



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

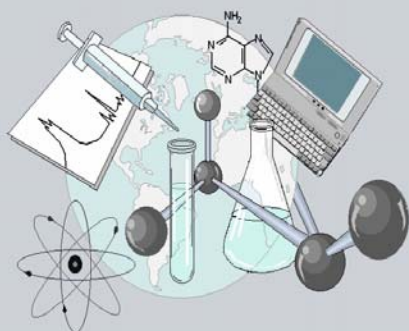
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS METODOLÓGICOS PARA A  
DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS *TRANS* EM ALIMENTOS  
POR CROMATOGRAFIA GASOSA**

Tese apresentada por  
**Clayton Antunes Martin** ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Química do Departamento de  
Química do Centro de Ciências  
Exatas da Universidade Estadual de  
Maringá como parte dos requisitos  
para a obtenção do título de Doutor  
em Ciências.

EE  
CC



Centro de  
Ciências Exatas

MARINGÁ, AGOSTO/2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Otimização de parâmetros metodológicos para a  
determinação de ácidos graxos *trans* em alimentos  
por cromatografia gasosa**

**Clayton Antunes Martin**

Tese para obtenção do grau de Doutor

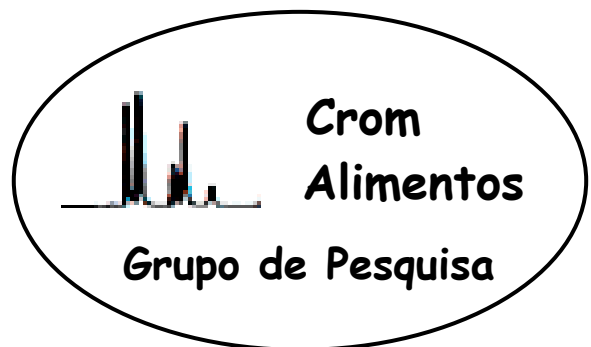
Orientador: Prof. Dr. Nilson Evelázio de Souza

**MARINGÁ**

**2006**

# LINHA DE PESQUISA

## QUÍMICA DE ALIMENTOS



**“Sejamos como pássaro pousado por um instante no ramo mais frágil da árvore, que sente tremer o galho, e que no entanto canta, porque sabe que tem asas.”**

**(Sully Prud Home)**

**“A sabedoria é a coisa principal; adquiere pois a sabedoria; sim, com tudo o que possues adquiere o conhecimento”.**

**(Provérbios 4:7)**

**“O argumento mesmo quando seja irrespondível pode só provocar oposição; mas o exemplo piedoso tem um poder que é impossível resistir completamente”.**

**(Ellen G. White)**

**Ofereço e dedico a minha esposa Josiane que participou de todos os momentos deste trabalho, e aos meus pais Mário e Cenira que sempre me incentivaram e me apoiaram nesta jornada**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar saúde, coragem, paciência, persistência e esperança, ao enfrentar este desafio.

A Josiane, minha querida esposa, que não mediu esforços para me apoiar, mesmo diante de momentos de desânimo, em que o mau humor era visível.

Aos meus pais, Mário e Cenira, que embora distantes, foram uma fonte de inspiração, sempre procurando estar a par de cada etapa.

Ao Departamento de Química, especialmente ao Programa de Pós-graduação, pelos conhecimentos adquiridos neste curso.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Nilson Evelázio de Souza pela orientação, oportunidade de crescimento profissional, confiança depositada e, sobretudo pelo exemplo de coragem ante aos desafios da vida.

Ao Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer pela amizade, sugestões no trabalho, por compartilhar seus conhecimentos, e principalmente pelo incentivo ante as dificuldades.

Ao Prof. Dr. Makoto Matsushita pela amizade, por sua prestatividade ao providenciar os artigos e pelo auxílio na operação do cromatógrafo.

Ao Prof. Dr. Cláudio Celestino de Oliveira pelas sugestões na elaboração de artigos e pela revisão da tradução para o inglês.

Ao Prof. Ms. Expedito Leite Silva pela amizade, sugestões no trabalho e auxílio na interpretação dos espectros de RMN.

Ao Prof. Dr. Jorge Nozaki (*in memoriam*) por seu incentivo e sua disposição em contribuir com o trabalho.

As Profas. Dra. Sandra e Dra. Helena pela oportunidade de convivência e pelo empréstimo de livros.

Ao técnico Dirceu Batista de Souza pela amizade e cooperação no decorrer do trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Extensão, André, Airton e Ari pelo empréstimo de materiais e reagentes.

Ao técnico Moacyr pela sua prestatividade ao preparar as placas para a cromatografia de camada delgada.

As técnicas, Ivânia e Ana, pela obtenção dos espectros.

Aos colegas de pós-graduação que já concluíram: Augusto, Débora, Flávia, Marcos, Nilson e Roseli, pela oportunidade de convívio e também de aprendizado.

Aos colegas de pós-graduação que ainda estão na labuta: Adriana, Ailey, Cristina, Ivane, Ricardo, Rúbia, Vanessa e Walber, levarei a saudade de todos vocês.

E a todos cujos os nomes não foram citados, mas que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	IX
LISTA DE TABELAS .....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	XII
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT .....	XV
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1 Características gerais dos ácidos graxos <i>trans</i> .....	3
2.2 A formação de ácidos graxos <i>trans</i> .....	4
2.2.1 Processo de hidrogenação de óleos vegetais .....	4
2.2.3 Processamento de óleos vegetais .....	9
2.2.3 Preparo de alimentos fritos .....	11
2.2.4 A irradiação de alimentos .....	13
2.2.5 A bio-hidrogenação.....	15
2.3 Ácidos graxos <i>trans</i> e a saúde humana .....	16
2.4 Análise dos ácidos graxos <i>trans</i> em alimentos .....	20
2.5 Ocorrência natural de ácidos graxos <i>trans</i> .....	25
3. OBJETIVOS .....	29
3.1 Objetivo geral .....	29
3.2 Objetivos específicos .....	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Preparação de isômeros geométricos do ácido alfa-linolênico .....	28
4.1.1 Isomerização do óleo de linhaça .....	28



4.1.2	Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos.....	28
4.1.3	Purificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos.....	29
4.1.4	Preparação de ésteres iso-propílicos de ácidos graxos.....	29
4.2	Identificação dos ésteres de ácidos graxos e confirmação da isomerização .....	30
4.2.1	Análise cromatográfica dos ésteres de ácidos graxos .....	30
4.2.2	Análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos por espectrofotometria no infravermelho .....	30
4.2.3	Análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos por RMN de <sup>13</sup> C .....	31
4.3	Preparação de isômeros geométricos dos ácidos 18:1 6 <i>c</i> e 18:1 12 <i>c</i> .....	31
4.4	Confirmação da isomerização do ácido 18:1 6 <i>c</i> por RMN <sup>13</sup> C .....	32
4.5	Separação de ácidos octadecenóicos <i>cis</i> e <i>trans</i> por CCD/Ag <sup>+</sup> .....	32
4.6	Otimização das condições de análise de AGTP para a coluna CP Sil-88.....	33
4.7	Otimização das condições de análise de AGTM e AGTP para a coluna CP Select CB -FAME .....	33
4.8	Quantificação de AGTP em óleo de soja refinado .....	34
4.8.1	Amostragem .....	34
4.8.2	Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos.....	34
4.8.3	Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos .....	35
4.8.4	Quantificação .....	35
4.8.5	Determinação do grau de isomerização do ácido alfa-linolênico .....	38
4.8.6	Análise Estatística.....	38
4.9	Quantificação de AGTM e AGTP em gorduras parcialmente hidrogenadas .....	38
4.9.1	Obtenção das amostras .....	38
4.9.2	Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos.....	38
4.9.3	Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos .....	39
4.9.4	Quantificação .....	39

4.9.5 Análise Estatística.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Identificação dos ésteres de ácidos graxos e confirmação da isomerização.....	41
5.2 Confirmação da isomerização do ácido 18:1 6c por RMN <sup>13</sup> C.....	44
5.3 Otimização das condições para a análise cromatográfica de AGTP empregando a coluna CP Sil-88.....	45
5.4 Otimização das condições para a análise cromatográfica de AGTM e AGTP empregando a coluna CP Select CB-FAME.....	48
5.5 Desenvolvimento de sistema para diferenciação entre ácidos graxos octadecenóicos <i>cis</i> e <i>trans</i> .....	51
5.6 Quantificação de AGTP em óleo de soja refinado.....	52
5.7 Quantificação de AGTM e AGTP em gorduras parcialmente hidrogenadas.....	57
6. CONCLUSÕES.....	64
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	66
8. ANEXOS.....	79

## LISTA DE FIGURAS

1. Efeito da configuração da insaturação sobre o ponto de fusão do ácido graxo .....	3
2. Mecanismo de formação de isômeros geométricos e posicionais no processo de hidrogenação. ....	8
3. Efeito da temperatura e do tempo de desodorização sobre a formação de: (a) AGT 18:2 e (b) AGT 18:3 (dados obtidos por Wolff, 1993). ....	10
4. Efeito da temperatura e do tempo de aquecimento sobre a formação de AGT durante o aquecimento do óleo de girassol. ....	12
5. Teores de AGTM em função do tempo de aquecimento do óleo de soja.....	13
6. Efeito da dose de radiação sobre o teor de AGT em carne bovina.....	14
7. Obtenção do ácidos 18:1 11 <i>t</i> e 18:1 10 <i>t</i> em ruminantes a partir dos ácidos linoléico, alfa-linolênico e gama-linolênico. ....	15
8. Estrutura da fase estacionária de algumas colunas utilizadas na análise de AGT: (a) OV-275; (b) BPX-70; (c) CP-Sil 88. ....	21
9. Comparação dos valores de ECL obtidos no presente estudo e por Wolff (1992b) para ésteres metílicos do ácido alfa-linolênico e seus isômeros geométricos. ....	41
10. Comparação dos valores de ECL obtidos neste estudo e por Wolff (1992b) para ésteres isopropílicos do ácido alfa-linolênico e seus isômeros geométricos. ....	42
11. Espectros no infravermelho dos ésteres metílicos do óleo de linhaça: (a) não isomerizado e (b) isomerizado. ....	42
12. Espectros de RMN <sup>13</sup> C dos ésteres metílicos do óleo de linhaça: (a) não isomerizado e (b) isomerizado. ....	43
13. Espectros de RMN <sup>13</sup> C de ésteres metílicos dos ácidos graxos da salsinha: (a) não isomerizada e (b) isomerizada.....	44

14. Valores de ECL em função da temperatura obtidos para ésteres metílicos dos ácidos araquídico, gondóico, alfa-linolênico e seus isômeros geométricos. ....	46
15. Valores de ECL em função da temperatura obtidos para ésteres metílicos do ácido linoléico e seus isômeros geométricos. ....	46
16. Efeito da temperatura de análise sobre as diferenças de ECL para ésteres metílicos de ácidos graxos que poderiam coeluir. ....	47
17. Valores de ECL em função da temperatura para ésteres metílicos de ácidos graxos octadecenóicos <i>cis</i> e <i>trans</i> . ....	48
18. Valores de ECL do ácido linoléico e de seus isômeros geométricos em função da temperatura. ....	49
19. Valores de ECL em função da temperatura para os ésteres metílicos do ácido alfa-linolênico e seus isômeros geométricos. ....	50
20. Efeito da temperatura de análise sobre as diferenças de ECL para ésteres metílicos de ácidos graxos com possibilidade de coeluição. ....	51
21. Sistema para discriminação entre ácidos octadecenóicos <i>cis</i> e <i>trans</i> . ....	52
22. Curvas empregadas na avaliação do fator de resposta do instrumento para o araquidato de metila. ....	54
23. Curvas empregadas na avaliação do fator de resposta do instrumento para o elaidato de metila. ....	59

## LISTA DE TABELAS

1. Ocorrência de AGT em algumas espécies vegetais.....	25
2. Ocorrência de AGT em alimentos provenientes de espécies animais. ....	26
3. Deslocamentos químicos de ésteres metílicos dos ácidos graxos da salsinha isomerizada e não-isomerizada analisados por RMN <sup>13</sup> C.....	45
4. Coeficiente angular das curvas de ECL para ésteres octadecenóicos.....	52
5. Valores do fator de resposta para ésteres metílicos dos ácidos araquídico, behênico, linoléico e alfa-linolênico, em relação ao tricosanoato de metila. ....	53
6. Coeficientes da regressão linear e fatores de resposta para as curvas de calibração do araquidato de metila.....	54
7. Concentrações de ácido araquídico envolvidas no teste de recuperação. ....	55
8. Concentrações de ácidos graxos <i>trans</i> poliinsaturados em óleo de soja refinado.....	56
9. Valores do fator de resposta para ésteres metílicos ácidos elaídico, linoléico, alfa-linolênico, araquídico, heneicosanóico e behênico, em relação ao tricosanoato de metila. ....	58
10. Coeficientes da regressão linear das curvas e o seus fatores de resposta para as curvas de calibração do elaidato de metila. ....	59
11. Concentrações de elaidato de metila envolvidas no teste de recuperação. ....	60
12. Concentrações do ácido 18:1 13 <i>t</i> envolvidas no teste de recuperação. ....	60
13. Concentração dos AGT 18:1 e 18:2 nas gorduras hidrogenadas.....	61
14. Concentração dos AGT 18:3 e somatórias entre os AGT em gorduras hidrogenadas.....	62

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGT – ácidos graxos *trans*

AGTM - ácidos graxos *trans* monoinsaturados

AGTP – ácidos graxos *trans* poliinsaturados

CCD/Ag<sup>+</sup> - cromatografia de camada delgada impregnada com nitrato de prata

CLA – (conjugated linoleic acid) - ácido linoléico conjugado

CLAE/Ag<sup>+</sup> - cromatografia líquida de alta eficiência associada ao íon prata

ECL – (equivalent chain length) - comprimento equivalente da cadeia

GI – grau de isomerização

HDL – (high density lipoprotein) - lipoproteína de alta densidade

II – índice de iodo

IgG – imunoglobulina da classe G

LDL – (low density lipoprotein) - lipoproteína de baixa densidade

Lp[a] – lipoproteína a

Rf – (retention front) - fator de retenção

RMN <sup>13</sup>C - ressonância magnética nuclear de carbono 13.

## RESUMO

Nos alimentos presentes na dieta humana são encontrados tanto ácidos graxos *trans* monoinsaturados (AGTM) como ácidos graxos *trans* poliinsaturados (AGTP). A ingestão elevada de AGTM tem sido associada principalmente com o aumento do risco de doenças cardiovasculares, o que torna necessário a sua restrição na dieta. Neste estudo foi efetuada a otimização das condições para a determinação de AGTP em óleos vegetais refinados, por meio de análise por cromatografia gasosa com a coluna CP Sil-88 (50 m). Também foi realizada a otimização para a quantificação de AGTM e AGTP em gorduras hidrogenadas, empregando a coluna CP Select CB-FAME (100 m). Inicialmente foi feita a isomerização do óleo de linhaça, que foi confirmada por análises espectroscópicas no infravermelho e por ressonância magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$ . Os ésteres de ácidos graxos desta mistura foram identificados a partir dos valores do comprimento equivalente da cadeia (ECL) descritos na literatura para a coluna CP Sil-88, sendo utilizados para a determinação de seus ECL em temperaturas entre 155 °C e 200 °C. A temperatura estabelecida para a análise dos AGTP em óleos vegetais foi de 170 °C, sendo determinada com base na regressão linear das diferenças de ECL entre os ésteres metílicos de ácidos graxos que poderiam coeluir neste intervalo de temperatura. Para a determinação de AGTM e AGTP em gorduras hidrogenadas, foram inicialmente separados por cromatografia de camada delgada impregnada com nitrato de prata, ésteres metílicos de ácidos graxos octadecenóicos *cis* e *trans*. Estas misturas, mais alguns padrões de ésteres metílicos de ácidos octadecenóicos e os ésteres metílicos do óleo de linhaça isomerizado, foram empregados na determinação dos valores de ECL para os ésteres metílicos dos ácidos 18:1 (155 °C a 200 °C), 18:2 e 18:3 (170 °C a 200 °C) em diferentes temperaturas. A partir das diferenças de ECL entre os ésteres de ácidos graxos que poderiam coeluir no intervalo de 170 °C a 200 °C, foi estabelecida a temperatura de análise que foi de 197 °C. A quantificação de AGTP em óleo de soja foi efetuada em relação ao tricosanoato de metila, sendo avaliadas cinco marcas. A concentração total de AGTP variou de 5,8 a 30,2 mg g<sup>-1</sup> de óleo, e as concentrações de AGTP 18:2 e 18:3 variaram de 1,9 a 14,0 mg g<sup>-1</sup>, e de 3,9 a 16,3 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente. Ao estimar a exatidão da quantificação dos AGTP mediante a adição de ácido araquídico ao óleo, foi obtido o valor de 102,6%.

