o valor máximo para o BaP de 2,0 µg/kg (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2011a). Os resultados encontrados foram inferiores para todas as amostras de coco, cártamo e linhaça. Três amostras de primula (PR1, PR4 e PR5) apresentaram níveis acima do permitido. As menores concentrações de BaP foram obtidas nas amostras de coco (média = 0,25 µg/kg) e as maiores nas de primula (média = 1,57 µg/kg). WEGRZYN et al. (2006) obtiveram concentrações para BaP, em óleos prensados a frio, superiores ao limite permitido. No entanto, neste trabalho, 92,5% das amostras apresentaram valores inferiores à legislação.

O mesmo regulamento estipula um limite para a soma dos 4 HPAs de 10,0 µg/kg para óleos vegetais e, especificamente para óleo de coco, o valor é de 20 µg/kg (COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES, 2011a). O valor foi ultrapassado para 8 amostras (20%), sendo 2 de cártamo (CA2 e CA10), 4 de prímula (PR1, PR4, PR5, PR7) e 2 de linhaça (LI5 e LI6), devido às proporções mais elevadas de Cri, seguido pelo BaA (Tabela 29). Estes HPAs, compostos por 4 anéis aromáticos, foram predominantes em todas amostras.

Das oito amostras que apresentaram um limite superior à legislação para a soma de 4 HPAs, apenas 3 estavam acima para BaP. A maior contribuição para valores elevados foi do Cri, enquanto a contribuição relativa ao BaP foi considerada pequena. Estes resultados estão de acordo com ALOMIRAH et al. (2010), que encontraram outros HPAs em óleos em que o BaP não estava presente. Assim, estes resultados comprovam que o BaP sozinho não é um bom indicador da concentração de outros compostos carcinogênicos e genotóxicos, assim como publicado por EFSA (2008), que não detectaram BaP em 30% de 1375 alimentos analisados enquanto outros compostos carcinogênicos estavam presentes. Logo, a soma dos 4 HPAs é o indicador mais adequado.

Nas amostras branco, sem a presença de óleo, foi verificada a presença de BaA e Cri. Os valores médios encontrados no branco para BaA foi 0,50 ng/mL e, para Cri, 0,75 ng/mL. Uma hipótese é de que esta contaminação seja da água utilizada no processo de extração. Durante a etapa de otimização da metodologia, foram testadas águas retiradas de vários ultra purificadores, e foi observado que os valores variaram entre elas. Assim, optou-se por usar a água que apresentava os menores valores, retirando a água sempre do mesmo equipamento e no mesmo dia de análise. Assim, as concentrações obtidas no branco do ensaio, para o dia, eram calculadas e descontadas dos valores dos óleos.

Tabela 25 - Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) para os diferentes óleos de coco analisados

	BaA		Cri		BbF		BaP		Soma 4 HPAs
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
CO1	1,08 ^a	0,06	1,43 ^a	0,09	1,44 ^a	0,08	1,01 ^a	0,04	4,95
CO2	ND	-	ND	-	Tr	-	Tr	-	Tr
CO3	Tr	-	Tr	-	Tr	-	0,30 ^b	0,01	0,30
CO4	ND	-	ND	-	Tr	-	Tr	-	Tr
CO5	0,61 ^b	0,05	1,38 ^a	0,14	ND	-	Tr	-	1,99
CO6	0,48 ^c	0,05	0,79 ^b	0,05	Tr	-	Tr	-	1,27
CO7	0,32 ^d	0,01	0,41 ^c	0,06	Tr	-	Tr	-	0,73
CO8	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
CO9	1,05 ^a	0,03	1,62 ^d	0,06	1,10 ^b	0,02	1,09 ^a	0,02	4,86
CO10	0,57 ^b	0,02	1,25 ^e	0,02	Tr	-	Tr	-	1,82
Média	0,41	0,04	0,69	0,07	0,25	0,05	0,25	0,02	1,59
Mediana	0,40	-	0,60	-	Tr	-	Tr	-	1,00
Mínimo	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
Máximo	1,08	0,06	1,62	0,06	1,44	0,08	1,09	0,02	4,95

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; ND: não detectado (abaixo do LD); Tr: traços (entre LD e LQ); BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Amostras em negrito: consideradas possivelmente adulteradas, de acordo com o ensaio de ácidos graxos; Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não possuem diferença significativa (Teste de Tukey, 5%)

Tabela 26 - Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) para os diferentes óleos de cártamo analisados

	BaA		Cri		BbF		BaP		Soma 4 HPAs
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
CA1	0,87 ^a	0,08	0,81 ^a	0,07	ND	-	0,90 ^a	0,16	2,59
CA2	4,81 ^b	0,46	8,80 ^b	0,97	2,52 ^a	0,19	1,63 ^b	0,08	<u>17,77</u>
CA3	0,87 ^a	0,10	2,29 ^c	0,32	Tr	-	Tr	-	3,16
CA4	0,77 ^a	0,08	1,34 ^a	0,08	Tr	-	Tr	-	2,11
CA5	0,64 ^a	0,04	0,78 ^a	0,12	Tr	-	ND	-	1,43
CA6	0,28 ^c	0,08	0,69 ^a	0,02	Tr	-	Tr	-	0,97
CA7	0,52 ^{a,c}	0,02	1,37 ^a	0,05	Tr	-	Tr	-	1,89
CA8	1,14 ^a	0,03	2,29 ^c	0,08	1,27 ^b	0,02	0,67 ^c	0,01	5,37
CA9	0,55 ^{a,c}	0,08	1,24 ^a	0,18	Tr	-	Tr	-	1,80
CA10	2,68 ^d	0,18	5,13 ^d	0,32	1,59 ^b	0,06	0,96 ^a	0,01	<u>10,36</u>
Média	1,31	0,11	2,47	0,22	0,54	0,07	0,42	0,06	4,02
Mediana	0,82	-	1,35	-	Tr	-	Tr	-	2,35
Mínimo	0,28	0,08	0,69	0,02	ND	-	ND	-	0,97
Máximo	4,81	0,46	8,80	0,97	2,52	0,19	1,63	0,08	17,77

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; ND: não detectado (abaixo do LD); Tr: traços (entre LD e LQ); BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Amostras em negrito: consideradas possivelmente adulteradas, de acordo com o ensaio de ácidos graxos; Valores sublinhados: fora da faixa permitida pela legislação; Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não possuem diferença significativa (Teste de Tukey, 5%)

Tabela 27- Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) para os diferentes óleos de primula analisados