Os AGTP e AGTM presentes em gorduras hidrogenadas foram quantificados utilizando o tricosanoato de metila como padrão interno. Nas treze amostras analisadas, a concentração total de AGT variou de 23,5 a 323,6 mg g<sup>-1</sup>, sendo que as concentrações de AGTM e AGTP variaram de 1,2 a 233,8 mg g<sup>-1</sup> e de 9,4 a 89,8 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente. A exatidão foi estimada por meio da avaliação da recuperação realizada com o ácido 18:1 13*t* e o elaidato de metila, cujos os valores foram de 98,7% e 100,6%, respectivamente. A utilização dos valores de ECL se mostrou muito apropriada para a otimização da temperatura de análise, possibilitando a determinação simultânea de AGTM e AGTP em gorduras parcialmente hidrogenadas.

*Palavras-chave:* ácidos graxos *trans*, otimização, comprimento equivalente da cadeia, quantificação, gorduras parcialmente hidrogenadas, óleo de soja.



## ABSTRACT

Foods of the human diet contain both *trans* monounsaturated fatty acids (TMFA) and *trans* polyunsaturated fatty acids (TPFA). High intake of TMFA have been mainly associated with the increase in risk of coronary heart disease. Thus it is necessary to limit their presence in daily diet. In this study was carried out the optimization of the conditions for determination of TPFA in refined vegetable oils, by gas chromatography, using CP Sil-88 column (50 m). Also it was made the optimization of the chromatographic conditions for quantitation of TMFA and TPFA in partially hydrogenated fats, using CP Select CB-FAME column (100 m). Initially was made the isomerization of linseed oil that was confirmed by spectroscopic analysis in infrared and nuclear magnetic resonance  $^{13}\text{C}$ . Fatty acid esters of this mixture were identified with basis on the equivalent chain length (ECL) values related in literature for CP Sil-88 column, being then used for determination of its ECL in the temperatures between 155 °C and 200 °C. Temperature for analysis of the TPFA in vegetable oils was 170 °C. It was determined with basis in linear regression of the ECL difference between fatty acids methyl ester that could to coelute in this temperature range. For determination of TMFA and TPFA in shortenings, *cis* and *trans* octadecenoic fatty acid methyl esters were separated by argentation thin-layer chromatography. These mixtures and octadecenoic fatty acids methyl esters standard and methyl esters of isomerized linseed oil, were used in the determination of the ECL values for fatty acid methyl esters 18:1 (155 °C to 200 °C), 18:2 and 18:3 (170 °C to 200 °C) in different temperatures. Through of the ECL difference between fatty acids methyl esters that could to coelute in the temperatures between 170 °C to 200 °C, it was established the temperature of 197°C for analysis. Quantitation of TPFA in soybean oil was relative to the internal standard methyl tricosanoate, being evaluated five brands. The total concentration of TPFA ranged from 5.8 to 30.2 mg g<sup>-1</sup> of oil. TPFA 18:2 and 18:3 ranged from 1.9 to 14.0 mg g<sup>-1</sup> and 3.9 to 16.3 mg g<sup>-1</sup>, respectively. Accuracy of the TPFA quantitation was estimated by standard addition of the araquidic acid, being the average recovery of 102.6%. TMFA and TPFA contained in shortenings were quantified in relation to the methyl tricosanoate. In the thirteen brands analyzed the total concentration of TFA ranged from 23.5 to 323.6 mg g<sup>-1</sup>. TMFA and TPFA ranged from 1.2 to 233.8 mg g<sup>-1</sup> and 9.4 to 89.8

mg g<sup>-1</sup>, respectively. Accuracy of the TPFA quantitation was estimated by standard addition of the 18:1 13*t* acid and methyl elaidate, being the average recovery of 98.7% and 100.6%, respectively. The application of the ECL values in the optimization of the analysis temperature was very appropriate, making possible the simultaneous determination of the TMFA and TPFA in partially hydrogenated fats.

*Key words:* *trans* fatty acids, optimization, equivalent chain length, quantitation, partially hydrogenated fats, soybean oil.

## 1. INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos exercem uma função singular na nutrição humana, não apenas por proverem a maior quantidade de energia por grama, mas principalmente por não sofrerem alteração em sua estrutura durante a digestão, sendo absorvidos na forma como são ingeridos. Em consequência, a composição de ácidos graxos no organismo humano será reflexo da composição de óleos e gorduras presentes na dieta.

Nas últimas décadas houve uma crescente compreensão das funções dos lipídios no metabolismo humano, propiciando o esclarecimento de suas relações para o desenvolvimento da saúde e também da doença. Assim, a importância da ingestão de ácidos graxos  $\omega$ -3, a redução de ácidos graxos saturados na dieta, e mais recentemente, a diminuição da ingestão de ácidos graxos *trans*, tem sido enfatizados. Esta condição tem direcionado modificações nos processos de produção de óleos e gorduras utilizados no preparo de alimentos.

Contudo, este progresso não pode ser dissociado do surgimento e aprimoramento da cromatografia em fase gasosa, técnica que desde a sua origem no início da década de 1950, tem sido indispensável para o estudo de misturas complexas de ácidos graxos (Ackman, 2002). Com a introdução, no final da década de 1970 de suportes para colunas cromatográficas constituídos de sílica fundida, e subsequentemente com o intenso desenvolvimento de fases estacionárias líquidas, a utilização de colunas capilares tornou-se cada vez mais comum (Barry, 1995).

Estes avanços tiveram um grande impacto no estudo dos ácidos graxos, contribuindo, entre outros aspectos, para a investigação mais detalhada sobre a formação de isômeros posicionais e geométricos no processo de hidrogenação parcial de óleos vegetais e marinhos. Paralelamente a isto, foi despertado o interesse em avaliar os efeitos e as rotas metabólicas que os ácidos graxos *trans* seguem no organismo, sendo também estudados outros processos que contribuem para elevar a ingestão diária destes ácidos.

Esta tese apresenta uma breve revisão bibliográfica em que são abordados os processos de formação dos ácidos graxos *trans* contidos nos alimentos, as principais implicações à saúde decorrentes da ingestão elevada destes ácidos, as técnicas que tem sido utilizadas na sua análise e a ocorrência em algumas espécies

vegetais e animais. A parte experimental envolve a otimização da metodologia para quantificação de ácidos graxos *trans* poliinsaturados (AGTP) em óleos refinados, por meio de análise por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama, empregando a coluna CP Sil-88. Também é efetuada a otimização para a determinação de ácidos graxos *trans* monoinsaturados (AGTM) e AGTP em gorduras parcialmente hidrogenadas, empregando a coluna CP Select CB-FAME.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Características gerais dos ácidos graxos *trans*

A presença de insaturações na configuração *trans* resulta em um ângulo de ligação menor do que o observado quando as duplas ligações estão na forma *cis*. Esta diferença surge devido à disposição dos substituintes alquila da dupla ligação, que na configuração *cis* encontram-se do mesmo lado, interferindo efetivamente um com o outro e criando uma tensão estérica que aumenta o ângulo de ligação e a energia livre da molécula. Na configuração *trans* esta interferência torna-se menor, pois os substituintes alquila encontram-se em lados opostos (Allinger *et al.*, 1978).

A ocorrência de insaturações *trans* nos ácidos graxos promove um aumento na linearidade da cadeia carbônica, favorecendo a ocorrência de interações intermoleculares, que tornam as suas propriedades físicas mais semelhantes à dos ácidos graxos saturados. Em consequência, há um aumento no ponto de fusão, quando uma insaturação *cis* é convertida em *trans* (Figura 1).

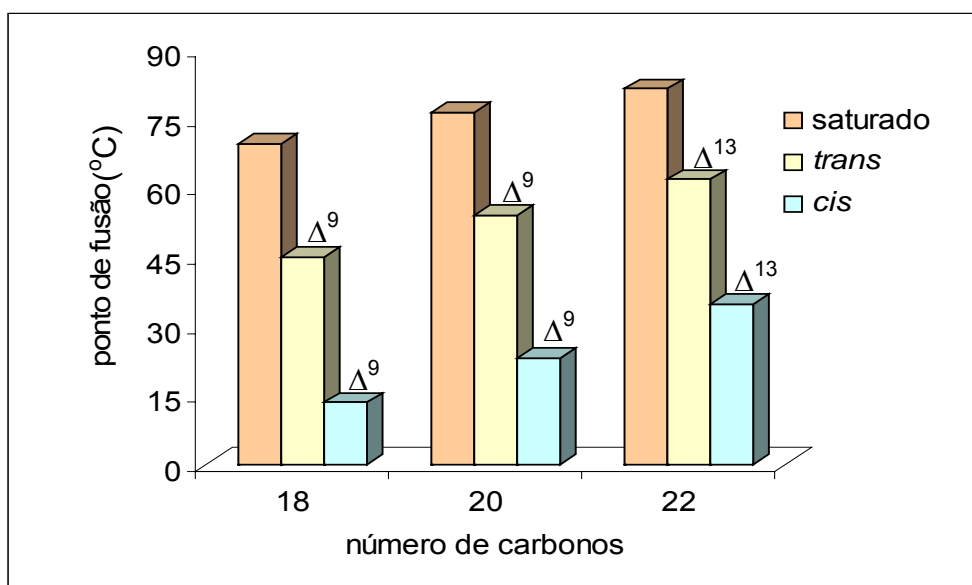


Figura 1: Efeito da configuração da insaturação sobre o ponto de fusão do ácido graxo (fonte: Ackman, 1998; Cyberlipid, 2006)

Embora as duplas ligações presentes nos ácidos graxos possam ter a configuração *cis* ou *trans*, nos reinos vegetal e animal a ocorrência de insaturações

na forma *cis* é quase exclusiva para a maioria das espécies (Sommerfeld, 1983). Este comportamento, aparentemente contraditório sob o ponto de vista energético, pode ser melhor compreendido ao considerar os ácidos graxos como importantes constituintes das membranas das células.

Nas membranas, a presença de ácidos graxos com insaturações *cis* resulta na diminuição do ponto de fusão dos fosfolípidios. Além disso, estes ácidos apresentam uma maior variedade de conformações moleculares que os seus correspondentes *trans*, sendo possível inclusive a ocorrência de formas circulares. Estas diferenças tem um efeito significativo sobre a fluidez das membranas, contribuindo para aumentar a sua superfície e diminuir a sua espessura (Brenner, 1984).

Os ácidos graxos que apresentam uma ou mais insaturações com a configuração *trans*, são denominados ácidos graxos *trans* (AGT). A esta classe pertencem os ácidos graxos *trans* monoinsaturados (AGTM), grupo de ácidos graxos que possuem apenas uma insaturação, tendo necessariamente a forma *trans*. Também abrange os ácidos graxos *trans* poliinsaturados (AGTP), que semelhantemente aos seus correspondentes *cis*, contém duas ou mais insaturações, podendo todas ter a configuração *trans* (Dutton, 1979; Wolff, 1992a).

## **2.2 A formação de ácidos graxos *trans***

### **2.2.1 Processo de hidrogenação de óleos vegetais**

A produção de substitutos para a manteiga iniciou na Europa, na metade do século XIX, motivada principalmente pelo seu alto preço. A pedido de Napoleão Bonaparte, foi produzido pelo químico francês Mege Mouries, em 1869, um substituto aceitável para a manteiga. Este produto era constituído de uma fração de sebo bovino e apresentava boa consistência, proporcionando o derretimento na boca, o que contribuiu para a aceitação pelo mercado consumidor. Nos anos subsequentes a banha também passou a ser empregada para o desenvolvimento de substitutos para a manteiga (Ghotra *et al.*, 2002).

Com o aumento da demanda mundial por gorduras nas últimas décadas do século XIX, a atenção foi direcionada para o desenvolvimento de novos produtos que diminuíssem o uso do sebo e da banha. Assim, em 1873, nos Estados Unidos,

foi produzido por Roudebush um produto que combinava o sebo bovino com o óleo de semente de algodão, preparado através do aquecimento com leite fresco (Ghotra *et al.*, 2002).

A descoberta em 1893, que os óleos poderiam ser desodorizados através da aplicação do vapor de água a alta temperatura e subseqüentemente, que a desodorização à pressão reduzida melhorava o odor e também o sabor do óleo, ampliou o uso do óleo de semente de algodão (Shreve & Brink, 1997).

Em 1897, os químicos franceses Sabatier e Senderens descobriram, ao estudar a catálise na hidrogenação, que a diferença na consistência dos óleos vegetais e da manteiga, do sebo e da banha era devido a menor quantidade de átomos de hidrogênio presente nos óleos. Esta descoberta foi baseada na aplicação do níquel como catalisador, e possibilitou o desenvolvimento do processo de produção de gorduras a partir de óleos vegetais e marinhos (Gustone, 1998).

O processo de hidrogenação teve a sua primeira aplicação industrial em 1903, na Inglaterra, quando foram preparadas gorduras a partir do óleo de cachalote. Em 1909, o processo passou a ser empregado na produção de substitutos para o sebo, cuja escassez comprometia a preparação de sabões (Johnson, 1998). Nos anos seguintes começaram a ser produzidas na Europa e nos Estados Unidos, gorduras hidrogenadas e margarinas, provenientes dos óleos de algodão e soja (Shurtleff & Aoyagi, 2004).

A partir da década de 1930, a indústria de hidrogenação teve um crescimento extraordinário, resultante do aumento no consumo de margarinas e gorduras hidrogenadas, durante a segunda guerra mundial (Shurtleff & Aoyagi, 2004). Contudo, até 1940 a margarina era vista como um substituto inferior da manteiga. Em 1941, o Food and Drug Administration (FDA) publicou nos Estados Unidos, um relatório que conferiu a margarina um *status* semelhante ao da manteiga (Ghotra *et al.*, 2002).

No final da década de 1950 foi descoberto, por pesquisadores do Northern Regional Research Center (EUA), que o ácido alfa-linolênico (18:3 9c,12c,15c) estava relacionado com a formação de odores desagradáveis durante o preparo de alimentos fritos empregando o óleo de soja. Assim, foi proposto o desenvolvimento de uma hidrogenação seletiva, como alternativa para diminuir a quantidade deste ácido graxo no óleo de soja (Gray & Russell, 1979). Esta estratégia deu origem a hidrogenação *light*, na qual a quantidade de alfa-linolênico é reduzida a cerca de 3%

do total de ácidos graxos do óleo, e ampliou as possibilidades para a produção de gorduras com características específicas (Ackman & Mag, 1998).

No Brasil, a indústria de hidrogenação surgiu no final da década de 1950, produzindo inicialmente gordura hidrogenada e margarina dura. A partir de 1970, começaram a ser produzidas margarinas cremosas, por meio da mistura de gorduras hidrogenadas com diferentes pontos de fusão. Com o aperfeiçoamento do processo de hidrogenação, através do desenvolvimento da hidrogenação seletiva, tornou-se possível a produção de gorduras cada vez mais específicas, ampliando a sua utilização na produção de alimentos. Esta condição resultou na substituição quase completa das gorduras animais na dieta da população brasileira (Pelaez-Alvarez *et al.*, 1991).

O processo de hidrogenação baseia-se na reação dos ácidos graxos insaturados de um óleo vegetal ou marinho, com hidrogênio, na presença de um catalisador, que geralmente é o níquel. Seu objetivo é aumentar a estabilidade oxidativa dos óleos, mediante a diminuição da concentração dos ácidos graxos mais insaturados e alterar as suas propriedades físicas, ampliando as suas aplicações.

A reação de hidrogenação depende principalmente da temperatura do óleo, da pressão de hidrogênio, da velocidade de agitação, do tempo, da concentração e da espécie de catalisador. Conforme as condições empregadas durante o processo, a hidrogenação é classificada como: parcial ou total e seletiva ou não-seletiva.

A seletividade está relacionada com a hidrogenação preferencial dos ácidos graxos mais insaturados, que resulta na menor formação possível de ácidos graxos saturados (Nawar, 1996). Para alcançar alta seletividade, é comum empregar baixas pressões de hidrogênio, velocidade de agitação moderada e temperaturas elevadas, possibilitando obter uma condição de escassez de hidrogênio na superfície do catalisador, que favorece também a formação de AGT (Ackman & Mag, 1998).