	BaA		Cri		BbF		BaP		Soma 4 HPAs
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
PR1	4,81 ^a	0,22	8,38 ^a	0,53	3,06 ^a	0,18	<u>2,49^a</u>	0,05	<u>18,75</u>
PR2	0,99 ^b	0,02	1,95 ^b	0,06	1,33 ^b	0,01	0,71 ^b	0,01	4,98
PR3	0,39 ^c	0,01	0,64 ^c	0,01	Tr	-	0,38 ^c	0,01	1,41
PR4	9,50 ^d	0,29	14,99 ^d	0,50	5,95 ^c	0,11	<u>4,11^d</u>	0,05	<u>34,56</u>
PR5	8,30 ^e	0,07	12,81 ^e	0,27	5,92 ^c	0,04	<u>4,18^d</u>	0,12	<u>31,21</u>
PR6	0,73 ^b	0,05	1,09 ^c	0,06	1,37 ^b	0,03	0,66 ^b	0,02	3,85
PR7	3,94 ^f	0,16	6,46 ^f	0,49	2,85 ^d	0,04	1,91 ^e	0,03	<u>15,16</u>
PR8	0,30 ^c	0,01	Tr	-	Tr	-	Tr	-	0,30
PR9	1,11 ^b	0,01	1,49 ^b	0,01	1,20 ^{b,e}	0,01	0,62 ^b	0,01	4,42
PR10	2,94 ^h	0,08	4,30 ^g	0,07	1,14 ^e	0,01	0,61 ^b	0,02	9,00
Média	3,30	0,09	5,21	0,22	2,28	0,05	1,57	0,04	12,36
Mediana	2,03	-	3,13	-	1,35	-	0,69	-	6,99
Mínimo	0,30	0,01	Tr	-	Tr	-	Tr	-	0,30
Máximo	9,50	0,29	14,99	0,50	5,95	0,11	4,18	0,12	34,56

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; ND: não detectado (abaixo do LD); Tr: traços (entre LD e LQ); BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Amostras em negrito: consideradas possivelmente adulteradas, de acordo com o ensaio de ácidos graxos; Valores sublinhados: fora da faixa permitida pela legislação; Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não possuem diferença significativa (Teste de *Tukey*, 5%)

Tabela 28 - Teores de HPAs ($\mu\text{g/kg}$) para os diferentes óleos de linhaça analisados

	BaA		Cri		BbF		BaP		Soma 4 HPAs
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	
LI1	0,70 ^a	0,04	1,35 ^{a,c}	0,09	Tr	-	Tr	-	2,06
LI2	0,56 ^a	0,08	1,13 ^{a,c}	0,30	ND	-	ND	-	1,69
LI3	ND	-	ND	-	Tr	-	Tr	-	Tr
LI4	0,86 ^a	-	1,58 ^{a,c}	0,10	ND	-	Tr	-	2,44
LI5	4,34 ^b	0,06	7,16 ^b	0,74	1,90 ^a	0,21	1,26 ^a	0,19	<u>14,65</u>
LI6	4,19 ^b	0,43	7,58 ^b	0,30	2,19 ^a	0,02	1,45 ^a	0,05	<u>15,41</u>
LI7	1,08 ^c	0,31	1,58 ^{a,c}	0,26	Tr	-	0,27 ^b	0,02	2,94
LI8	Tr	-	Tr	-	ND	-	ND	-	Tr
LI9	0,84 ^{a,c}	-	1,72 ^a	0,07	Tr	-	Tr	-	2,56
LI10	Tr	-	0,98 ^c	0,01	Tr	-	Tr	-	0,98
Média	1,26	0,16	2,31	0,23	0,41	0,12	0,30	0,08	4,27
Mediana	0,77	-	1,47	-	Tr	-	Tr	-	2,25
Mínimo	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	Tr
Máximo	4,34	0,06	7,58	0,30	2,19	0,02	1,45	0,05	15,41

Valores expressos como média de três replicatas; DP: desvio-padrão; ND: não detectado (abaixo do LD); Tr: traços (entre LD e LQ); BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno; Amostras em negrito: consideradas possivelmente adulteradas, de acordo com o ensaio de ácidos graxos; Valores sublinhados: fora da faixa permitida pela legislação; Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não possuem diferença significativa (Teste de *Tukey*, 5%)

Figura 28 - Cromatograma obtido pela análise em UFLC/FL para branco do ensaio; 1 – Benzo(a)antraceno, 2 – Criseno

Figura 29 - Cromatograma obtido pela análise em UFLC/FL para amostra de óleo de coco (CO1); 1 – Benzo(a)antraceno, 2 – Criseno, 3 – Benzo(b)fluoranteno e 4 – Benzo(a)pireno

Figura 30 - Cromatograma obtido pela análise em UFLC/FL para amostra de óleo de cártamo (CA2); 1 – Benzo(a)antraceno, 2 – Criseno, 3 – Benzo(b)fluoranteno e 4 – Benzo(a)pireno

Figura 31 - Cromatograma obtido pela análise em UFLC/FL para amostra de óleo de prímula (PR1); 1 – Benzo(a)antraceno, 2 – Criseno, 3 – Benzo(b)fluoranteno e 4 – Benzo(a)pireno

Figura 32 - Cromatograma obtido pela análise em UFLC/FL para amostra de óleo de linhaça (LI7); 1– Benzo(a)antraceno, 2 – Criseno, 3 – Benzo(b)fluoranteno e 4 – Benzo(a)pireno

Figura 33 - Porcentagem de contribuição de cada hidrocarboneto, considerando a soma dos 4 HPAs quantificados; BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno

Tabela 29 - Ocorrência de HPAs em óleos vegetais

		Coco (n = 10)	Cártamo (n = 10)	Prímula (n = 10)	Linhaça (n = 10)	Geral (n=40)
BaA	<0,5 µg/kg	6 (60%)	1 (10%)	2 (20%)	3 (30%)	12 (30%)
	≤2 µg/kg	4 (40%)	7 (70%)	3 (30%)	5 (50%)	19 (47,5%)
	>2 µg/kg	0	2 (20%)	3 (30%)	2 (20%)	7 (17,5%)
	>5 µg/kg	0	0	2 (20%)	0	2 (5%)
Cri	<0,5 µg/kg	5 (50%)	0	1 (10%)	2 (20%)	8 (20%)
	≤2 µg/kg	5 (50%)	6 (60%)	4 (40%)	6 (60%)	21 (52,5%)
	>2 µg/kg	0	2 (20%)	5 (50%)	0	7 (17,5%)
	>5 µg/kg	0	2 (20%)	0	2 (20%)	4 (10%)
BbF	<0,5 µg/kg	8 (80%)	3 (30%)	0	6 (60%)	17 (42,5%)
	≤2 µg/kg	2 (20%)	6 (60%)	6 (60%)	3 (30%)	17 (42,5%)
	>2 µg/kg	0	1 (10%)	2 (20%)	1 (10%)	4 (10%)
	>5 µg/kg	0	0	2 (20%)	0	2 (5%)
BaP	<0,5 µg/kg	8 (80%)	6 (60%)	2 (20%)	8 (80%)	24 (60%)
	≤2 µg/kg	2 (20%)	4 (40%)	5 (50%)	2 (20%)	13 (32,5%)
	>2 µg/kg	0	0	3 (30%)	0	3 (7,5%)
	>5 µg/kg	0	0	0	0	0
4 HPAs	<5 µg/kg	10 (100%)	7 (70%)	5 (50%)	8 (80%)	30 (75%)
	≤10 µg/kg	0	1 (10%)	1 (10%)	0	2 (5%)
	>10 µg/kg	0	2 (20%)	2 (20%)	2 (20%)	6 (15%)
	>20 µg/kg	0	0	2 (20%)	0	2 (5%)

BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno

Os resultados deste trabalho foram comparados com estudos já publicados com óleos vegetais e o Quadro 11 apresenta algumas concentrações de HPAs já reportadas na literatura. Verifica-se que trabalhos sobre óleos vegetais de fontes não convencionais, como o deste estudo, são limitados. Os dados da pesquisa realizada na Polônia com óleos de linhaça, cártamo e prímula foram menores que os encontrados neste trabalho (CIECIERSKA e OBIEDZINSKI, 2013). Já os resultados de PANDEY et al. (2004) para óleos de coco foram baixos e próximos aos obtidos e, em óleos de linhaça e cártamo, foram superiores aos apresentados para Cri e semelhantes para BaP.

Quadro 11 - Valores para os 4 HPAs em óleos vegetais citados na literatura

Referência	Local	Óleos analisados	Concentração (µg/kg)			
			BaA	Cri	BbF	BaP
BARRANCO et al.(2003)	Espanha	Diferentes óleos vegetais, incluindo coco, girassol, palma e oliva				
		Óleo de coco cru	31	47	29	26
		Óleo de coco refinado	0,3	1,6	<0,4	1,7
		Azeite de oliva	<0,1	1,3	0,6	0,5
PANDEY et al. (2004)	Índia	Diferentes óleos vegetais, incluindo coco, cártamo e linhaça				
		Óleo de coco	-	2,0	-	0,8
		Óleo de cártamo	-	26,6	-	2,6
		Óleo de linhaça	-	20,7	-	1,5
ALOMIRAH et al. (2010)	Kuwait	Diferentes óleos, incluindo milho, girassol, canola, oliva, etc.	-	-	-	0-11,05
CAMARGO et al. (2011)	Brasil	24 óleos de soja	0,24-10,58	1,36-10,99	0,31-8,45	0,25-7,00
ROSZKO et al. (2012)	Polônia	Óleos vegetais prensados a frio, incluindo papoula, abóbora, borragem, canola, gergelim, etc.	<LQ-1,08	<LQ-1,52	0,02-0,88	0,02-1,25
CIECIERSKA e OBIEDZINSKI (2013)	Polônia	Óleos de fontes não convencionais, incluindo cártamo, linhaça e prímula				
		Óleo de cártamo	0,86±0,03	0,92±0,05	1,15±0,07	ND
		Óleo de prímula	0,66±0,04	1,78±0,14	1,59±0,09	ND
		Óleo de linhaça	ND	ND	ND	ND
TFOUNI et al. (2014)	Brasil	Óleos compostos contendo azeite de oliva	0,60-8,82	0,60-7,09	0,52-11,77	0,29-25,51
KANG et al. (2014)	Coreia	Diferentes óleos vegetais, incluindo soja, milho, canola, arroz, etc.	ND	ND	ND	0,41-0,79
JIANG et al. (2015)	China	Óleos de amendoim, soja, milho e compostos	<LQ-28,49	<LQ-43,20	<LQ-47,77	<LQ-11,80
			Média: 2,71	Média: 1,97	Média: 1,71	Média: 1,28

ND: não detectado; LQ: limite de quantificação; BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno

BARRANCO et al. (2003) analisou diversos tipos de óleos, incluindo os de coco, e encontrou teores elevados de HPAs para o óleo de coco cru, enquanto que os valores para refinado estavam próximos aos encontrados neste trabalho. ALOMIRAH et al. (2010) avaliaram 115 diferentes óleos e gorduras e revelaram que aproximadamente 20% das amostras excedeu o máximo tolerado para BaP, com um nível máximo de 11,05 µg/kg no óleo de gergelim.

KANG et al. (2014) analisaram o conteúdo de HPAs em diversos óleos comercializados na Coreia; não foram detectadas as presenças de BaA, Cri e BbF nas amostras, e os valores de BaP foram inferiores a 1 µg/kg, sendo a concentração média de 8 HPAs de 0,548 µg/kg, sugerindo que naquele local a contribuição por HPAs em óleos não era significativa. Já os teores dos óleos analisados na China foram mais significativos: JIANG et al. (2015) analisaram diferentes amostras e verificaram que a soma de 15 HPAs variou de 3,02 a 331,95 µg/kg, com média de 54,37 µg/kg. O óleo com maior contaminação foi o de amendoim.

Existem várias causas que podem justificar a presença de HPAs nos óleos vegetais, mas principalmente o contato da planta e das sementes com áreas poluídas e o processo de secagem das sementes. A primeira relaciona a contaminação ambiental dos locais em que as plantas foram cultivadas. A poluição do ar contém poeira e partículas com elevada quantidade de HPAs, que podem se depositar na superfície das plantas e contaminá-las, e durante o processamento serem transferidos ao produto final. Em áreas industriais e próximos a rodovias, este fator pode ser significativamente maior. Também a contaminação do solo no qual a planta foi cultivada pode ser um fator favorável para o acúmulo de HPAs na planta (BANSAL e KIM, 2015).

Uma outra causa de contaminação dos óleos é o processo de secagem das sementes. No Brasil, o uso de secagem direta da semente com combustão de gases é uma prática comum, e os HPAs presentes na fumaça podem entrar em contato direto com as sementes e contaminá-las. Então, durante o processo de extração dos óleos destas sementes, os HPAs podem transferir-se para os óleos, especialmente considerando suas características lipofílicas (CAMARGO et al., 2012).

Foi observado, nos óleos de primula analisados, que as amostras que apresentavam os teores superiores aos permitidos pelo Regulamento nº 835/2011 foram considerados, pelo ensaio de AG, dentro do perfil de óleo de soja. O trabalho realizado por CAMARGO et al. (2012) indicou que a contaminação de alguns óleos de soja após o refino por BaP e pela soma dos 4 HPAs era elevada, mas era ainda maior antes do processamento (óleo cru). Este fato deve-

se ao processo de secagem dos grãos, uma vez que no Brasil o uso de fumaça de combustão é uma prática comum, e este procedimento pode ser requerido por diversas vezes dependendo das condições da matéria-prima. Além disso, durante a etapa de branqueamento, utiliza-se terras ativadas ou naturais, ao invés de carvão ativado, o que seria mais eficiente para a remoção dos HPAs nos óleos (MANDARINO, 2001; TEIXEIRA et al., 2007; CAMARGO et al., 2012).