A produção de gorduras com altos teores de AGT foi por várias décadas considerada importante pela indústria de hidrogenação, não apenas por diminuir o consumo de hidrogênio, mas principalmente por melhorar as características físicas, químicas e sensoriais das gorduras, sem favorecer grandes alterações nos teores de ácidos graxos saturados (Weiss, 1983; Karabulut *et al.*, 2003). Com propósito de aumentar a isomerização geométrica, muitos catalisadores foram tratados com H<sub>2</sub>S, SO<sub>2</sub>, CS<sub>2</sub> ou CO, para diminuir os sítios de adsorção de hidrogênio (Allen, 1981; Johnson, 1998).



A relação entre o catalisador e a seletividade da hidrogenação passou a ser muito estudada a partir da década de 1960, resultando no desenvolvimento de diversos catalisadores. Entre estes destacam-se os de cobre, níquel, paládio e platina (Gray & Russel, 1979).

Os catalisadores a base de cobre apresentam alta seletividade para os ácidos alfa-linolênico e linoléico, tendo em geral, uma baixa tendência para formar AGT. Nas décadas de 1970 e 1980, estes catalisadores foram muito utilizados, principalmente na hidrogenação *light*. Contudo, devido a sua baixa atividade e ao seu efeito catalítico sobre a oxidação dos ácidos graxos insaturados, seu uso passou a ser desestimulado (Ackman & Mag, 1998).

Com isso, o uso de catalisadores passou a ser praticamente restrito ao níquel, devido a sua boa atividade, razoável seletividade, filtrabilidade, capacidade de reutilização, a menor influência sobre a oxidação dos ácidos graxos insaturados e ao menor custo em relação ao paládio e a platina (Gray & Russel, 1979; Okonek *et al.*, 1995). Para aumentar a sua atividade catalítica e facilitar a remoção após a hidrogenação, o níquel geralmente é suportado em óxidos de silício, alumínio, cromo ou cobalto (Jonhson, 1998). Embora o uso do níquel apresente uma série de vantagens, a hidrogenação não é específica, a produção de AGT é muito significativa. Além disso, a reutilização do catalisador diminui a seletividade e eleva a formação de AGT (Gray & Russel, 1979).

Na última década começaram a ser desenvolvidos catalisadores de níquel modificado, que possibilitam efetuar o processo de hidrogenação em temperaturas menores, sem alterar significativamente a seletividade da reação, resultando em uma menor formação de AGT. Ao aplicar estes catalisadores à hidrogenação do óleo de soja em escala laboratorial, Hasman (1995), citado por Ackman & Mag (1998), observou a diminuição de até 45,5% dos teores de AGT, em relação aos catalisadores convencionais (44,0% de AGT), quando foram produzidas gorduras com índice de iodo igual a 70. Para o óleo de canola, os teores de AGT foram diminuídos em até 50,3% e 66,7%, ao se obter gorduras com índice de iodo (II) igual a 90 e 60, respectivamente, considerando que o uso de catalisadores convencionais resultou em teores de 30,2% (II = 90) e 52,5% (II = 60) em relação ao total de ácidos graxos.

Os catalisadores constituídos de metais nobres como a platina e o paládio, apresentam atividade catalítica elevada, permitindo alcançar velocidades de

hidrogenação equivalentes as obtidas com o níquel, em temperaturas menores (Jonhson, 1998). Embora esta condição contribua para diminuir a formação de AGT, o aumento na atividade catalítica resulta no uso de concentrações menores de catalisador, o que implica em uma maior eficiência de filtração, restringindo a sua aplicação (Gray & Russell, 1979). Entre estes catalisadores, os de platina modificada tem mostrado a possibilidade de efetuar hidrogenações muito seletivas, com baixa formação de AGT (Okonek *et al.*, 1995).

O mecanismo de formação de isômeros geométricos e posicionais durante o processo de hidrogenação foi proposto por Allen & Kiess (1955) com base na sequência de semi-hidrogenação e desidrogenação (Figura 2), sendo confirmado por estudos subsequentes (Allen & Kiess, 1956; Allen, 1981). Os autores postularam que durante a hidrogenação, um átomo de hidrogênio pode entrar em qualquer lado da dupla ligação e formar um sítio de radical livre, possivelmente ligado ao catalisador. Este sítio de radical livre é muito instável e, se o catalisador estiver parcialmente coberto por hidrogênio, pode ocorrer a eliminação de um hidrogênio de um carbono vizinho, regenerando a dupla ligação ou levando a formação de um isômero posicional. Como a formação de um sítio de radical livre possibilita a livre rotação, a dupla ligação a ser formada pode apresentar a configuração *cis* ou *trans*, sendo predominante a forma *trans* devido a maior estabilidade termodinâmica.

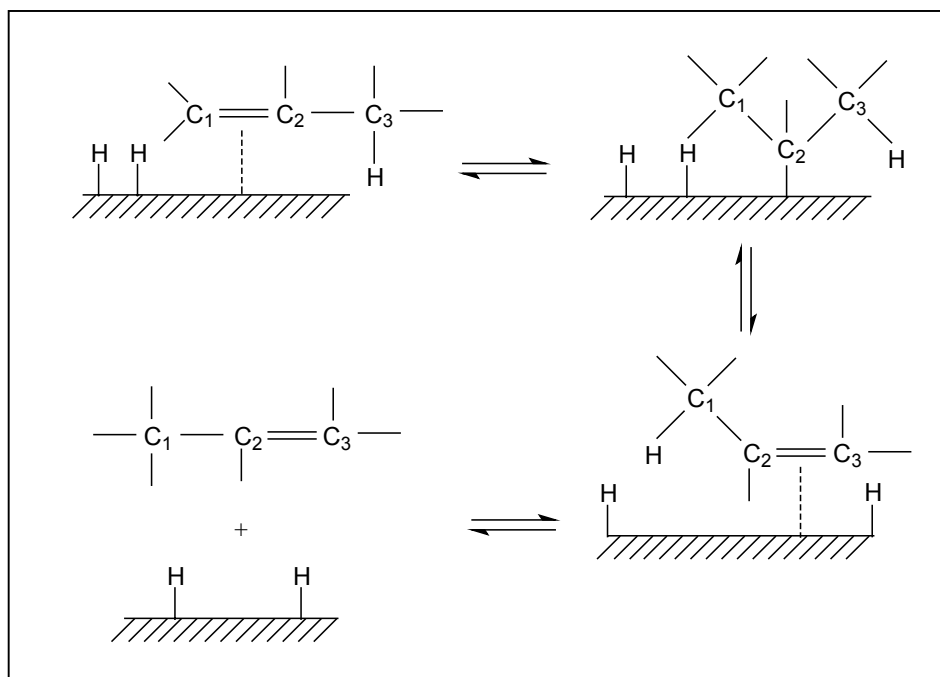


Figura 2: Mecanismo de formação de isômeros geométricos e posicionais no processo de hidrogenação (Min, 2005).

### **2.2.3 Processamento de óleos vegetais**

Os óleos vegetais em seu estado natural possuem uma ampla variedade de substâncias que podem contribuir para alterar sua cor, sabor e aroma, restringindo as suas aplicações e diminuindo a sua vida em prateleira. Entre este grupo de substâncias destacam-se: os ácidos graxos livres, os fosfolipídios, os carboidratos e as proteínas, bem como seus produtos de degradação, a água, a clorofila, os carotenóides, e os produtos da oxidação dos ácidos graxos. Assim, com o objetivo de remover estas substâncias, os óleos são submetidos ao processo de refino, que geralmente inclui as etapas de degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização (Nawar, 1996).

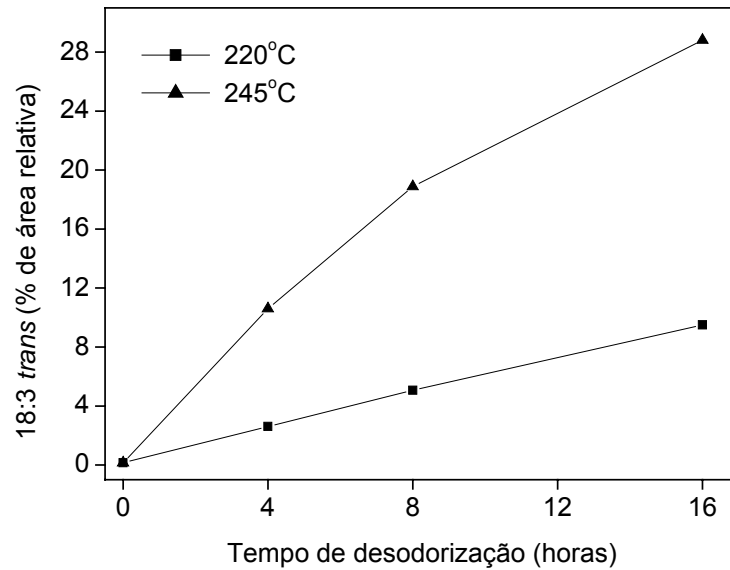
No refino de óleos vegetais o aquecimento é aplicado nas etapas que antecedem a desodorização, sendo comum o emprego de temperaturas entre 60 e 110 °C. Porém na etapa de desodorização, que tem como objetivo melhorar as características organolépticas do óleo mediante a remoção de resíduos de solvente e de compostos de baixo peso molecular, a temperatura varia de 180 a 270 °C (Johnson, 1998).

Ao determinar as quantidades relativas de AGT no óleo de girassol bruto e após as etapas de degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização, Tasan & Demirce (2003) observaram um aumento de 13,8 vezes no teor de AGT 18:2 (0,06% antes do refino), ao fim do processo de refino. A etapa de desodorização, efetuada a 230 °C por 2 horas, respondeu por 91,3% do aumento observado. Quando a desodorização foi realizada a 265 °C por 1 hora, o teor de AGT 18:2 aumentou 57,8 vezes em relação ao óleo bruto, com esta etapa correspondendo a 97,4% do aumento.

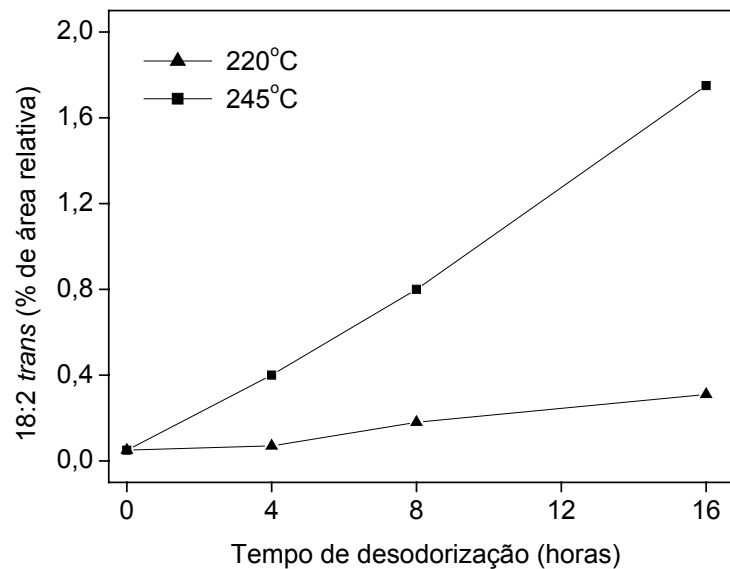
A desodorização do óleo de linhaça em escala laboratorial foi empregada por Wolff (1993b) como modelo para avaliar o efeito do tempo de aquecimento e da temperatura sobre a isomerização dos ácidos linoléico e alfa-linolênico, presentes nos óleos vegetais refinados. Neste estudo foi demonstrado que a formação de AGT 18:2 e 18:3 é dependente da intensidade destas variáveis (Figura 3), sendo iniciada em torno de 190 °C.

Hénon *et al.* (1999) ao estudarem a cinética da isomerização dos ácidos linoléico e alfa-linolênico durante a desodorização do óleo de canola em escala

laboratorial, observaram a existência de temperaturas críticas, acima das quais ocorreu a isomerização acentuada destes ácidos graxos. Para o ácido alfa-linolênico esta temperatura situa-se no intervalo de 220 a 230 °C, sendo superior a 240 °C, para o ácido linoléico. Em conseqüência, após 4 horas de desodorização a 270 °C, cerca de 80% do ácido alfa-linolênico inicial encontra-se isomerizado, enquanto apenas 13% do ácido linoléico originou AGT.



(a)



(b)

Figura 3: Efeito da temperatura e do tempo de desodorização sobre a formação de: (a) AGT 18:2 e (b) AGT 18:3 (dados obtidos por Wolff, 1993b).

Embora sejam encontrados AGT 18:1, 18:2 e 18:3 em óleos vegetais obtidos por prensagem a frio, seus teores são muito reduzidos, estando geralmente entre 0,1 e 0,3% do total de ácidos graxos (Bruhl, 1996). Os teores de AGT 18:2 e 18:3 são predominantes, mas surpreendentemente Bruhl encontrou em algumas das marcas de óleo de girassol, cártamo e linhaça produzidas na Alemanha, teores de 0,27%, 0,39% e 0,36%, respectivamente para os AGT 18:1, sendo encontrados teores de 0,03%, 0,08% e 0,26% para o total de AGTP correspondente. Neste estudo, foi observado também a predominância de AGT 18:1 em relação aos AGTP, em sementes de colza submetidas a secagem industrial.

Segundo Ackman e Mag (1998), o emprego de condições drásticas durante o processo de secagem de sementes pode estar relacionado com a formação de AGT 18:1, 18:2 e 18:3 através da ação de enzimas como a lipoxigenase e a hidroxiperoxidase/desidroxiperoxidase. Assim, nestes sistemas vegetais a formação de AGT é possivelmente muito dependente da temperatura.

### **2.2.3 Preparo de alimentos fritos**

A fritura é um dos métodos mais antigos aplicado ao preparo de alimentos, sendo a sua origem atribuída aos chineses (Rossell, 2001). Neste processo, o calor é transferido do óleo para o alimento, promovendo a evaporação da água contida no alimento e a absorção de óleo (Warner, 1998). Também ocorrem diversas mudanças físicas e químicas no óleo, em consequência de reações de oxidação, pirólise, polimerização, hidrólise e isomerização, originando inúmeras substâncias que são incorporadas ao alimento, e que alteram a sua aparência, aroma e sabor (Moreno *et al.*, 1999; Gertz, 2001).

A formação de AGT durante a fritura de alimentos, está relacionada com a temperatura do processo e com o tempo de uso do óleo (Moreno *et al.*, 1999; Sanibal & Mancini-Filho, 2004). Quando são empregadas gorduras parcialmente hidrogenadas, a formação de AGT geralmente é menor. Contudo, os teores inicialmente elevados destes ácidos, resultam em uma maior concentração de isômeros *trans* no alimento frito (Aro *et al.*, 1998; Romero, 2000).

Moreno *et al.* (1999) avaliaram o efeito da temperatura e do tempo sobre a formação de isômeros *trans* durante o aquecimento do óleo de girassol em

recipiente aberto (Figura 4). Neste estudo, foi observado que o aumento das insaturações *trans* inicia em 150 °C, tornando-se muito significativo a partir de 250 °C. Após manter o óleo por 20 minutos, nas temperaturas de 200, 250 e 300 °C, foi verificado o aumento de 356,5%, 773,9% e 3026,1%, respectivamente, na concentração de isômeros *trans*, em relação ao valor inicial (0,23 mg g<sup>-1</sup>).

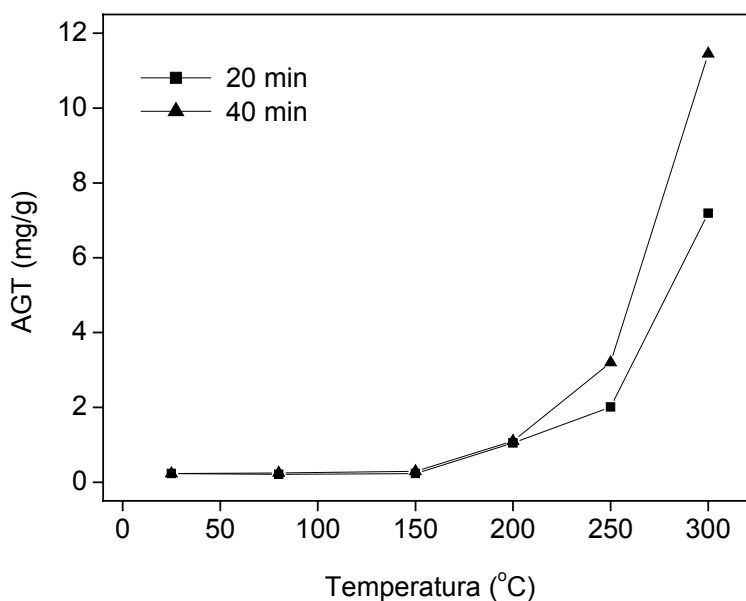


Figura 4: Efeito da temperatura e do tempo de aquecimento sobre a formação de AGT durante o aquecimento do óleo de girassol (dados obtidos por Moreno *et al.*, 1999).