A literatura indica que óleos refinados tendem a apresentar menores teores de HPAs, pois o processo de neutralização e desodorização tendem a contribuir de forma efetiva na redução destes compostos; em pesquisa realizada com óleo de soja, a redução de HPAs com 4 a 6 anéis atingiu valores superiores a 88% após o refino (CAMARGO et al., 2012). Assim, considerando a questão da contaminação por HPAs dos óleos vegetais, produtos refinados seriam mais adequados ao consumo, uma vez que apresentam menores quantidades daqueles compostos. No entanto, este processamento tende a aumentar os teores de AGT nos óleos, e é conhecido que a ingestão de ácidos graxos *trans* pode aumentar o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (AUED-PIMENTEL et al., 2009; FREIRE et al., 2013). Desta forma, a etapa do refino não deve ser considerada como uma solução para a redução dos HPAs nos óleos, mas o ideal é que se evite a exposição das plantas à contaminação ambiental e que maiores cuidados sejam adotados durante o processamento do óleo, especialmente durante a secagem da matéria-prima.

Embora menos frequente, a contaminação acidental dos óleos é uma outra forma a que os produtos podem ser expostos aos HPAs, e esta contaminação pode ocorrer durante o processamento, pelo contato com resíduo com óleos minerais (BANSAL e KIM, 2015).

O cálculo de ingestão diária dos HPAs foi estimado considerando os dados das porções diárias recomendadas nos rótulos dos óleos (Quadro 3) e as quantidades de HPAs determinadas nestes produtos, usando a seguinte fórmula:

$$\text{Ingestão HPAs } \left(\frac{\text{ng}}{\text{dia}} \right) = \text{média do conteúdo de HPAs (ng/g)} \times \text{porção diária (g)}$$

A Tabela 30 apresenta a ingestão diária, como médias e faixas de valores. Os valores de ingestão, para a soma dos 4 HPAs, podem variar de 1,0 a 73,3 ng/dia. Considerando individualmente cada HPA, o óleo que poderia apresentar uma contribuição mais significativa na ingestão da soma dos 4 HPAs seria o óleo de linhaça e, o de menor, o coco. Os valores foram menores que os apresentados por EFSA (2008), para a categoria de gorduras vegetais e animais (respectivamente 26 e 177 ng/dia para BaP e 4 HPAs). Deve-se considerar que estes óleos

representam uma pequena contribuição na média da dieta, em relação a outros óleos e outros alimentos.

Embora o consumo destes óleos seja apenas por uma parte pequena da população, pode ser considerada como uma rota de exposição aos HPAs, uma vez que a incidência com baixos níveis é alta, e também existem amostras com teores ultrapassando os limites da legislação.

Tabela 30 – Ingestão diária dos HPAs (ng/dia) em diferentes óleos vegetais*

	Óleos de coco		Óleos de cártamo		Óleos de prímula		Óleos de linhaça	
	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa	Média	Faixa
BaA	3,0	0,5-7,3	4,7	1,0-19,2	5,4	0,4-16,6	9,8	0,7-21,7
Cri	5,6	0,8-16,6	8,6	2,3-35,2	9,4	0,6-25,6	14,8	1,0-35,8
BbF	3,6	2,9-4,4	6,3	2,5-10,1	4,6	1,2-11,8	8,0	6,6-9,5
BaP	3,3	2,0-4,4	3,8	1,3-6,5	2,8	0,4-8,4	4,8	3,8-6,3
Soma 4 HPAs	10,4	1,4-25,4	16,7	3,6-71,1	20,1	0,6-62,4	27,3	1,0-73,3

*Cálculo realizado considerando as médias obtidas para os HPAs nas Tabelas 25 a 28 e as porções diárias recomendadas descritas nos rótulos dos produtos (Quadro 3); BaA: benzo(a)antraceno; Cri: criseno; BbF: benzo(b)fluoranteno; BaP: benzo(a)pireno

5 CONCLUSÕES

A coluna DF-FFAP (15 m x 0,1 mm x 0,1 μ m, Agilent) mostrou-se satisfatória para análise de perfil de ácidos graxos em óleos vegetais, com um menor tempo de análise cromatográfica que as colunas convencionais longas (100 m). Os parâmetros de verificação do método para AG foram adequados e a metodologia pode ser aplicada nas amostras comerciais. Dos 40 óleos vegetais avaliados, 14 (35%) não se encontravam dentro do perfil de AG característico que os declarados em seus rótulos, sendo um de coco, quatro de cártamo e nove de prímula.

O rastreamento do estado oxidativo dos óleos comerciais indicou que o conteúdo de produtos de oxidação nas amostras foi muito variado. Os valores para o índice de acidez variaram de 0,097 a 12,778 mg KOH/g, sendo o menor valor encontrado no óleo de cártamo (CA8) e o maior no de linhaça (LI6). Três amostras (7,5%) apresentaram valores acima do limite estabelecido pela ANVISA para óleos prensados a frio (LI3, LI5 e LI6), estando não conformes.

Os índices de peróxido apresentaram uma grande variação dos valores para os óleos analisados, de abaixo do LQ (para boa parte das amostras de óleo de coco) a 104,81 meq/kg (PR8). Quatro óleos (10%) estavam acima do limite da legislação (ANVISA), sendo dois de linhaça (LI2 e LI3) e dois de prímula (PR4 e PR8).

Os resultados de p-anisidina variaram de <LQ a 12,98. Os menores valores foram das amostras de coco, variando de abaixo do LQ a 0,51, e o maior para a amostra PR10 (12,98), que apresentava um odor alterado.

Os valores de tototox variaram de ND a 218,49 (PR8). O único grupo que apresentou todos os valores de acordo com a recomendação da literatura foi o óleo de coco. Quinze óleos vegetais (37,5%) apresentaram resultados superiores ao recomendado, sendo 2 de linhaça, 5 de cártamo e 8 de prímula.

O método validado mostrou-se adequado para a determinação dos 4 HPAs (BaA, Cri, BbF e BaP) em óleos vegetais. A técnica usando UFLC, com a coluna Zorbax Eclipse PAH (100 mm x 2,1 mm x 1,8 μ m, Agilent), mostrou-se satisfatória, com o menor uso de solventes e ganho de tempo na análise cromatográfica em relação à convencional (CLAE). Para o BaP, as concentrações variaram de ND a 4,18 μ g/kg (PR5) e três amostras (7,5%) apresentaram níveis acima do permitido pela Comunidade Europeia. Os resultados para a soma dos 4 HPAs variaram de ND a 34,56 μ g/kg (PR4) e foram superiores ao estipulado pela mesma legislação

em oito óleos (20%): 2 de cártamo, 4 de prímula e 2 de linhaça. Os hidrocarbonetos com maior ocorrência foram o Cri e o BaA. Os resultados indicaram que a incidência com baixos níveis é alta: cerca de 97,5% das amostras apresentaram pelo menos um dos 4 HPAs acima do LD.

A partir dos resultados encontrados para os parâmetros de qualidade, sugere-se que os ensaios de p-anisidina e totox sejam incluídos nas análises de rotina dos laboratórios, além da realização usual de acidez e peróxido, uma vez que o conjunto de dados podem dar uma avaliação mais completa sobre o estado de conservação dos óleos.

Boas práticas de fabricação devem ser adotadas pelas indústrias desde a fase inicial da coleta da matéria-prima e continuar durante todo o processamento de obtenção do óleo, com cuidados inclusive durante a comercialização dos produtos, para minimizar o processo de oxidação e a contaminação dos óleos.

Para a maioria dos parâmetros avaliados, não há legislações no Brasil estabelecendo os limites. Assim, os resultados desta pesquisa poderão ser usados pelas Agências para revisão/atualização da legislação e controle do produto. É necessária a realização contínua de programas de monitoramento, com o objetivo de gerar mais dados sobre amostras comerciais e verificar a qualidade e a contaminação dos produtos que estão sendo comercializados.

Sugere-se, para futuros trabalhos, a investigação nos óleos vegetais de outros parâmetros de identidade (especialmente esteróis), de outros HPAs considerados carcinogênicos e de um maior número de amostras, incluindo óleos prensados a frio e refinados, de mesma marca e lotes diferentes. Desta forma, será possível um panorama mais completo dos óleos vegetais que estão sendo oferecidos à população.

6 REFERÊNCIAS

- ALOMIRAH, H. et al. Benzo(a)pyrene and total polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) levels in vegetable oils and fats do not reflect the occurrence of the eight genotoxic PAHs. **Food Additives and Contaminants**, London, v. 27, n. 6, p. 869-878, 2010.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. Method 936.16, Standard solution of sodium hydroxide, 1936. In **Official Methods of Analysis of AOAC**. 19th ed. 2012. Disponível em: <www.eoma.aoac.org>. Acesso em: 10 agosto 2015.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. Method 940.28, Fatty acids (free) in crude and refined oils, 1940. In: **Official Methods of Analysis of AOAC**. 19th ed. 2012. Disponível em: <www.eoma.aoac.org>. Acesso em: 10 agosto 2015.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. Method 942.27, Standard solutions of sodium thiosulfate, 1942. In: **Official Methods of Analysis of AOAC**. 19th ed. 2012. Disponível em: <www.eoma.aoac.org>. Acesso em: 10 agosto 2015.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. Method 965.33, Peroxide value of oils and fats, 1969a. In: **Official Methods of Analysis of AOAC**. 19th ed. 2012. Disponível em: <www.eoma.aoac.org>. Acesso em: 10 agosto 2015.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. Method 969.33, Preparation of methyl esters boron trifluoride method, 1969b. In: **Official Methods of Analysis of AOAC**. 19th ed. 2012. Disponível em: <www.eoma.aoac.org>. Acesso em: 10 agosto 2015.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemistry. Method 973.30, Polycyclic aromatic hydrocarbons and benzo(a)pyrene in food, 1973. In: **Official Methods of Analysis of AOAC**. 19th ed. 2012. Disponível em: <www.eoma.aoac.org>. Acesso em: 10 agosto 2015.
- AOCS - American Oil Chemists' Society. Method Cd 3d-63. Acid Value. In **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 5th ed. Champaign: AOCS, 2009a.
- AOCS - American Oil Chemists' Society. Method Ce 1h-05. Determination of cis-, trans-, saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in vegetable or nonruminant animal oils and fats by capillary GLC. In **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 5th ed. Champaign: AOCS, 2009b.
- AOCS - American Oil Chemists' Society. Method Cd 18-90. P-anisidine value. In **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society**. 5th ed. Champaign: AOCS, 2011.
- ASSUNÇÃO, M. L. et al. Effects of dietary coconut oil on the biochemical and anthropometric profiles of women presenting abdominal obesity. **Lipids**, Champaign, v. 44, n. 7, p. 593-601, 2009.
- AUED-PIMENTEL, S. et al. Azeite de oliva: incidência de adulterações entre os anos de 1993 a 2000. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 61, n. 2, p. 69-75, 2002.
- AUED-PIMENTEL, S. **Avaliação de procedimentos analíticos para a determinação de lipídios e ácidos graxos em produtos alimentícios**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências) - Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de São Paulo, São Paulo, 2007.

- AUED-PIMENTEL, S. et al. Ácidos graxos trans em óleos vegetais refinados poli-insaturados comercializados no estado de São Paulo, Brasil. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 646-651, 2009.
- AUED-PIMENTEL, S. et al. Óleos de coco comercializados na cidade de São Paulo: avaliação da autenticidade e da adequação da informação nutricional. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANALISTAS DE ALIMENTOS (ENAAL), 18, 2013, São Paulo. **Anais eletrônicos...** São Paulo: SBAN, 2013.
- AYDENIZ, B.; GUNESER, O.; YOLMAZ, E. Physico-chemical, sensory and aromatic properties of cold press produced safflower oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 91, p. 99-110, 2014.
- BALCH, S. A.; MCKENNEY, C. B.; AULD, D. L. Evaluation of gamma-linolenic acid composition of evening primrose (*Oenothera*) species native to Texas. **HortScience**, v. 38, n. 4, p. 595-598, 2003.
- BANNON, C. D. et al. Analysis of fatty acids methyl esters with high accuracy and reliability: III Literature review of and investigations into the development of rapid procedures for the methoxide-catalysed methanolysis of fats and oils. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 247, n. 1, p. 71-89, 1982.
- BANSAL, V.; KIM, K. H. Review of PAH contamination in food products and their health hazards. **Environment International**, Elmsford, v. 84, p. 26-38, 2015.
- BARRANCO, A. et al. Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 988, p. 33-40, 2003.
- BARROSO, A. K. M. et al. Linhaça marrom e dourada: propriedades químicas e funcionais das sementes e dos óleos prensados a frio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 1, p. 181-187, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 03 dez. 1999.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 281, de 06 de outubro de 2003. Exige como procedimento de importação para “aceite de orujo de oliva” ou óleo de bagaço... **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 08 out. 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova o Regulamento Técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 833, de 28 de março de 2007. Determina a apreensão, em todo território nacional, de todos os lotes do produto ácido linoleico conjugado – CLA, por não possuir registro no Ministério da Saúde. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 29 mar. 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Lista de Novos Alimentos aprovados**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_alimentos.htm>. Acesso em: 31 agosto 2015.