Tem sido regulamentado em diversos países do continente europeu, que o preparo de alimentos fritos com óleos vegetais não deve exceder a temperatura de 180 °C. Na França, tem-se instituído que os óleos utilizados em frituras nos estabelecimentos comerciais devem conter no máximo 3% de ácido alfa-linolênico (Fox, 2001; Wolff, 2002). Estas medidas, além de contribuírem para diminuir a degradação dos ácidos graxos mais insaturados, resultam em uma menor formação de AGTM e AGTP durante a fritura.

Ao estudar a formação de AGT durante o processo de fritura de batatas com o óleo de soja, em temperaturas em torno de 180 °C, efetuando a filtração do óleo e sua reposição a cada 10 horas, Sanibal & Mancini-Filho (2004) observaram o aumento significativo dos teores de AGTM no óleo, à medida que o tempo de aquecimento se tornou maior. Para o grupo dos AGTP foi observado o maior teor

após 10 horas de fritura, que correspondeu ao aumento de 55,2% em relação à quantidade inicialmente presente no óleo (2,1%). A análise de regressão linear dos resultados obtidos por estes autores para os teores de AGTM (Figura 5), demonstra que a formação destes isômeros apresentou dependência linear com o tempo de fritura, ocorrendo a uma taxa de isomerização ao redor de 0,3% por hora, em relação ao total de ácidos graxos contidos no óleo.

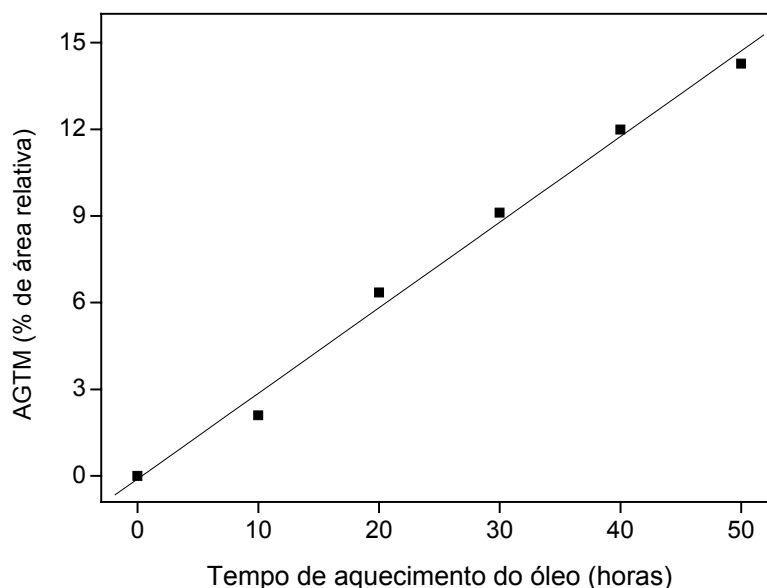


Figura 5: Teores de AGTM em função do tempo de aquecimento do óleo de soja (curva obtida a partir dos valores determinados por Sanibal & Mancini-filho, 2004;  $r = 0,996$ ;  $p < 0,0001$ ;  $y = -0,110 + 0,297 \cdot x$ ).

#### **2.2.4 A irradiação de alimentos**

O uso da tecnologia de irradiação tem despertado grande interesse para a preservação de alimentos, devido principalmente a sua eficiência e as múltiplas possibilidades de aplicação. Nos alimentos cárneos, o emprego da irradiação aumenta o seu tempo de vida em prateleira, protegendo contra microrganismos patogênicos. Contudo, a irradiação provoca mudanças nas estruturas de muitos nutrientes, que podem ter importantes conseqüências sobre o valor nutricional dos alimentos (Nawar, 1996).

Nos ácidos graxos insaturados, a irradiação induz a produção de radicais livres que reagem com o oxigênio, levando a formação de compostos carbonilados,

que são responsáveis pelas principais alterações das características nutricionais e sensoriais dos alimentos, associadas a este processo (Brito *et al.*, 2002). Além disso, o rompimento da dupla ligação favorece a formação de AGT, pois a sua regeneração na configuração *trans* diminui a energia livre do ácido graxo (Allinger *et al.*, 1978).

Ainda existem muitas controvérsias a respeito das doses mais apropriadas para a irradiação dos alimentos. Para o grupo das carnes vermelhas, tem sido regulamentado em países como os Estados Unidos e o Canadá, que a irradiação deste alimento fresco, não deve exceder a 4,5 kGy. Entretanto, na Inglaterra, são permitidas doses de até 7,0 kGy, e na África do Sul, as carnes recebem doses de 45 kGy (IFST, 1998; FDR, 2002).

Brito *et al.* (2002) ao avaliar o efeito de doses crescentes de radiação gama sobre o teor de AGT em carne bovina fresca (Figura 6), analisada subsequente à irradiação, verificaram que em doses de 1 a 5 kGy ocorreu o aumento médio de 80,4% na quantidade de AGT. Quando as doses foram de 6 e 7 kGy, houve o aumento de 106,5% no teor de AGT, alcançando em 8 kGy, o nível de 139,1%, o que correspondeu a 11,0% do total de ácidos graxos. Assim, a aplicação de doses entre 1 e 5 kGy parece ser mais indicada, por limitar a formação de AGT.

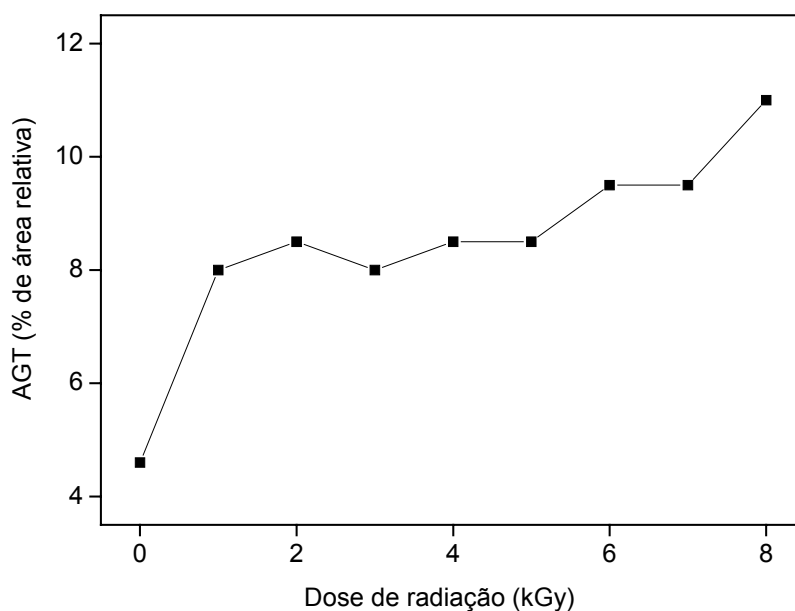


Figura 6: Efeito da dose de radiação sobre o teor de AGT em carne bovina (dados obtidos por Brito *et al.*, 2002)



### 2.2.5 A bio-hidrogenação

Nos animais que pertencem a sub-ordem *Ruminantia*, a ação de microrganismos presentes no rúmen, como o *Butyrivibrio fibrisolvens* e o *Megasphaera esdenii*, resulta na isomerização dos ácidos graxos poliinsaturados, produzindo entre outros ácidos, o 18:2 9c,11t e o 18:2 10t,12c, a partir do ácido linoléico (Figura 7). Estes ácidos graxos, denominados de ácido linoléico conjugado (CLA), podem ser absorvidos pelo animal ou serem bio-hidrogenados para formar os ácidos 18:1 11t (vacênico) e 18:1 10t, que também podem ser obtidos a partir dos ácidos alfa e gama-linolênico. Em seqüência, pode ocorrer a absorção destes AGTM ou a sua hidrogenação, originando o ácido esteárico (18:0). Quando absorvidos, estes ácidos são incorporados ao tecido adiposo e músculos do animal, podendo ocorrer a formação do ácido 18:2 9c,11t a partir do ácido vacênico, pela ação da enzima delta-9-dessaturase (Bauman *et al.*, 1999; Khanal & Dhiman, 2004).

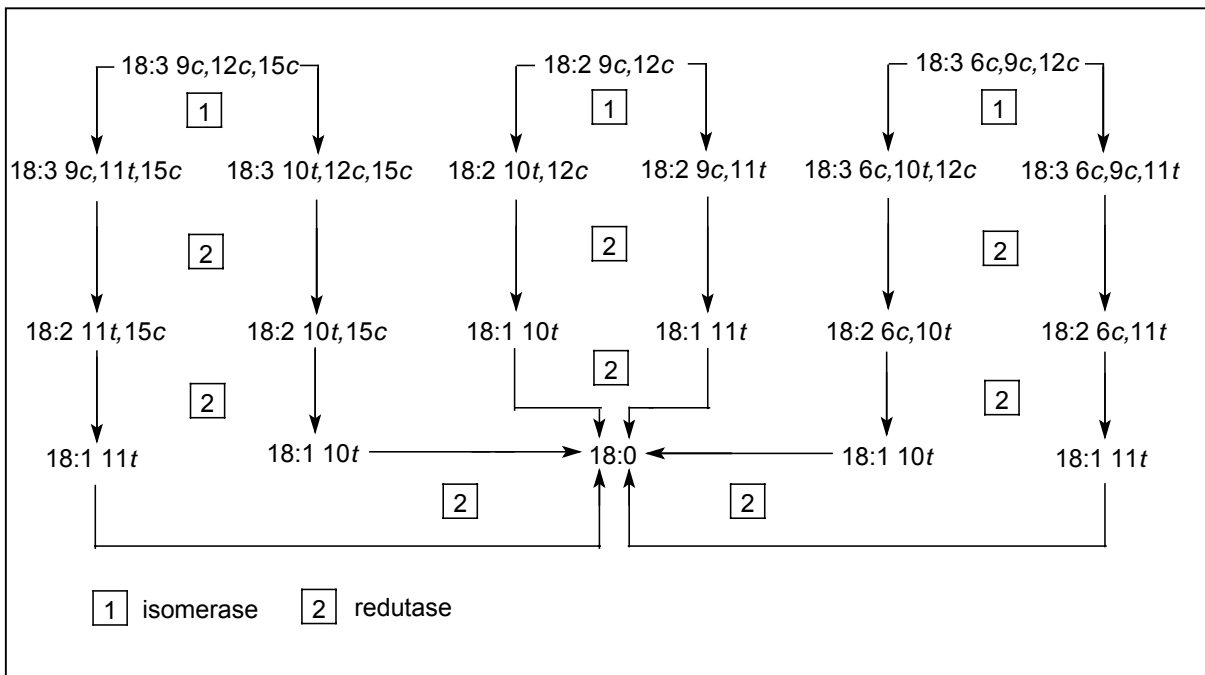


Figura 7: Obtenção do ácidos 18:1 11t e 18:1 10t em ruminantes a partir dos ácidos linoléico, alfa-linolênico e gama-linolênico (adaptado de Khanal & Dhiman, 2004).

Estudos efetuados com bovinos tem demonstrado, que dietas com baixo teor de fibra promovem o aumento da concentração do ácido 18:1 10t e a diminuição do 18:1 11t no leite desses animais, devido a alterações no processo fermentativo, que

resultam na diminuição do pH ruminal (Bauman *et al.*, 1999). Também tem sido observado que a diminuição na concentração do ácido vacênico no leite, quando a quantidade de fibra na dieta é restringida, está correlacionada positivamente com a concentração de CLA, e inversamente relacionada com o aumento na concentração do ácido 18:1 10*t* (Griinari *et al.*, 1998).

Na bio-hidrogenação, o ácido oléico (18:1 9*c*) é convertido em ácido esteárico, mas tem sido observado que pela ação de microrganismos presentes no rúmen, também ocorre a formação de ácidos graxos 18:1*t*, com as insaturações distribuídas desde o carbono 6 até ao 16, conforme demonstrado por Mosley *et al.* (2002) ao efetuar estudo *in vitro* com tecido ruminal extraído de bovinos. Além disso, quando o óleo de canola com alto teor de ácido oléico (78%) foi incorporado à dieta de vacas Jersey, Jenkins (2000) observou que o teor de AGT 18:1 aumentou para 4,2% do total de ácidos graxos, enquanto na dieta controle o teor de AGT 18:1 foi 1,7%.

### **2.3 Ácidos graxos *trans* e a saúde humana**

Com o surgimento do processo de hidrogenação despontaram também indagações a respeito do valor nutricional da margarina e das gorduras hidrogenadas. Inicialmente, houve a preocupação com o níquel residual nos produtos da hidrogenação, mas após alguns estudos ficou esclarecido que a sua concentração era inócua. Em 1920, a formação de AGT durante a hidrogenação parcial já era conhecida e no final desta década, foi sugerido que a hidrogenação parcial do ácido oléico resultava na formação de alguns isômeros posicionais e geométricos (Shurtleff & Aoyagi, 2004).

A partir de 1960 começaram a ser efetuados estudos que procuravam mensurar os efeitos da ingestão de quantidades elevadas de AGT sobre a saúde humana. Anderson *et al.* (1961), publicaram o primeiro estudo que avaliou a influência da ingestão de AGT sobre os níveis de colesterol total, em relação aos ácidos graxos saturados e poliinsaturados. Estes autores observaram que os níveis de colesterol total associados a ingestão de ácidos graxos saturados eram um pouco mais elevados que os decorrentes da ingestão de gordura hidrogenada.

Contudo, somente na década de 1990, através de um estudo realizado por Mensink & Katan (1990), a atenção de muitos pesquisadores foi despertada para a investigação dos efeitos adversos dos AGT sobre as lipoproteínas plasmáticas. Neste estudo, foi demonstrado que a ingestão elevada de AGT aumenta os níveis da lipoproteína de baixa densidade (low density lipoprotein; LDL-c) de maneira similar aos ácidos graxos saturados. Contudo, foi observado que os AGT reduzem os níveis da lipoproteína de alta densidade (high density lipoprotein; HDL-c), alterando significativamente a razão LDL-c/HDL-c, em relação à dieta em que os AGT foram substituídos por ácidos graxos saturados.

Este efeito dos AGT sobre os níveis plasmáticos da LDL-c e da HDL-c, tem sido confirmado em vários estudos realizados com diferentes porcentagens de AGT (3,8-10,9) em relação a energia total da dieta ingerida (Nestel *et al.*, 1992; Zock & Katan, 1992; Judd *et al.*, 1994; Aro *et al.*, 1997; Sundram *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 1998; Lichtenstein *et al.*, 1999). Ao analisar estes estudos, Ascherio *et al.* (1999) concluíram que a elevação em 2% da energia ingerida sob a forma de AGT está relacionada com o aumento de 0,1 unidade na relação LDL-c/HDL-c. Nesse sentido, tem sido observado que o aumento de uma unidade nesta relação, está associado a elevação em cerca de 53% do risco de doenças cardiovasculares (Stampfer *et al.*, 1991).

Recentemente, Hunter (2005) analisou os estudos considerados por Ascherio *et al.* (1999), com o propósito de determinar as porcentagens limite de AGT em relação à energia ingerida, a partir das quais, ocorre o aumento significativo dos níveis plasmáticos da LDL-c e a diminuição significativa da HDL-c. O autor verificou que para a LDL-c esta porcentagem corresponde a 4% da energia ingerida, e para HDL-c situa-se entre 5 e 6%. Também foi observado que o efeito dos AGT sobre a razão LDL-c/HDL-c pode ser alterado pelo aumento da energia ingerida sob a forma de ácido linoléico.