- BRUHL, L. Determination of trans fatty acids in cold pressed oils and in dried seeds. **Feet/Lipid**, Weinheim, v. 11, p. 380-383, 1996.
- CAMARGO, M. C. R. et al. HPLC-FLD simultaneous determination of 13 polycyclic aromatic hydrocarbons: validation of an analytical procedure for soybean oils. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 22, n. 7, p. 1354-1361, 2011.
- CAMARGO, M. C. R. et al. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons content in different stages of soybean oils processing. **Food Chemistry**, Barking, v. 135, p. 937-942, 2012.
- CAMPANELLA, L. C. A. et al. Efeito da suplementação de óleo de cártamo sobre o peso corporal, perfil lipídico, glicídico e antioxidante de ratos wistar induzidos a obesidade. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 35, n. 1, p. 141-147, 2014.
- CHOO, W. S.; BIRCH, J.; DUFOUR, J. P. Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed flaxseed oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, p. 202-211, 2007.
- CHRISTIE, W. C. The analysis of evening primrose oil. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 10, p. 73-83, 1999.
- CIECIERSKA, M.; OBIEDZINSKI, MW. Polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oils from unconventional sources. **Food Control**, Vurrey, v. 30, p. 556-562, 2013.
- CODEX. Codex Stan 33, 1981a. Codex standards for olive oils and olive pomace oils. **Codex Alimentarius**, Rome, 2015.
- CODEX. Codex Stan 19, 1981b. Codex standards for edible fats and oils not covered by individuals standards. **Codex Alimentarius**, Rome, 2015.
- CODEX. Codex Stan 210, 1999. Codex standards for named vegetable oils. **Codex Alimentarius**, Rome, 2015.
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Regulation (EC) n° 835/2011, of 19 August 2011. Amending Regulation (EC) n° 1881/2006 as regards maximum levels for polycyclic aromatic hydrocarbons in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L215/4-L215/8, 2011a.
- COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. Commission Regulation (EC) n° 836/2011, of 19 August 2011. Amending Regulation (EC) n° 333/2007 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of lead, cadmium, mercury, inorganic tin, 3-MCPD and benzo(a)pyrene in foodstuffs. **Official Journal of the European Union**, L215/9-L215/16, 2011b.
- CRUZ-HERNANDEZ, C. et al. Direct quantification of fatty acids in human milk by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1284, p. 174-179, 2013.
- DAYRIT, F. M. et al. Quality characteristics of virgin coconut oil: comparisons with refined coconut oil. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 83, n. 9, p. 1789-1799, 2011.
- DEBMANDAL, M.; MANDAL, S. Coconut (Cocos nucifera L): In health promotion and disease prevention. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Hainan, v. 4, n. 3, p. 241-247, 2011.
- DESTAILLATS, F.; CRUZ-HERNANDEZ, C. Fast analysis by gas-liquid chromatography. Perspective on the resolution of complex fatty acid compositions. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1169, p. 175-178, 2007.

- DOMINGO, J. L. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in food and estimated intake by the population of Catalonia, Spain: temporal trend. **Environment International**, Elmsford, v. 36, p. 424-432, 2010.
- EFSA - European Food Safety Authority. Scientific opinion of the panel on contaminants in the food chain on a request from the european commission on polycyclic aromatic hydrocarbons in food. **European Food Safety Authority Journal**, Parma, v. 724, p. 1-114, 2008.
- EVERSTINE, K.; SPINK, J.; KENNEDY, S. Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 76, n. 4, p. 723-735, 2013.
- FAOSTAT. Statistic databases. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. 2015. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/home/E>>. Acesso em: 21 agosto 2015.
- FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos – mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 3-14, 1998.
- FIRESTONE, D. **Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes**. Champaign: AOCS, 2005.
- FREIRE, P. C. M.; MANCINI-FILHO, J.; FERREIRA, T. A. P. C. Principais alterações físico-químicas em óleos e gorduras submetidos ao processo de fritura por imersão: regulamentação e efeitos na saúde. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 353-358, 2013.
- FREGA, N.; MOZZON, M.; LERCKER, G. Effects of free fatty acids on oxidative stability oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 76, n. 3, p. 325-329, 1999.
- GARCIA, A. et al. Effect of refining on the phenolic composition of crude olive oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 83, n. 2, p. 159-164, 2006.
- GONZALEZ, C. et al. Organic constituents. In: THOMAS, O.; BURGESS, C. **Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry - UV-VIS Spectrometry of water and wastewater**. Oxford: Elsevier, 2007. v. 27, cap. 3, p. 47-88.
- GUIMARÃES, E. F. et al. Validação de metodologia analítica para a determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Produto & Produção**, Porto Alegre, v. 11, n. 1, p. 113-123, 2010.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. A. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, Londres, v. 22, n. 8, p. 475-497, 1973.
- HIRASHIMA, K. et al. Encapsulated specialty oils commercialized in São Paulo state, Brazil: evaluation of identity (fatty acid profile) and compliance of fatty acids and vitamin E contents with nutrition labeling. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 107-115, 2013.
- HOU, J. C. et al. Assessment of trans fatty acids in edible oils in China. **Food Control**, Vurrey, v. 25, n. 1, p. 211-215, 2012.
- IAL - Instituto Adolfo Lutz. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1020 p.
- IARC - International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Overall evaluation of carcinogenicity. Polynuclear Aromatic Compounds**. Lyon: IARC, 2010, v. 35.

- IARC - International Agency for Research on Cancer. **Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Overall evaluation of carcinogenicity. Chemical Agents and Related Occupations**. Lyon: IARC, 2012, v. 100F.
- INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOQ-CGRE-008**, revisão 3, fevereiro 2010. Disponível em: <www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGRE-8_03.pdf>. Acesso em: 15 setembro 2015.
- JECFA – Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **Sixty-fourth meeting, Summary and conclusions**, Rome, 2005. Disponível em: <[ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa64_summary.pdf](http://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa64_summary.pdf)>. Acesso em: 15 agosto 2015.
- JIANG, D. et al. Quantitative analysis and health risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible vegetable oils marketed in Shandong of China. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 83, p. 61-67, 2015.
- KAMAL-ELDIN, A.; YANISHLIEVA, N. Kinetic analysis of lipid oxidation data. In: KAMAL-ELDIN, A.; POKORNY, J. **Analysis of Lipid Oxidation**. Champaign: AOCS, 2005. cap. 10, p. 234-262.
- KANG, B.; LEE, B. M.; SHIN, H. S. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) content and risk assessment from edible oils in Korea. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Washington, v. 77, n. 22-24, p. 1359-1371, 2014.
- KHATTAB, R. Y.; ZEITOUN, M. A. Quality evaluation of flaxseed oil obtained by different extraction techniques. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 338-345, 2013.
- KUHNT, K. et al. Searching for health beneficial n-3 and n-6 fatty acids in plant seeds. **Europe Journal Lipid Science Technology**, Berlin, v. 114, p. 153–160, 2012.
- KUMAR, P. K. P.; KRISHNA, A. G. G. Physicochemical characteristics of commercial coconut oils produced in India. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 66, n. 1, p. 1-11, 2015.
- MANDARINO, J. M. G. **Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 40 p.
- MARINA, A. M.; CHE-MAN, Y. B.; AMIN, I. Virgin coconut oil: emerging functional food oil. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 20, n. 10, p. 481-487, 2009.
- MASOOD, A.; STARK, K. D.; SALEM, N. Jr. A simplified and efficient method for the analysis of fatty acid methyl esters suitable for large clinical studies. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 46, n. 10, p. 2299-2305, 2005.
- MEIRE, R. O.; AZEVEDO, A.; TORRES, J. P. M. Aspectos ecotoxicológicos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. **Oecologia Brasiliensis**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 188-201, 2007.
- MICHA, R.; MOZAFFARIAN, D. Saturated fat and cardiometabolic risk factors, coronary heart disease, stroke, and diabetes: a fresh look at the evidence. **Lipids**, Champaign, v. 45, n. 10, p. 893-905, 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância das Doenças Crônicas Não Transmissíveis**, agosto 2014. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/671-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/doencas-cronicas-nao-transmissiveis/14125-vigilancia-das-doencas-cronicas-nao-transmissiveis>>. Acesso em: 15 setembro 2015.
- MOLENA-FERNANDES, C. A. et al. Avaliação dos efeitos da suplementação com farinha de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) marrom e dourada sobre o perfil lipídico e a evolução

- ponderal em ratos wistar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 2, p. 201-207, 2010.
- MOORE, J. C.; SPINK, J.; LIPP, M. Development and application of a database of food ingredient fraud and economically motivated adulteration from 1980 to 2010. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 77, n. 4, p. R118-R126, 2012.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.
- MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais**. São Paulo: Varela, 1998. 150 p.
- NORRIS, L. E. et al. Comparison of dietary conjugated linoleic acid with safflower oil on body composition in obese postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 90, n. 3, p. 468-476, 2009.
- NOVELLO, D.; POLLONIO, M. A. R. Caracterização e propriedades da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e subprodutos. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 29, n. 2, p. 317-330, 2011.
- PANDEY, M. K. et al. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in commonly consumed edible oils and their likely intake in the Indian population. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 81, n. 12, p. 1131-1136, 2004.
- PERINI, J. A. L. et al. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 23, n. 6, p. 1075-1086, 2010.
- PETROVIC, M.; KEZIC, N.; BOLANCA, V. Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples. **Food Chemistry**, Barking, v. 122, n. 1, p. 285-291, 2010.
- POKORNY, J. Volumetric analysis of oxidized lipids. In: KAMAL-ELDIN, A.; POKORNY, J. **Analysis of Lipid Oxidation**. Champaign: AOCS, 2005. cap. 2, p. 8-16.
- POKORNY, J.; SCHMIDT, S.; PARKANYIOVA, J. Ultraviolet visible spectrophotometry in the analysis of lipid oxidation. In: KAMAL-ELDIN, A.; POKORNY, J. **Analysis of Lipid Oxidation**. Champaign: AOCS, 2005. cap. 3, p. 17-39.
- POPA, V. M. et al. Fatty acids composition and oil characteristics of linseed (*Linum Usitatissimum* L.) from Romania. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**. Timisoara, v. 18, n. 2, p. 136-140, 2012.
- PRESCHA, A. et al. The antioxidant activity and oxidative stability of cold-pressed oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 91, n. 8, p. 1291-1301, 2014.
- PURCARO, G. et al. Ultra-high performance liquid chromatographic method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in a passive environmental sampler. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 35, n. 8, p. 922-928, 2012.
- PURCARO, G.; MORET, S.; CONTE, L. S. Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods. **Talanta**, London, v. 105, n. 15, p. 292-305, 2013.
- RACZYK, M. et al. Physicochemical quality and oxidative stability of linseed (*Linum usitatissimum*) and camelina (*Camelina sativa*) cold-pressed oils from retail outlets. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Berlim, Early View, 2015.

- REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Deterioração de lipídios - Ranço. In: OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2010. cap. 6, p. 243-299.
- RENGARAJAN, T. et al. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Hainan, v. 5, n. 3, p. 182-189, 2015.
- ROHMAN, A.; CHE MAN, Y. B. Application of fourier transform infrared spectroscopy for authentication of functional food oils. **Applied Spectroscopy Reviews**, New York, v. 47, n. 1, p. 1-13, 2012.
- ROSZKO, M. et al. PAHs, PBDEs and pesticides in cold-pressed vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 89, n. 3, p. 389-400, 2012.
- RUIZ-RODRIGUEZ, A.; REGLERO, G.; IBÁÑEZ, E. Recent trends in the advanced analysis of bioactive fatty acids. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 51, n. 2, p. 305-326, 2010.
- SERRAINO, M.; THOMPSON, L. U. Flaxseed supplementation and early markers of colon carcinogenesis. **Cancer Letters**, Virginia, v. 63, n. 2, p. 159-165, 1992.
- SOUZA, L. M. et al. Quantification of adulterations in extra virgin flaxseed oil using MIR and PLS. **Food Chemistry**, Barking, v. 182, n. 1, p. 35-40, 2015.
- STANKOVA, B. et al. Fatty acid composition of commercially available nutrition supplements. **Czech Journal Food Science**, Praha, v. 31, n. 3, p. 241-248, 2013.
- STARK, K. D.; JUNIOR, N. S. Fast gas chromatography for the identification of fatty acid methyl esters from mammalian samples. **Lipid Technology**, Weinheim, v. 17, n. 8, p. 181-185, 2005.
- SU, Y. et al. Interaction of benzo(a)pyrene with other risk factors in hepatocellular carcinoma: a case-control study in Xiamen, China. **Annals of Epidemiology**, New York, v. 24, n. 2, p. 98-103, 2013.
- TAWFIK, M. S.; HUYGHEBAERT, A. Interaction of packaging materials and vegetable oils: oil stability. **Food Chemistry**, Barking, v. 64, n. 4, p. 451-459, 1999.
- TEIXEIRA, V. H.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. PAHs content in sunflower, soybean and virgin olive oils: evaluation in commercial samples and during refining process. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, p. 106-112, 2007.
- THODE FILHO, S. et al. Deterioração de óleos vegetais expostos a diferentes condições de armazenamento. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental (REGET)**, Santa Maria, v. 18, p. 7-13, 2014.
- TFOUNI, S. A. V. et al. Incidence of polycyclic aromatic hydrocarbons in vegetable oil blends. **Food Control**, Vurrey, v. 46, p. 539-543, 2014.
- ULBERTH, F.; BUCHGRABER, M. Authenticity of fats and oils. **European Journal Science and Technology**, Berlim, v. 102, n. 11, p. 687-694, 2000.
- VEYRAND, B. et al. Human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: results of the second french total diet study. **Environment International**, Elmsford, v. 54, p. 11-17, 2013.
- VOSOUGHKIA, M. et al. Evaluation of oil content and fatty acid composition in seeds of different genotypes of safflower (*Carthamus tinctorius* L.). **International Journal of Agricultural Science Research**, Nigeria, v. 2, n. 1, p. 59-66, 2011.