Os AGT vem sendo associados com o aumento dos níveis de triacilgliceróis no plasma sanguíneo (Katan *et al.*, 1995; Ascherio *et al.*, 1999). Este efeito tem sido observado através da substituição do ácido oléico (18:1 n-9) por AGT, em uma mesma dieta. Hu *et al.* (2001) sugeriram uma provável contribuição deste efeito na elevação do risco de doenças cardiovasculares. Entretanto, alguns autores não têm observado diferenças significativas entre os níveis de triacilgliceróis avaliados (Nestel *et al.*, 1992; Sundram *et al.*, 1997).

Diversos estudos tem avaliado a influência da ingestão elevada de AGT sobre os níveis da lipoproteína [a] (Lp[a]), considerada um fator de risco para doenças cardiovasculares (Mensink & Katan, 1990; Mensink *et al.*, 1992; Lichtenstein *et al.*, 1993; Aro *et al.*, 1997; Sundram *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 1998, Lichtenstein *et al.*, 1999). Segundo Lippi & Guidi (1999), a Lp[a] provavelmente atua inibindo competitivamente o plasminogênio, o que impossibilita a sua ativação em plasmina, uma enzima responsável pela degradação da fibrina.

Os níveis da Lp[a] variam entre indivíduos, devido principalmente a fatores genéticos (Dahlen, 1994), mas tem sido verificado uma alteração moderada em função da composição em ácidos graxos da dieta (Hornstra *et al.*, 1991). Alguns dos estudos realizados indicaram um aumento significativo dos níveis desta lipoproteína, quando diferentes teores de ácidos graxos saturados foram substituídos por AGT (Mensink & Katan, 1990; Mensink *et al.*, 1992; Aro *et al.*, 1997; Judd *et al.*, 1998). O efeito da intensidade deste aumento sobre o risco de doenças cardiovasculares ainda é desconhecido, mas parece ter maior impacto em indivíduos geneticamente condicionados a ter níveis maiores da Lp[a] (Mensink *et al.*, 1992).

Estudos realizados com ratos têm demonstrado a competição de AGT com ácidos graxos das famílias n-6 e n-3, nas reações de dessaturação e alongamento da cadeia, resultando na formação de eicosanóides sem atividade biológica (Kirstein *et al.*, 1983; Mahfouz *et al.*, 1984; Blond *et al.*, 1990). Além disso, os AGT monoinsaturados e poliinsaturados podem inibir as enzimas delta-6 e delta-5 dessaturase, bloqueando o metabolismo dos ácidos graxos essenciais. Tem-se sugerido a ocorrência deste processo em humanos, com destaque para o impacto na fase gestacional e nos primeiros meses após o nascimento (Decsi & Koletzko, 1995) devido a transferência de AGT presentes na dieta materna, através da placenta e do leite, podendo levar a inibição da síntese dos ácidos araquidônico (20:4 n-6) e docosaexaenóico (22:6 n-3). Outra possível consequência deste processo é a alteração no balanço existente entre prostaglandinas e tromboxanos, que pode favorecer a agregação plaquetária, contribuindo para o desenvolvimento de arteriosclerose (Hu *et al.*, 2001).

Contudo, a investigação da influência dos AGT sobre a atividade das enzimas dessaturases em humanos, ainda é escassa. Em um estudo realizado com homens de idade entre 30 e 50 anos, Scrimgeour *et al.* (2001) verificaram que a ingestão de isômeros *trans* do ácido alfa-linolênico como 0,6% da energia total, não alterou a

conversão do ácido linoléico em ácido araquidônico em relação a dieta em que estes isômeros foram reduzidos a cerca de 0,1% da energia ingerida. Embora este resultado tenha sido obtido com níveis de ingestão de isômeros *trans* considerados baixos, este estudo sugere que dietas com teores reduzidos de AGTP não influenciam a atividade das enzimas delta-5 e delta-6 dessaturase em adultos.

Os AGT são absorvidos e transportados pelo organismo de forma similar aos demais ácidos graxos presentes na dieta, sendo incorporados em praticamente todas as classes de lipídios nos diversos órgãos (Emken, 1984; Holmer, 1998). Para os AGTM, a incorporação ocorre preferencialmente na posição sn-1 dos fosfolipídios das membranas, enquanto que os AGTP são esterificados predominantemente na posição sn-2 (Sugano & Ikeda, 1996).

A incorporação de AGTM e AGTP nos fosfolipídios das membranas celulares, afeta a sua fluidez, podendo alterar a atividade de enzimas e de proteínas receptoras associadas a membrana (Precht & Molkenin, 1995). Assim, tem sido proposto que a ingestão elevada de AGT pode diminuir a afinidade dos receptores da insulina, contribuindo para o fenômeno da resistência à insulina, que está relacionado com o desenvolvimento da diabetes tipo II (Lovejoy, 1999; Salmerón *et al.*, 2001).

A ingestão elevada de AGT também tem sido associada com a intensificação de doenças alérgicas. Em um amplo estudo realizado com adolescentes, Weiland *et al.* (1999), observaram que a ocorrência de asma, rinoconjuntivite e dermatites, estava correlacionada positivamente com a porcentagem de energia ingerida sob a forma de AGT. Embora o mecanismo em que os AGT possam contribuir para a intensificação de doenças alérgicas não tenha sido elucidado, Koga *et al.* (1997) observaram em estudos efetuados com ratos, que dietas contendo o ácido elaídico (18:1 *9t*) em nível de 6,0% em relação a energia ingerida, resultaram no aumento significativo da concentração plasmática da imunoglobulina da classe G (IgG). Nesse sentido, tem sido observado que indivíduos asmáticos apresentam níveis mais elevados de IgG em relação a indivíduos não-asmáticos (Verghese *et al.*, 2001).

Por fim, o aumento do consumo de alimentos contendo níveis elevados de AGT, pode, além das implicações nutricionais apresentadas, ter como consequência direta a redução da ingestão de ácidos graxos essenciais. Esta condição, pode favorecer o desenvolvimento de síndromes relacionadas a deficiência destes ácidos graxos (Holmer, 1998).

Ainda permanecem muitas indagações a respeito das implicações nutricionais decorrentes do consumo de AGT. Entretanto, a ocorrência de efeitos desfavoráveis resultantes da sua ingestão em níveis elevados não deve ser surpreendente, pois estudos efetuados com animais, empregando outros ácidos graxos que estão presentes em pequenas proporções na dieta da maioria das pessoas, também tem verificado alterações adversas no metabolismo, quando são ingeridos em quantidades elevadas. Entre estes ácidos graxos destacam-se: os acetilênicos, que atuam como potentes inibidores da síntese de eicosanóides; o erúcido (22:1 n-9) que provoca a lipólise e a ocorrência de lesões no músculo cardíaco; o láurico (12:0) que eleva os níveis plasmáticos de colesterol total e da LDL-c; o estercúlico que afeta o sistema reprodutor; e os de cadeia média, com números ímpares de carbonos, que agem na supressão da oxidação de ácidos graxos (Carlson *et al.*, 1997; FSANZ, 2003).

Os mamíferos não são capazes de introduzir permanentemente nos ácidos graxos, uma dupla ligação com a configuração *trans*. Por conseguinte, os AGT encontrados no organismo humano são provenientes da dieta. Esta condição evidencia a importância de se limitar à ingestão deste grupo de ácidos graxos, principalmente com o propósito de diminuir o risco de desenvolvimento das doenças cardiovasculares, que nas últimas décadas tem sido a principal causa de morte e invalidez na maioria dos países industrializados (Schaefer, 2002).

Assim, a regulamentação da concentração dos AGT nos rótulos dos alimentos industrializados constitui uma importante estratégia, que aliado ao esclarecimento e a conscientização da população, irá direcionar a indústria de hidrogenação para a produção de gorduras com baixos teores de AGT.

#### **2.4 Análise dos ácidos graxos *trans* em alimentos**

Na determinação de AGT em alimentos tem sido empregadas técnicas cromatográficas e espectroscópicas. As técnicas cromatográficas abrangem a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida de alta eficiência associada ao íon prata (CLAE/Ag<sup>+</sup>) e a cromatografia de camada delgada impregnada com nitrato de prata (CCD/Ag<sup>+</sup>). Entre as técnicas espectroscópicas, são empregadas a

espectrofotometria no infravermelho e a ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^{13}\text{C}$ .

A cromatografia gasosa é a técnica que mais tem sido aplicada ao estudo dos AGT, devido principalmente ao desenvolvimento de fases estacionárias que possibilitam a separação dos diversos isômeros posicionais e geométricos formados durante a hidrogenação parcial de óleos vegetais e marinhos. São utilizadas colunas com 50 a 100 m de comprimento, contendo fase estacionária de elevada polaridade, geralmente constituída de cianoalquil polisiloxano (Figura 8). Os ácidos graxos são analisados preferencialmente sob a forma de ésteres metílicos e a eficiência da separação é muito dependente da temperatura de análise e do comprimento da coluna (Ledoux *et al.*, 2000).

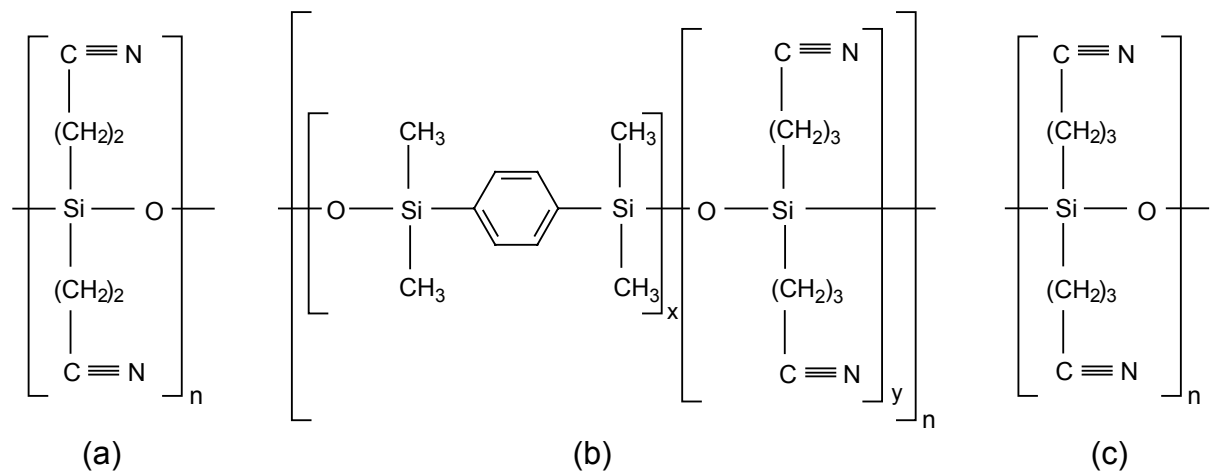


Figura 8: Estrutura da fase estacionária de algumas colunas utilizadas na análise de AGT: (a) OV-275; (b) BPX-70; (c) CP-Sil 88 (Ratnayake, 1998).

Nos últimos anos começaram a ser produzidas colunas contendo fases estacionárias de alta polaridade, sendo quimicamente ligadas. Esta tecnologia aumenta a resistência mecânica da fase estacionária e confere uma maior estabilidade térmica, resultando no aumento do tempo de vida útil da coluna. Entre estas colunas destaca-se: a CP Select CB-FAME por ser 100% ligada quimicamente (Peene *et al.*, 2003).

Na análise de AGT 18:1, o uso de colunas de 50 a 60 m de comprimento resulta em uma significativa diminuição na sua quantidade total, devido a sobreposição de alguns isômeros deste grupo com o ácido oléico (18:1 9c). Entretanto, quando a análise é efetuada em colunas de 100 m esta limitação pode

ser grandemente minimizada. Para a determinação de AGTP tem sido utilizado colunas com 50 e 60 m, que possibilitam uma adequada separação entre estes isômeros, sem as limitações verificadas para os AGT 18:1. O emprego destas colunas também permite uma significativa diminuição do tempo de análise em relação as colunas de 100 m, contribuindo para reduzir os custos analíticos (Ratnayake & Rogers 1990, Wolff, 1993a).

A separação de AGT por CCD/Ag<sup>+</sup> associada a análise por cromatografia gasosa foi muito empregada nas últimas décadas, permanecendo ainda em uso. Os ácidos graxos geralmente são fracionados sob a forma de ésteres metílicos e o processo baseia-se na formação de complexos entre o íon prata e as duplas ligações. Assim, quanto maior o número de duplas ligações do ácido graxo, maior será a extensão da complexação. Devido ao impedimento estérico ocasionado pela presença de insaturações *trans*, os complexos formados com estas duplas ligações apresentam menor estabilidade que os seus correspondentes *cis*. Por conseguinte, o fator de retenção (R<sub>f</sub> – retention front) dos ésteres metílicos depende principalmente da configuração geométrica das ligações etilênicas e do grau de insaturação do ácido graxo (Dobson *et al*, 1995).

Embora esta técnica seja extremamente acessível e muito eficaz na separação entre os ácidos graxos *cis*, *trans* e saturados, diversas dificuldades operacionais estão relacionadas à sua aplicação. Entre estas destacam-se: a preparação e o manuseio das placas em local pouco iluminado, o risco de contaminação entre as frações *cis* e *trans*, a influência da temperatura sob a separação, o elevado tempo de análise e a necessidade de um treinamento intenso do analista (Ratnayake, 1998).

Na CLAE/Ag<sup>+</sup> foi inicialmente empregado colunas de sílica gel impregnadas com nitrato de prata. Nestas colunas, o tempo de uso é grandemente limitado pela eluição dos íons Ag<sup>+</sup>. Para contornar este problema tem sido utilizadas pré-colunas saturadas com nitrato de prata, mas a eluição de íons Ag<sup>+</sup> contamina as frações, podendo ainda danificar o sistema de detecção do equipamento. O uso destas colunas tem sido restrito, principalmente por não serem comercializadas, o que implica em seu preparo no laboratório, requerendo uma certa experiência para isto (Dobson, 1995, Cristhie, 1998).

Devido dificuldades associadas ao uso de colunas preparadas por impregnação, foram desenvolvidas colunas com trocadores catiônicos ligados a



espécie  $\text{Ag}^+$ . A perda de íons  $\text{Ag}^+$  nestas colunas é limitada, uma vez que a prata encontra-se unida a resina através de ligação iônica. Em geral, a resolução destas colunas é gradualmente diminuída após três meses de uso contínuo (Neff *et al.*, 1994). Os AGT geralmente são analisados sob a forma de ésteres metílicos e fenacílicos, e o tempo de análise depende da resolução requerida entre os isômeros posicionais. A preparação de ésteres fenacílicos decorre do uso de solventes clorados, devido a sua absorção no ultravioleta em comprimentos de onda inferiores a 235 nm, que abrangem a região de absorção dos ésteres metílicos de ácidos graxos (210-220 nm). Em sistemas constituídos por solventes não-clorados como acetonitrila e hexano, os ácidos graxos podem ser analisados sob a forma de ésteres metílicos (Adlof, 1994).

Embora a CLAE/ $\text{Ag}^+$  possibilite a completa separação entre os ésteres de ácidos graxos *cis* e *trans* 18:1, presentes em gorduras de origem vegetal e animal, não tem sido possível determinar em uma única análise os teores de AGTM e AGTP. Também não foi demonstrada a separação entre ésteres de AGTP 18:2 e 18:3. Por fim, a maior limitação da CLAE/ $\text{Ag}^+$  continua sendo a perda razoavelmente rápida da resolução, que afeta a reprodutibilidade da análise (Ratnayake, 1998).

A determinação de AGT por espectrofotometria no infravermelho está baseada na absorção característica das ligações *trans* em  $967\text{ cm}^{-1}$  e na sua correlação com o éster metílico do ácido elaídico. Este método é de rápida execução, entretanto não fornece informações sobre as proporções dos diferentes isômeros, o número de insaturações, as suas posições e o comprimento da cadeia carbônica. Suas principais dificuldades operacionais estão relacionadas com a necessidade de dissolução quantitativa da amostra em dissulfeto de carbono, solvente volátil, muito tóxico e de odor fétido, além da utilização de celas de cloreto de sódio, que são altamente higroscópicas (Ulberth & Haider, 1992). Também é necessária a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, pois os triacilgliceróis absorvem em  $970\text{ cm}^{-1}$  (Ledoux *et al.*, 2000). A aplicação deste método é restrita a amostras que possuam mais de 5% do total de ácidos graxos com insaturações na configuração *trans*, sendo que a quantidade de ácidos graxos conjugados deve ser inferior a 5% (Ratnayake, 1995).

Com o desenvolvimento da calibração multivariada, utilizando método dos mínimos quadrados parciais (PLS - partial least square), o interesse pela determinação de AGT empregando a espectrofotometria no infravermelho tem

aumentado (Dobson, 2001). Isto ocorre, devido as potencialidades deste método estatístico, que associado ao uso de instrumentos com transdutores multicanal, possibilita a quantificação de isômeros *trans* em óleos e gorduras, sem a necessidade de derivatização da amostra e do uso de solvente. Este método resulta ainda em um aumento da precisão e da exatidão em relação ao método tradicional, permitindo a determinação simultânea dos índices de iodo e de saponificação da amostra (Sedman *et al.*, 1998).

Na determinação de AGT por RMN  $^{13}\text{C}$ , os sinais emitidos por carbonos alílicos e olefínicos tem sido aplicados. Os métodos propostos por Pfeffer *et al.* (1977) e Sacchi *et al.* (1997) baseiam-se nas diferenças de deslocamento químico que existem entre os sinais emitidos por carbonos alílicos à insaturações *trans* (32,6 ppm) e os seus correspondentes para insaturações *cis* (27,3 ppm), que são utilizados para a determinação da razão entre as insaturações *trans* e o total de duplas ligações. Pfeffer *et al.* (1977) demonstraram ainda que é possível determinar a proporção entre os ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados presentes em gorduras parcialmente hidrogenadas, pelas áreas dos sinais provenientes de carbonos que pertencem a um mesmo ambiente químico. Assim, para gorduras com baixos teores de ácidos graxos poliinsaturados, este método permite estimar o teor de AGT.

O método proposto por Miyake & Yokomizo (1998) emprega os sinais emitidos por carbonos olefínicos de ácidos graxos 18:1, que estão situados entre 129,50 e 130,80 ppm, com base nas diferenças de deslocamento químico existentes entre os carbonos de insaturações *cis* e *trans*. Este método permite determinar a proporção de AGT 18:1 em relação ao total de ácidos graxos 18:1, sendo possível obter a composição dos diferentes isômeros presentes na amostra. A comparação entre os resultados obtidos pelo método proposto e a composição determinada através da análise por cromatografia gasosa, demonstrou boa concordância para gorduras hidrogenadas com teores de AGT entre 10,2 a 43,8% do total ácidos graxos.

A aplicação da RMN  $^{13}\text{C}$  na determinação de AGT possibilita a realização da análise sem a necessidade de preparar derivados dos ácidos graxos, contudo o tempo de análise é geralmente superior a 60 minutos. Além disso, o custo do equipamento é elevado e a quantidade de AGT 18:1 deve ser superior a 3% do total de ácidos graxos (Miyake & Yokomizo, 1998).

## 2.5 Ocorrência natural de ácidos graxos *trans*

Os AGT são encontrados em um número considerável de espécies no reino vegetal, ocorrendo principalmente nas sementes, e em menor proporção, nas folhas. Diversas espécies contêm o ácido 16:1 3*t*, incluindo algumas espécies freqüentemente utilizadas na dieta da população brasileira, como o alho, a ervilha, o espinafre, a salsinha e a alface (Tabela 1). Entre os AGTP são encontrados principalmente isômeros geométricos conjugados dos ácidos linoléico e alfa-linolênico, que estão presentes até mesmo em espécies comestíveis, como a abóbora e a romã. Também tem sido observada em diversas espécies a ocorrência de AGTM e AGTP, acetilênicos e hidroxilados (Sommerfeld, 1983; Gunstone *et al.*, 1986).

Tabela 1: Ocorrência de AGT em algumas espécies vegetais

ácido graxo	vegetal	quantidade (% de área relativa)	Referência
16:1 3 <i>t</i>	alface	-	Sommerfeld (1983)
	alho	-	
	ervilha	-	
	espinafre	2,60	
16:1 6 <i>t</i>	salsinha	-	Ackman (1998)
	trevo vermelho	-	
18:3 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> ,13 <i>c</i>	romã	83,0	Takagi & Itabaschi (1981)
	abóbora	17,0	Tulloch (1982)
	andiroba	30,0	Tulloch & Bergter (1979)
18:3 9 <i>c</i> ,11 <i>t</i> ,13 <i>t</i>	romã	83,0	Takagi & Itabaschi (1981)
	andiroba	9,0	Tulloch & Bergter (1979)
18:3 8 <i>t</i> ,10 <i>t</i> ,12 <i>c</i>	calêndula	60,0	Tulloch (1982)

No reino animal, a maioria dos AGT encontrados são oriundos da dieta, embora nos ruminantes e marsupiais estes ácidos sejam produzidos pela ação de microrganismos, cujas enzimas realizam a isomerização e a hidrogenação dos

ácidos graxos poliinsaturados. O principal AGT presente no leite, na carne e no tecido adiposo destes animais, é o vacênico (Sommerfeld, 1983). Na Tabela 2 são apresentados os teores deste ácido graxo em alguns alimentos provenientes de animais ruminantes, e também a concentração do AGT hidroxilado que ocorre na geléia real.

Tabela 2: Ocorrência de AGT em alimentos provenientes de espécies animais

ácido graxo	alimento	quantidade	Referência
10:1 2 <i>t</i> , 10-OH	geléia real	2,5 <sup>a</sup>	Amoedo & Muradian (2003)
	leite de vaca	2,1 <sup>b</sup>	Wolff (1994)
		1,7 <sup>b</sup>	Precht & Molkentin (1995)
	leite de cabra	0,5 <sup>b</sup>	Ledoux <i>et al.</i> (2002)
18:1 11 <i>t</i>	queijo caprino	1,2 <sup>b</sup>	Wolff (1995a)
	queijo ovino	2,6 <sup>b</sup>	Wolff (1995a)
	carne bovina	1,3 <sup>b</sup>	Wolff (1995a)
	sebo bovino	2,9 <sup>b</sup>	Wolff (1995a)

<sup>a</sup>g/100 g; <sup>b</sup>porcentagem de área relativa.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Otimizar as condições para a determinação de AGTM e AGTP (não conjugados) em alimentos, por cromatografia gasosa, com detecção por ionização em chama.

#### 3.2 Objetivos específicos

Adequar a preparação e purificação de ésteres metílicos de AGTP a partir do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum*), visando reduzir os custos associados a padrões empregados na sua identificação.

Efetuar a preparação dos isômeros 18:1 6*t* e 18:1 12*t* diretamente de soluções em heptano de seus ésteres metílicos na configuração *cis*.

Fornecer valores do comprimento equivalente da cadeia (ECL - equivalent chain length) em diferentes temperaturas para ésteres metílicos de AGT, para as colunas CP-Sil 88 e CP Select CB-FAME, pois a literatura em relação a estas colunas utilizadas na separação de isômeros geométricos ainda é escassa.

Quantificar os AGTP em  $\text{mg g}^{-1}$  de amostra, presentes em algumas das marcas de óleo de soja consumidas pela população brasileira e estimar a exatidão da quantificação por meio de testes de recuperação.

Quantificar os AGTM e AGTP em  $\text{mg g}^{-1}$  de amostra, em gorduras parcialmente hidrogenadas e estimar a exatidão da quantificação mediante testes de recuperação.

Propor um sistema para a diferenciação entre ácidos graxos octadecenóicos *cis* e *trans*, baseado em ECL.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Preparação de isômeros geométricos do ácido alfa-linolênico**

#### **4.1.1 Isomerização do óleo de linhaça**

O óleo de linhaça bruto foi adquirido no comércio da cidade de Maringá e foi isomerizado segundo método descrito por Grandgirard *et al.* (1987) com modificações. Cerca de 2,5 g de óleo foram pesados em um béquer de 25 mL (no método original são utilizados ésteres metílicos). Em seguida foram adicionados 2 mL de solução aquosa de nitrito de sódio  $2 \text{ mol L}^{-1}$  (no método original são utilizados 2,5 mL) e 1,6 mL de ácido nítrico  $6 \text{ mol L}^{-1}$ . A reação foi realizada sob agitação a  $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$  (no método original a reação ocorre a  $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A seguir foi adicionado 20 mL de água deionizada e 20 mL de hexano. A mistura foi transferida para um funil de separação e a fase inferior descartada. Cerca de 5 mL de água deionizada foram adicionados, seguidos de agitação. Após a separação das fases, a inferior foi descartada e o procedimento repetido por duas vezes. A fase hexânica foi coletada em um balão e concentrada em evaporador rotativo, a  $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$  até a eliminação do solvente.

#### **4.1.2 Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos**

Os lipídios foram submetidos a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, conforme procedimento descrito por Hartman & Lago (1973) com modificações. Foram adicionados 100 mL de solução de hidróxido de sódio  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  em metanol (no método original são utilizados 20 mL), em um balão contendo aproximadamente 2,0 g de lipídios. A mistura foi aquecida sob refluxo por cerca de 5 min. Em seguida adicionou-se 125 mL do reagente de esterificação (no método original são utilizados 60 mL), preparado a partir da mistura de 4 g de cloreto de amônio, 120 mL de metanol e 6 mL de ácido sulfúrico concentrado, aquecida sob refluxo por cerca de 15 min. Os lipídios saponificados foram aquecidos sob refluxo por 5 min. A seguir a mistura foi transferida para um funil de separação ao qual foram adicionados 60 mL de n-hexano e 120 mL de água deionizada. Agitou-se a

mistura e a fase inferior foi descartada. Adicionou-se 20 mL de água deionizada à fase contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos, agitando-se em seguida. Após a separação das fases, a inferior foi descartada e o procedimento repetido. A fase contendo os ésteres metílicos foi transferida para uma coluna contendo sulfato de sódio anidro, sendo posteriormente concentrada em evaporador rotativo a 35 °C até a eliminação do solvente.

#### **4.1.3 Purificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos**

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram purificados por cromatografia em coluna clássica. O processo foi efetuado em tubo cromatográfico de vidro de 40 cm de comprimento por 1,25 cm de diâmetro interno, contendo 4,5 g de sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck, Alemanha) como adsorvente e 650 mg de ésteres metílicos de ácidos graxos. A coluna foi condicionada com éter de petróleo e a eluição dos ésteres metílicos foi realizada com cerca de 100 mL da mistura éter de petróleo/éter dietílico (95:5, v/v). Foram coletadas frações de 10 mL, que foram reunidas após a verificação da sua semelhança. Esta etapa foi efetuada por CCD, tendo como eluente a mistura éter de petróleo/éter dietílico (90:10, v/v). As placas foram reveladas com a mistura de ácido sulfúrico concentrado e metanol (1:1, v/v), seguido de posterior aquecimento a 150 °C.

#### **4.1.4 Preparação de ésteres isopropílicos de ácidos graxos**

Os ésteres isopropílicos de ácidos graxos foram preparados de acordo com o método descrito por Wolff & Sébédio (1991), com modificações. Cerca de 30 mg de ésteres metílicos de ácidos graxos foram dissolvidos em 1,5 mL de n-heptano (no método original são utilizados 2,5 mL) e adicionados a um tubo de ensaio com tampa rosqueável. Em seguida foi adicionado 1,7 mL de isopropanol e 0,25 mL de ácido sulfúrico concentrado. O tubo contendo a mistura foi colocado em banho de água em ebulição por 100 min (no método original a reação ocorre por 60 min), sendo agitado a cada 10 min. A seguir, adicionou-se 5 mL de água deionizada e o tubo foi agitado vigorosamente. Após a separação das fases, a superior foi

transferida para uma coluna contendo sulfato de sódio anidro, sendo posteriormente armazenada a -18 °C.

## **4.2 Identificação dos ésteres de ácidos graxos e confirmação da isomerização**

### **4.2.1 Análise cromatográfica dos ésteres de ácidos graxos**

Os ésteres de ácidos graxos foram analisados por um cromatógrafo a gás 14-A (Shimadzu, Japão), equipado com detector de ionização em chama e coluna capilar de sílica fundida CP Sil-88 (50 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de bis-cianopropil polisiloxano; Varian, EUA). As velocidades de fluxo dos gases foram de 0,9 mL min<sup>-1</sup> para o gás de arraste (hidrogênio); 30 mL min<sup>-1</sup> para o gás auxiliar (nitrogênio), 30 e 300 mL min<sup>-1</sup> para os gases da chama, hidrogênio e ar sintético, respectivamente. A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/50. As temperaturas do injetor e do detector foram 250 °C. A temperatura da coluna foi de 150 °C por 45 min para a análise dos ésteres metílicos, e 165 °C por 35 min para os ésteres isopropílicos. As áreas dos picos foram determinadas com o Integrador-Processador CG-300 (Instrumentos Científicos CG). Foram determinados os valores do comprimento equivalente da cadeia (ECL) para os ésteres de ácidos graxos, conforme proposto por Ackman (1972), empregando como compostos de referência os ésteres dos ácidos 16:0, 18:0 e 21:0, para os ésteres metílicos, e o 16:0, 18:0 e 20:0 para os ésteres isopropílicos. A identificação dos isômeros geométricos dos ésteres do ácido alfa-linolênico foi efetuada através da comparação entre os valores de ECL obtidos e os valores relatados por Wolff (1992b). Para os demais ésteres metílicos de ácidos graxos, a identificação foi baseada também nos valores de ECL que foram determinados para as misturas padrão 189-19 e L8404 (Sigma, EUA).

### **4.2.2 Análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos por espectrofotometria no infravermelho**

Os espectros de transmitância na região do infravermelho foram registrados em um espectrofotômetro BOMEM, modelo MB-séries (Suíça), em cela de KBr, na



região de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Aproximadamente 50 mg de ésteres metílicos foram espalhados na cela de modo a formar um filme líquido. Como referência foi utilizada a banda de transmitância em 1601  $\text{cm}^{-1}$  de um filme de poliestireno.

#### **4.2.3 Análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos por RMN de $^{13}\text{C}$**

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  foram obtidos em espectrômetro VARIAN modelo MERCURY plus BB (EUA), operando a 75,45 MHz. Cerca de 50 mg de ésteres metílicos foram dissolvidos em 0,5 mL de clorofórmio deuterado (Aldrich), contendo tetrametilsilano como referência interna. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm e os parâmetros para a aquisição dos sinais foram os seguintes: janela espectral de 250 ppm, tempo de aquisição de 0,6 s, tempo de relaxamento de 1,0 s e a aquisição foi desenvolvida com um acúmulo de 1000 repetições.

#### **4.3 Preparação de isômeros geométricos dos ácidos 18:1 6c e 18:1 12c**

Cerca de 10 g de semente de salsinha (*Petroselinum crispum*) foram adquiridas no comércio de Maringá, sendo a matéria lipídica extraída com uma mistura de clorofórmio e metanol (2:1, v/v), de acordo com Folch *et al.* (1956). A preparação de ésteres metílicos foi efetuada de acordo com o método 5509 da ISO (1978). Para a isomerização do éster metílico do ácido petroselínico (18:1 6c) foi adicionado em tubo de ensaio com tampa rosqueável, 100  $\mu\text{L}$  de solução em n-heptano dos ésteres metílicos obtidos (aproximadamente 6 mg), 50  $\mu\text{L}$  da solução aquosa de nitrito de sódio 2  $\text{mol L}^{-1}$  e 50  $\mu\text{L}$  de ácido nítrico 6  $\text{mol L}^{-1}$ . A reação foi realizada a 50  $^{\circ}\text{C}$ , em banho de água, por 15 min. Após o resfriamento do tubo, foram adicionados, 1 mL de n-heptano e 1 mL de solução saturada de NaCl, sendo agitado em seguida. A fase superior contendo os ésteres metílicos foi coletada sendo armazenada a  $-18^{\circ}\text{C}$ , para uso posterior.

O éster metílico padrão do ácido 18:1 12c (Sigma, EUA), foi utilizado na obtenção de seu isômero geométrico. Foi preparada uma solução em n-heptano deste éster, na concentração de 50  $\text{mg mL}^{-1}$ , sendo empregada de forma semelhante a descrita para a isomerização do éster do ácido petroselínico.

#### **4.4 Confirmação da isomerização do ácido 18:1 6c por RMN <sup>13</sup>C**

Os espectros de RMN <sup>13</sup>C foram obtidos em espectrômetro VARIAN modelo MERCURY plus BB (EUA), operando a 75,45 MHz. Cerca de 20 mg de ésteres metílicos foram dissolvidos em 0,5 mL de clorofórmio deuterado (Aldrich, EUA), contendo tetrametilsilano como referência interna. Os deslocamentos químicos foram dados em ppm e os parâmetros para a aquisição dos sinais foram os seguintes: janela espectral de 250 ppm, tempo de aquisição de 0,6 s, tempo de relaxamento de 1,0 s e a aquisição foi desenvolvida com um acúmulo aproximado de 1200 repetições.