CURRÍCULO LATTES

Simone Alves da Silva

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/5403607317380174>
Última atualização do currículo em 31/08/2015

Possui graduação em Engenharia Química pela Faculdade de Engenharia Química de Lorena (2003), licenciatura em Química pela Universidade de São Paulo (2009) e especialização em Vigilância Sanitária de Alimentos pela Universidade de São Paulo (2012). Atualmente é Pesquisador Científico do Instituto Adolfo Lutz e mestranda em Nutrição em Saúde Pública na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Bromatologia, atuando principalmente nos seguintes temas: análise de alimentos utilizando cromatografia gasosa e líquida; análise de contaminantes orgânicos em alimentos; composição de ácidos graxos em óleos, gorduras e alimentos; composição centesimal e informação nutricional de alimentos e bebidas. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Simone Alves da Silva
Nome em citações bibliográficas SILVA, S. A.; SILVA, SIMONE ALVES DA; DA SILVA, SIMONE ALVES

Endereço

Endereço Profissional Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química.
Avenida Dr. Arnaldo, nº 355
Cerroqueira Cesar
01246902 - São Paulo, SP - Brasil - Caixa-postal: 1783
Telefone: (11) 30682921
Fax: (11) 30853505
URL da Homepage: www.ial.sp.gov.br

Formação acadêmica/titulação

2013 Mestrado em andamento em andamento - Programa: Nutrição em Saúde Pública.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Óleos vegetais extraídos a frio: avaliação das características de identidade e qualidade e da ocorrência de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, Orientador: Elizabeth Aparecida Ferraz de Silva Torres.

2011 - 2012 Especialização em Vigilância Sanitária de Alimentos. (Carga horária: 500h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Teores de ácidos graxos trans em alimentos industrializados consumidos no Brasil.

2005 - 2009 Graduação em Química.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

1998 - 2003 Graduação em Engenharia Química.
Faculdade de Engenharia Química de Lorena, FAENQUIL, Brasil.

Formação Complementar

2011 - 2011 Validação de métodos de ensaios. (Carga horária: 16h).
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, INMETRO, Brasil.

2011 - 2011 Produção e caracterização de mat. de referência. (Carga horária: 16h).
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, INMETRO, Brasil.

2010 - 2010 Incerteza de medição. (Carga horária: 20h).
Fundação CERTI, CERTI, Brasil.

2009 - 2009 Elaboração de projetos de pesquisa: noções. (Carga horária: 10h).
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Brasil.

2008 - 2008 Cromatografia gasosa. (Carga horária: 16h).
Perkin-Elmer Corporation, P.E.C., Estados Unidos.

2004 - 2004 Capacitação em biossegurança laboratorial. (Carga horária: 20h).
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Brasil.

2004 - 2004 Interpretação e implementação da NBR ISO/IEC 17025. (Carga horária: 8h).
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Brasil.

Atuação Profissional

Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres

Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 2 - CA AL - Ciência e Tecnologia de Alimentos

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9304623403746874>

Última atualização do currículo em 31/08/2015

Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres concluiu o Doutorado em Ciência dos Alimentos (São Paulo, SP) pela Universidade de São Paulo, em 1988. Foi Visiting Scholar na MSU de 1986 a 1987, como bolsista Fulbright Commission. Professora Associada - desde 2000 na Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Associado 3 desde 2013. Publicou 92 artigos em periódicos especializados e 126 trabalhos em anais de eventos. Possui 5 livros publicados, 1 processo, 1 software e 1 patente técnica além de outros 30 itens de produção técnica. Participou de 17 eventos no exterior e 87 no Brasil. Supervisionou 3 pós-doutores com bolsa da FAPESP e supervisionou um Jovem Pesquisador com auxílio e bolsa da FAPESP. Orientou 25 dissertações de Mestrado, 16 teses de Doutorado e co-orientou 1 tese de Doutorado, em complemento orientou 24 trabalhos de Iniciação Científica nas áreas de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Nutrição e Saúde Coletiva. Vários AT foram treinados. Recebeu 6 Prêmios/Homenagens. Atua diretamente na área de Ciência e Tecnologia de Alimentos com ênfase em quatro linhas de pesquisa: 1) Lipídios, ácidos graxos, colesterol, fitosterol e seus produtos de oxidação. 2) Antioxidantes e substâncias bioativas. 3) Carnes, Aves e Pescados 4) Microsomas, Lipossomos e Sistemas Modelo. Em suas atividades profissionais, interagiu com 165 colaboradores em co-autorias de trabalhos científicos. Em seu CV/Lattes, os termos mais frequentes na contextualização da produção científica, tecnológica e artístico cultural, são: aulas ministradas, comissões, grupos de trabalho, valor nutricional, segurança alimentar, lipídios, qualidade higiênico sanitária, substitutos de gordura, alimentos funcionais e tecnologia de alimentos. Em 25/04/2015 apresentou fator H=13 na base SCOPUS - ID 243086900 e ResearchGate https://www.researchgate.net/profile/Elizabeth_Torres3/reputation 29,27 em 31/08/2015. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres
Nome em citações bibliográficas	TORRES, E. A. F. S.; Torres, Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva; Torres, Elizabeth A. F. S.; Elizabeth Aparecida F.S. Torres; Torres, Elizabeth Aparecida F.S.; Elizabeth A. F. da S. Torres; TORRES, ELIZABETH A. F. DA S.

Endereço

Endereço Profissional	Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Departamento de Nutrição. Av. Dr. Arnaldo, 715 HNT Cerqueira César 01246-904 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 30617857 Fax: (11) 30617130 URL da Homepage: www.fsp.usp.br/~eatorres/
------------------------------	---

Formação acadêmica/titulação

1984 - 1988	Doutorado em Ciências dos Alimentos (Conceto CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: OXIDACAO LIPIDICA EM CHARQUE., Ano de obtenção: 1988. Orientador: MASSAMI SHIMOKAWA - PhD. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: Charque; lipídios. Grande área: Ciências Agrárias Setores de atividade: Nutrição e Alimentação.
1984 - 1987	Doutorado em Ciências dos Alimentos (Conceto CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: OXIDACAO LIPIDICA E DESCOLOACAO EM CARNES., Ano de obtenção: 1988. Orientador: MASSAMI SHIMOKAWA - PhD. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: Antioxidantes; Carnes; Charque; lipídios; Medicina Ortomolecular; Oxidação. Grande área: Ciências Agrárias Setores de atividade: Nutrição e Alimentação.
1980 - 1982	Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos (Conceto CAPES 3). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil. Título: INFLUENCIA DA MACERACAO E COZIMENTO NA QUALIDADE DE SOJA (GLYCINE MAX), Ano de Obtenção: 1982. Orientador: CARLOS ALBERTO BENTO DA SILVA - PhD. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil. Palavras-chave: Maceração; Soja; Pesquisa e desenvolvimento de alimentos; Cozido; Sal; Enlatamento de vegetais. Grande área: Ciências Agrárias Setores de atividade: Nutrição e Alimentação.
1976 - 1979	Graduação em Engenharia Agrônoma. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Pós-doutorado e Livre-docência

2000	Livre-docência. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Teor de Lipídios em Alimentos e sua Importância na Nutrição, Ano de obtenção: 2000. Palavras-chave: CS2; dieta aterogênica; teor de lipídios; Índice de Colesterol; PCA. Grande área: Ciências Agrárias Setores de atividade: Nutrição e Alimentação.
1988 - 1990	Pós-Doutorado. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Grande área: Ciências Agrárias