#### **4.5 Separação de ácidos graxos octadecenóicos *cis* e *trans* por CCD/Ag<sup>+</sup>**

As placas preparativas, com dimensões de 10 x 20 cm, foram preparadas com sílica gel 60 G (Merck), sendo posteriormente submetidas à impregnação com solução 10% de nitrato de prata em acetonitrila, por cerca de 30 min (Ratnayake, 1998). Após a evaporação do solvente, as placas foram submetidas a ativação por cerca de 1 hora a 110 °C, sendo então acondicionadas em caixas de papel até a sua utilização.

Foram aplicados 30 µL de uma solução em torno de 25% (m/v) de ésteres metílicos de ácidos graxos de gordura hidrogenada, em heptano. A eluição foi efetuada com uma mistura de hexano-éter dietílico (90:10 v/v) na temperatura de 5 °C. Após a eluição, a placa foi borrifada com uma solução 0,2% (m/v) de 2',7'-diclorofluoresceína em etanol e observada sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm. As frações obtidas foram marcadas, sendo então removidas da placa. Adicionou-se 5 mL de metanol e 1 mL de solução 9% (m/v) de cloreto de sódio, agitando-se em seguida por 5 min. Após a adição de 3 mL de água e 5 mL de n-heptano, seguidos de agitação, os ésteres metílicos foram recuperados. O volume da solução de ésteres metílicos obtidos, foi reduzido a 200 µL, e armazenado a -18° C para posterior análise.

#### **4.6 Otimização das condições de análise de AGTP para a coluna CP Sil-88**

Foram determinados os valores de ECL nas temperaturas de 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195 e 200 °C, para os ésteres metílicos dos seguintes ácidos: araquídico (20:0), gondóico (20:1 11c), linoléico e alfa-linolênico, e seus isômeros geométricos. O método utilizado foi descrito por Ackman (1972) e os compostos de referência foram os ésteres metílicos dos ácidos 16:0, 18:0 e 21:0. As análises para a determinação dos valores de ECL foram efetuadas com seis repetições, através de um cromatógrafo a gás (especificado em 4.2.1) com coluna capilar CP Sil-88 (50 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de bis-cianopropil polisiloxano; Varian, EUA). As velocidades de fluxo dos gases foram de 1,2 mL min<sup>-1</sup> para o gás de arraste (hidrogênio), 30 mL min<sup>-1</sup> para o gás auxiliar (nitrogênio), 30 e 300 mL min<sup>-1</sup> para o hidrogênio e ar sintético, respectivamente. A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/50 e as temperaturas do injetor e do detector foram 225 °C. A coluna foi mantida isotermicamente por 35 min nas temperaturas em que se desejava obter o ECL. A partir dos valores médios de ECL nas temperaturas avaliadas, foi determinada para cada éster, a equação de regressão linear e o coeficiente de correlação, utilizando o *software* Microcal Origin (versão 6.0). A otimização da temperatura de análise foi baseada na regressão linear das diferenças de ECL entre os ésteres de ácidos graxos que poderiam coeluir no intervalo de temperatura estudado.

#### **4.7 Otimização das condições de análise de AGTM e AGTP para a coluna CP Select CB-FAME**

Foram determinados os valores de ECL nas temperaturas de 155, 165, 175, 185, 195 e 200°C, para os ésteres metílicos dos ácidos: 18:1 6*t*, 18:1 9*t*, 18:1 11*t*, 18:1 12*t*, 18:1 13*t*, 18:1 15*t*, 18:1 16*t*, 18:1 6*c*, 18:1 9*c*, 18:1 11*c*, 18:1 12*c*, 18:1 13*c*, 18:1 14*c* e 18:1 15*c*. Para os ésteres metílicos dos ácidos linoléico, alfa-linolênico e seus respectivos isômeros geométricos, os valores de ECL foram obtidos nas temperaturas de 170, 180, 190 e 200°C. O método utilizado foi descrito por Ackman (1972) e os compostos de referência foram os ésteres metílicos dos ácidos 16:0, 17:0 e 19:0 para os ésteres dos ácidos octadecenóicos, e 17:0, 18:0 e 21:0 para os

ésteres dos ácidos 18:2 e 18:3. As análises para a determinação dos valores de ECL foram efetuadas com cinco repetições, em um cromatógrafo gasoso CP 3380 (Varian, EUA), equipado com coluna capilar de sílica fundida CP-Select CB-FAME (100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de fase estacionária; Varian, EUA) e detector de ionização em chama. As velocidades de fluxos dos gases foram de 0,7  $\text{mL min}^{-1}$  para o gás de arraste (hidrogênio), 30  $\text{mL min}^{-1}$  para o gás auxiliar (nitrogênio), 30 e 300  $\text{mL min}^{-1}$  para os gases da chama, hidrogênio e ar sintético, respectivamente. A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/100. A coluna foi mantida isotermicamente por até 70 min, na temperatura em que se desejava obter o ECL. A partir dos valores médios de ECL nas temperaturas avaliadas, foi determinada para cada éster, a equação de regressão linear e o coeficiente de correlação, utilizando o *software* Microcal Origin (versão 6.0). A otimização da temperatura de análise foi baseada na regressão linear das diferenças de ECL entre os ésteres de ácidos graxos que poderiam coeluir no intervalo de temperatura estudado.

#### **4.8 Quantificação de AGTP em óleo de soja refinado**

##### **4.8.1 Amostragem**

Foram analisadas cinco marcas de óleo de soja, comercializadas em diferentes supermercados da região de Maringá. As marcas foram designadas pelas letras A, B, C, D e E, sendo avaliados 4 lotes por marca e duas unidades por lote. Cada lote foi analisado separadamente em triplicata.

##### **4.8.2 Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos**

A preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos foi efetuada conforme método de Hartman & Lago (1972), adaptado por Maia & Rodriguez-Amaya (1993). Foram pesados em tubo de ensaio com tampa rosqueável  $30 \pm 1$  mg de óleo de soja e adicionados 500  $\mu\text{L}$  de solução 0,5  $\text{mg mL}^{-1}$  de tricosanoato de metila em n-heptano. Após a evaporação do solvente sob fluxo de nitrogênio, os lipídios foram saponificados em solução 0,5  $\text{mol L}^{-1}$  de hidróxido de sódio em metanol e

esterificados com uma mistura constituída de cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico na proporção de 1:30:1,5 (m/v/v). Após a adição de 4 mL de solução saturada de cloreto de sódio, os ésteres foram extraídos com 1 mL de n-heptano e armazenados em congelador (-18 °C) para posterior análise cromatográfica.

#### **4.8.3 Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos**

Os ésteres de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo gasoso 14-A (Shimadzu, Japão), equipado com coluna capilar de sílica fundida CP Sil-88 (50 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de bis-cianopropil polisiloxano; Varian, EUA) e detector de ionização em chama. As velocidades de fluxos dos gases foram de 1,2 mL min<sup>-1</sup> para o gás de arraste (hidrogênio), 30 mL min<sup>-1</sup> para o gás auxiliar (nitrogênio), 30 e 300 mL min<sup>-1</sup> para os gases da chama, hidrogênio e ar sintético, respectivamente. A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/50. A temperatura da coluna foi de 170 °C por 14 min, sendo então elevada para 225 °C a uma taxa de 15 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo nesta temperatura por 10 min. As temperaturas do injetor e detector foram 225 °C e 245 °C, respectivamente. As injeções foram realizadas em triplicata e o volume de injeção foi de 2 µL. As áreas dos picos foram determinadas utilizando-se um Integrador-Processador CG-300 (Instrumentos Científicos CG). A identificação dos ácidos graxos foi baseada na comparação dos tempos de retenção com o de ésteres metílicos de misturas padrão contendo os isômeros geométricos dos ácidos linoléico (Sigma, EUA) e alfa-linolênico e nos valores do comprimento equivalente da cadeia (ECL).

#### **4.8.4 Quantificação**

A quantificação dos AGTP e do alfa-linolênico, em mg g<sup>-1</sup>, foi efetuada em relação ao padrão interno, tricosanoato de metila (23:0), da marca Sigma (EUA). Foram determinados os fatores de resposta para os ésteres metílicos padrão dos ácidos graxos 20:0 e 22:0 (Sigma, EUA), pela análise de suas soluções em n-heptano, nas concentrações de 0,25 e 0,50 mg mL<sup>-1</sup>, contendo 0,25 mg mL<sup>-1</sup> de tricosanoato de metila. Estes fatores foram obtidos a partir da média de seis repetições, utilizando a equação (01), determinada segundo o método de Joseph & Ackman (1992).

$$F_R = \frac{A_{23:0} \cdot C_X}{A_X \cdot C_{23:0}} \quad (01)$$

sendo:

$F_R$  = fator de resposta em relação ao padrão interno;

$A_{23:0}$  = área do padrão interno;

$A_X$  = área do éster metílico de ácido graxo;

$C_{23:0}$  = concentração do padrão interno;

$C_X$  = concentração do éster metílico ácido graxo.

Para avaliar as condições de resposta do detector de ionização em chama, os fatores de resposta teóricos para os ésteres metílicos dos ácidos graxos 20:0, 22:0, 18:2 9c,12c e 18:3 9c,12c,15c foram calculados em relação ao tricosanoato de metila, conforme método proposto por Ackman (1972). Em seguida, os fatores de resposta para os ésteres metílicos dos ácidos linoléico e alfa-linolênico foram determinados, mediante a análise da mistura padrão 189-19 (Sigma, EUA) em n-heptano, contendo estes ésteres e o tricosanoato de metila na concentração de 0,25 mg mL<sup>-1</sup>.

A quantificação dos AGTP e do alfa-linolênico contidos nas amostras de óleo de soja foi realizada após a verificação da concordância entre os fatores de resposta teórico e experimental, para a faixa de concentração a ser utilizada. A partir de soluções dos ésteres metílicos dos ácidos 20:0 e 23:0, nas concentrações de 6,0 e 1,0 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, foram preparadas soluções de 20:0 nas concentrações de 4,50; 3,60; 2,57; 1,69; 1,13; 0,90; 0,64; 0,45; 0,30; 0,23; 0,16; 0,11; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 mg.mL<sup>-1</sup> todas contendo 0,25 mg mL<sup>-1</sup> de tricosanoato de metila. Estas soluções foram analisadas em duplicata, sendo injetado o volume de 2,0 µL. Plotando-se a razão entre as áreas do araquidato de metila (20:0) e tricosanoato de metila em função da concentração de araquidato de metila, foi possível determinar os fatores de resposta para as faixas de concentração de 4,50-0,30 e 0,30-0,02, a partir do coeficiente angular da curva, empregando a equação (01).

Os cálculos da concentração dos AGTP 18:2, 18:3 e do ácido alfa-linolênico contidos no óleo de soja refinado foram realizados de forma similar a metodologia proposta por Joseph & Ackman (1992), conforme a equação (02):

$$C \text{ (mg/g)} = \frac{A_X \cdot M_{23:0} \cdot F_{RT}}{A_{23:0} \cdot M_A \cdot F_{CT}} \quad (02)$$

sendo:

$A_X$  = área dos ésteres metílicos dos AGTP 18:2, 18:3 ou do ácido alfa-linolênico;

$A_{23:0}$  = área do padrão interno;

$M_{23:0}$  = massa do padrão interno adicionado a amostra (em miligramas);

$M_A$  = massa da amostra (em gramas);

$F_{RT}$  = fator de resposta teórico dos ésteres metílicos dos ácidos 18:2 ou 18:3;

$F_{CT}$  = fator de conversão para expressar os resultados em mg de triacilgliceróis/g de lipídios totais a partir dos ésteres metílicos dos AGTP 18:2, 18:3 e do ácido alfa-linolênico. Foi empregado o valor de 1,0046.

Os limites de detecção e quantificação foram estimados conforme recomendação da ACS (1980), considerando a razão sinal ruído igual a três e dez, respectivamente, a partir de diluições sucessivas de uma solução padrão de araquidato de metila.

A exatidão foi estimada pela realização de testes de recuperação. Após a determinação da concentração de ácido araquídico em  $\text{mg g}^{-1}$  de óleo de soja, acrescentou-se em cinco replicatas e separadamente, quantidades conhecidas do padrão de ácido araquídico ao óleo de soja e procedeu-se a metilação. As porcentagens de recuperação foram determinadas pela equação (03):

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_A}{C_{AO} + C_{AD}} \cdot 100 \quad (03)$$

sendo:

$C_A$  = concentração de ácido araquídico determinada na amostra de óleo de soja fortificada;

$C_{AO}$  = concentração de ácido araquídico determinada no óleo de soja;

$C_{AD}$  = concentração de ácido araquídico adicionado ao óleo de soja.

#### **4.8.5 Determinação do grau de isomerização do ácido alfa-linolênico**

O grau de isomerização (GI) do ácido alfa-linolênico foi calculado a partir da razão entre a concentração de seus isômeros *trans* e a concentração total da formas *cis* e *trans*, conforme a equação (04), proposta por Dionisi *et al.*, (2002).

$$GI = \frac{18:3 \text{ trans}}{(18:3 n-3 + 18:3 \text{ trans})} \quad (04)$$

#### **4.8.6 Análise Estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) a 5% de probabilidade, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com o *software* Statistica, versão 5.0.

### **4.9 Quantificação de AGTM e AGTP em gorduras parcialmente hidrogenadas**

#### **4.9.1 Obtenção das amostras**

Foram analisadas gorduras hidrogenadas com diferentes graus de hidrogenação, que haviam sido encaminhadas para a análise no Laboratório de Águas e Alimentos, da Universidade Estadual de Maringá. As análises foram efetuadas em triplicata.

#### **4.9.2 Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos**

A preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos foi efetuada conforme Hartman & Lago (1972) e adaptado por Maia & Rodriguez-Amaya (1993). Foram pesados em tubo de ensaio com tampa rosqueável  $25 \pm 1$  mg de óleo de soja e adicionados 500  $\mu\text{L}$  de solução  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  de tricosanoato de metila em n-heptano. Após a preparação, os ésteres foram extraídos com 1 mL de n-heptano e armazenados em congelador ( $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ ) para posterior análise cromatográfica.



### **4.9.3 Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos**

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo gasoso CP 3380 (Varian, Estados Unidos), equipado com coluna capilar de sílica fundida CP-Select CB-FAME (100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de fase estacionária) e detector de ionização em chama. As velocidades de fluxos dos gases foram de 0,6  $\text{mL min}^{-1}$  para o gás de arraste (hidrogênio), 30  $\text{mL min}^{-1}$  para o gás auxiliar (nitrogênio), 30 e 300  $\text{mL min}^{-1}$  para os gases da chama, hidrogênio e ar sintético, respectivamente. A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/100. A temperatura da coluna foi de 197  $^{\circ}\text{C}$  por 23 min, sendo então elevada para 225  $^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de 20  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , permanecendo nesta temperatura por 15 min. As temperaturas do injetor e detector foram 240  $^{\circ}\text{C}$ . As injeções foram realizadas em duplicata e o volume de injeção foi de 2,0  $\mu\text{L}$ . As áreas dos picos foram determinadas através do software Workstation versão 5.0 (Varian). A identificação dos ácidos graxos foi baseada na comparação dos tempos de retenção com o de ésteres metílicos: de misturas padrão obtidas da Sigma (EUA); de misturas contendo os isômeros geométricos de ésteres dos ácidos oléico, linoléico e alfa-linolênico, preparadas a partir do óleo de linhaça; de misturas de ésteres dos ácidos 18:1*t* e 18:1*c*, separados por CCD/Ag<sup>+</sup>. Para fins de identificação, foram ainda determinados os valores de ECL para todos os ácidos graxos quantificados (Ackman, 1972), empregando os ésteres metílicos dos ácidos graxos 16:0, 18:0 e 21:0 como compostos de referência. Os valores obtidos foram comparados com os valores de ECL determinados para os ésteres de misturas padrão.

### **4.9.4 Quantificação**

A quantificação dos AGTM e AGTP, em  $\text{mg g}^{-1}$  foi realizada empregando o tricosanoato de metila (Sigma, EUA) como padrão interno. Inicialmente foram determinados os fatores de resposta para os ésteres metílicos dos ácidos 18:1 9*t*, 18:2 9*c*,12*c*, 18:3 9*c*,12*c*,15*c*, 20:0, 21:0 e 22:0 pela análise da mistura padrão 189-19 (Sigma, EUA) em n-heptano, na qual os ésteres insaturados e o 21:0 estavam na concentração de 0,50  $\text{mg mL}^{-1}$ , os ésteres 20:0 e 22:0 em 1,00  $\text{mg mL}^{-1}$ , tendo o tricosanoato de metila na concentração de 0,50  $\text{mg mL}^{-1}$ .

A avaliação da concordância entre os fatores de resposta experimental e teórico, foi efetuada na faixa de concentração a ser utilizada para a quantificação. Assim, a partir de soluções dos ésteres metílicos dos ácidos 18:1 9*t* e 23:0, nas concentrações de 18,3 e 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente, foram preparadas soluções de 18:1 9*t* nas concentrações de 6,86; 4,58; 3,05; 1,53; 1,02; 0,86; 0,65; 0,51; 0,31; 0,24; 0,15; 0,10; 0,06; 0,03 mg.mL<sup>-1</sup>, todas contendo 0,50 mg mL<sup>-1</sup>. Estas soluções foram analisadas em duplicata, sendo injetado o volume de 2,0 µL. Plotando-se a razão entre as áreas do elaidato de metila e tricosanoato de metila em função da concentração de elaidato de metila, foi possível determinar os fatores de resposta para as faixas de concentração de 6,86-0,65 e 0,65-0,03, a partir do coeficiente angular da curva, empregando a equação (01).

Os cálculos da concentração dos AGT 18:1, 18:2 e 18:3 foram realizados pela equação (02), utilizando os seguintes valores de  $F_{RT}$ : 1,028 para o 18:1 9*t*, 1,021 para o 18:2 9*c*,12*c*; 1,014 para o 18:3 9*c*,12*c*,15*c*. Para o termo  $F_{CT}$  foi empregado o valor de 1,0046 para todos os ésteres.

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos a partir da análise de uma solução padrão de elaidato de metila, diluída sucessivamente, considerando a razão sinal ruído igual a três e dez respectivamente, de acordo com a recomendação da ACS (1980).

A exatidão da quantificação foi estimada mediante a realização de testes de recuperação. Após a determinação da concentração do ácido eláidico em algumas amostras de gorduras parcialmente hidrogenadas, foram acrescentadas a três amostras, contendo diferentes concentrações deste ácido, quantidades conhecidas de elaidato de metila, distribuídas em cinco replicatas por amostra. Para o ácido 18:1 13*t* utilizou-se uma amostra em que não foi detectado a sua presença. Esta amostra foi dividida em dois grupos, que receberam quantidades diferentes do ácido 18:1 13*t*, sendo efetuadas cinco replicatas para cada grupo. A porcentagem de recuperação foi calculada de modo semelhante ao descrito no item 4.8.4.

#### **4.9.5 Análise Estatística**

As correlações entre as concentrações dos AGTM e AGT, AGTP e AGT, 18:2 9*c*,12*t* e 18:2 9*t*,12*c* foram examinadas através do *software* Statistica, versão 5.0, sendo consideradas significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Identificação dos ésteres de ácidos graxos e confirmação da isomerização

Na Figura 9 são apresentados os valores de ECL para os ésteres metílicos do ácido alfa-linolênico (18:3 9 $c$ ,12 $c$ ,15 $c$ ) e de seus isômeros geométricos, obtidos no presente estudo e por Wolff (1992b), com a coluna capilar CP-Sil 88, por meio da análise isotérmica a 150°C (Anexo I). Esta comparação permitiu reconhecer a ordem de eluição destes ácidos graxos, indicando que os ácidos graxos 18:3 9 $c$ ,12 $t$ ,15 $t$  e 18:3 9 $t$ ,12 $c$ ,15 $t$  coeluíram nesta condição.

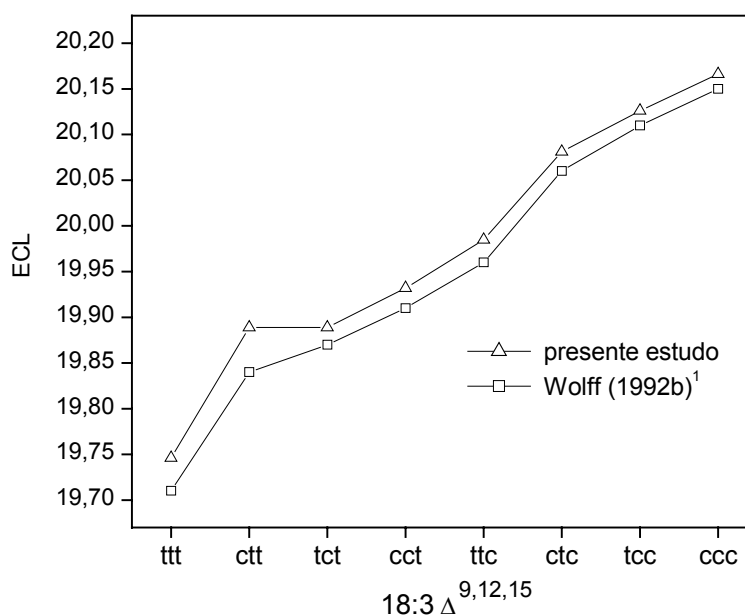


Figura 9: Comparação dos valores de ECL obtidos no presente estudo e por Wolff (1992b) para ésteres metílicos do ácido alfa-linolênico e seus isômeros geométricos; coluna CP Sil-88; análise isotérmica a 150 °C; <sup>1</sup>ECL de *tct* foi obtido separadamente.

Com a conversão dos ésteres metílicos do ácido alfa-linolênico e de seus isômeros geométricos em ésteres isopropílicos, foi possível separar estes isômeros *di-trans* (Anexo II). Na Figura 10, são apresentados os valores de ECL para os ésteres isopropílicos do ácido alfa-linolênico e de seus isômeros geométricos, obtidos no presente estudo e por Wolff (1992b) através da análise isotérmica a 165 °C, empregando também a coluna CP-Sil 88. Esta condição possibilitou a separação de todos os isômeros geométricos do ácido alfa-linolênico.

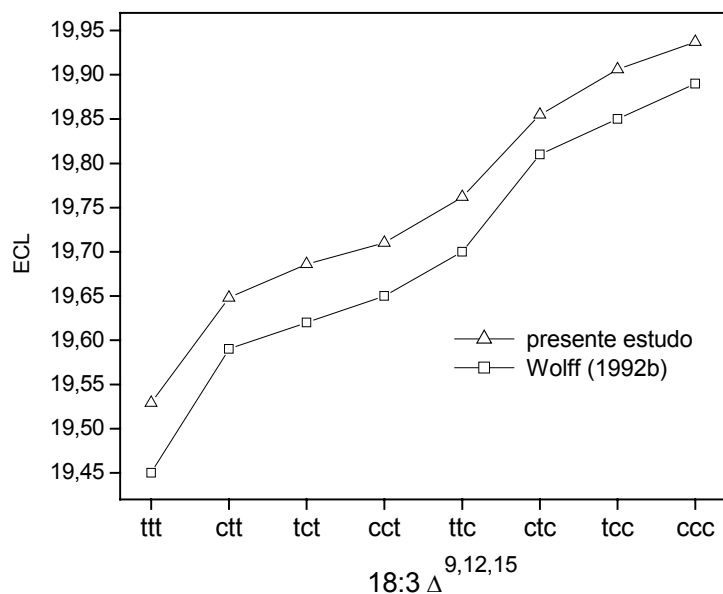


Figura 10: Comparação dos valores de ECL obtidos neste estudo e por Wolff (1992b) para ésteres isopropílicos do ácido alfa-linolênico e seus isômeros geométricos; coluna CP Sil-88; análise isotérmica a 165 °C.

Com o objetivo de confirmar a isomerização das insaturações *cis*, foi obtido o espectro no infravermelho para os ésteres metílicos do óleo de linhaça não isomerizado e isomerizado (Figura 11). A avaliação destes espectros indica a presença após a reação de isomerização, da banda característica de insaturações *trans* em 968  $\text{cm}^{-1}$ . É observada também a diminuição na intensidade de absorção da banda relacionada com insaturações *cis*, em 722  $\text{cm}^{-1}$  (Mossoba *et al.*, 1991).

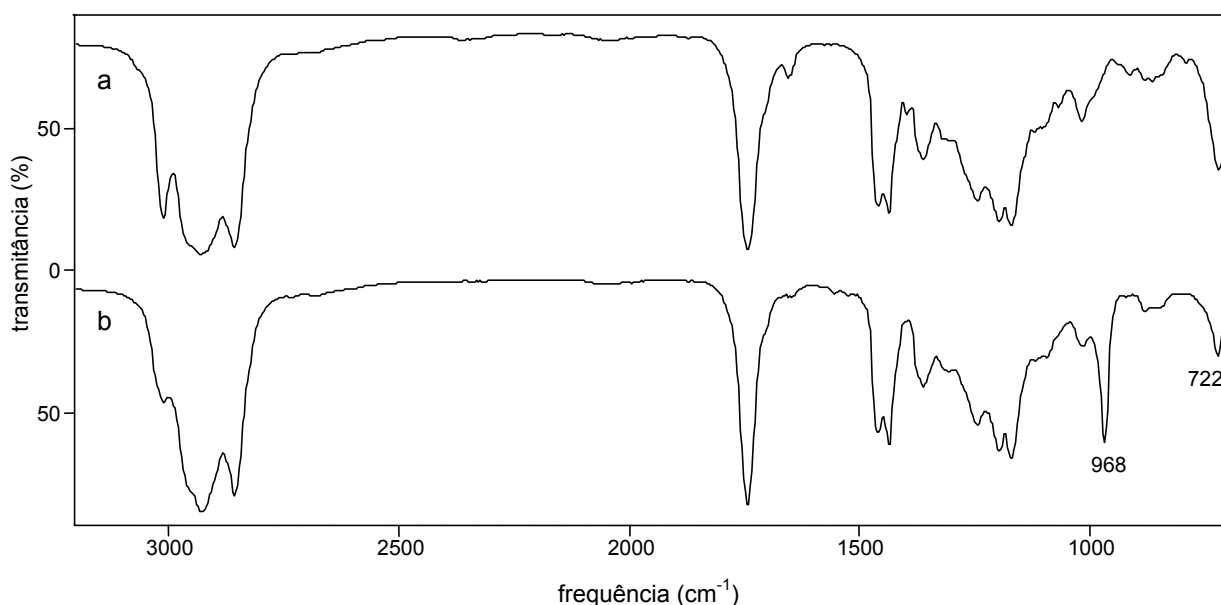


Figura 11: Espectros no infravermelho dos ésteres metílicos do óleo de linhaça: (a) não isomerizado e (b) isomerizado.

A análise de RMN  $^{13}\text{C}$  para os ésteres metílicos do óleo de linhaça não isomerizado e isomerizado (Figura 12), permitiu confirmar a formação de ésteres de ácidos graxos mono-*trans* e di-*trans*. A comparação entre os espectros indica uma expressiva mudança na região de carbonos olefínicos (127-133 ppm), destacando-se o sinal em 132,7 ppm que aparece após a isomerização. Este sinal é característico de insaturações *trans* terminais, em ésteres de ácidos graxos n-3 (Rakoff & Emken, 1982; Aursand & Grasdalen, 1992).

Na região de carbonos metilênicos (20-36 ppm) observa-se a presença de sinais em 35,6 ppm, 32,5 ppm e 30,4 ppm, após a reação de isomerização. O sinal em 35,6 ppm é característico de carbonos alílicos a duas insaturações *trans*, enquanto que o de 32,5 ppm está relacionado com carbonos alílicos a apenas uma insaturação *trans*. O sinal em 30,4 ppm é resultante de carbonos alílicos a duas insaturações, sendo uma *cis* e a outra *trans* (Pfeffer *et al.*, 1977; Gunstone *et al.*, 1977; Rakoff & Emken, 1982).

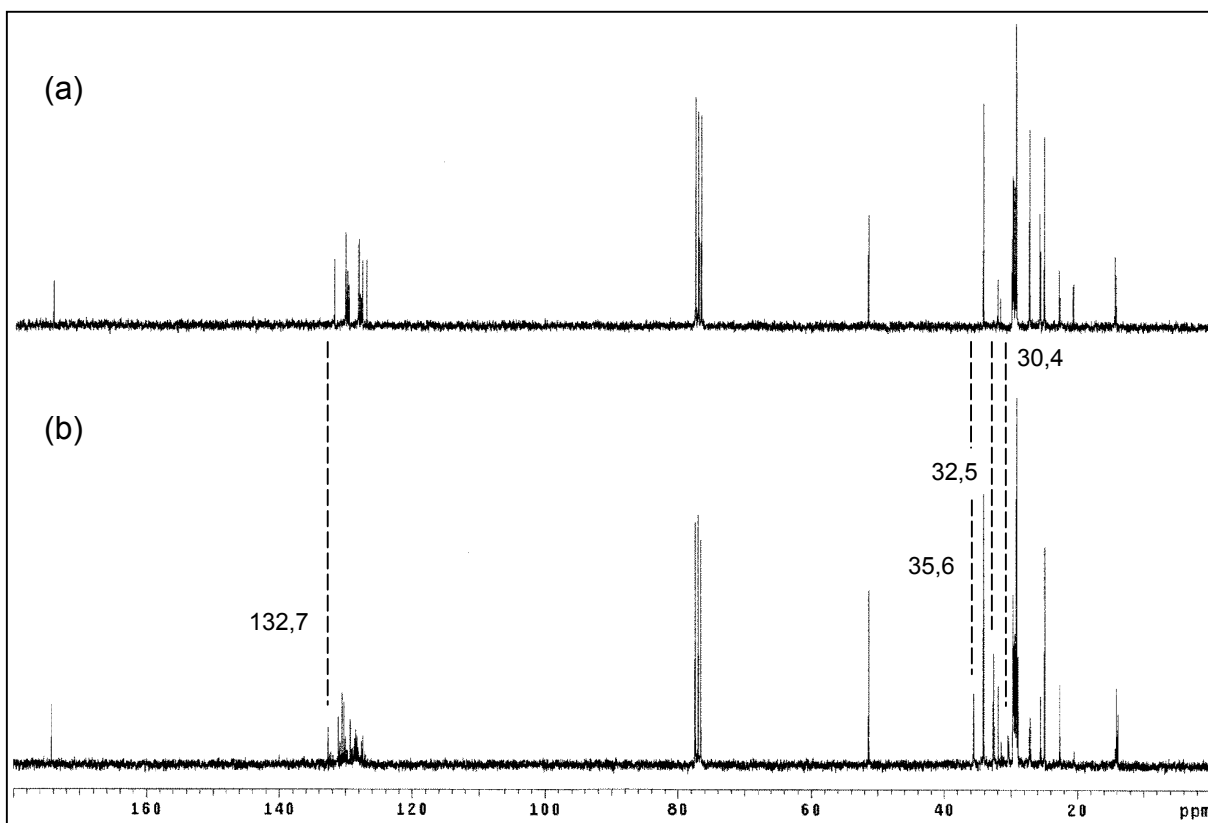


Figura 12: Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  dos ésteres metílicos do óleo de linhaça: (a) não isomerizado e (b) isomerizado.

## 5.2 Confirmação da isomerização do ácido 18:1 6c por RMN $^{13}\text{C}$

A análise por RMN  $^{13}\text{C}$  dos ésteres metílicos dos ácidos graxos provenientes da salsinha, efetuada antes e após a reação de isomerização, permitiu confirmar a formação do ácido 18:1 6*t* (Figura 13). Na região de carbonos olefínicos ( $\text{C}_6$  e  $\text{C}_7$ ), ocorreu o deslocamento dos sinais após a isomerização (Tabela 3), passando de 129,28 e 130,71 ppm para 129,75 e 131,21 ppm, respectivamente. Também foi observado, a presença de sinais em 32,39 e 32,81 ppm após a isomerização. Estes sinais são característicos de carbonos alílicos ( $\text{C}_5$  e  $\text{C}_8$ ) a uma insaturação *trans*. Os valores de deslocamento químico obtidos neste estudo apresentaram diferenças entre 0,10 e 0,16 ppm em relação aos valores determinados por Bus *et al.* (1977). A comparação com os valores obtidos por Gunstone *et al.* (1977) mostrou diferenças de 0,10 a 0,18 para carbonos alílicos e de 0,08 a 0,26 para carbonos olefínicos.

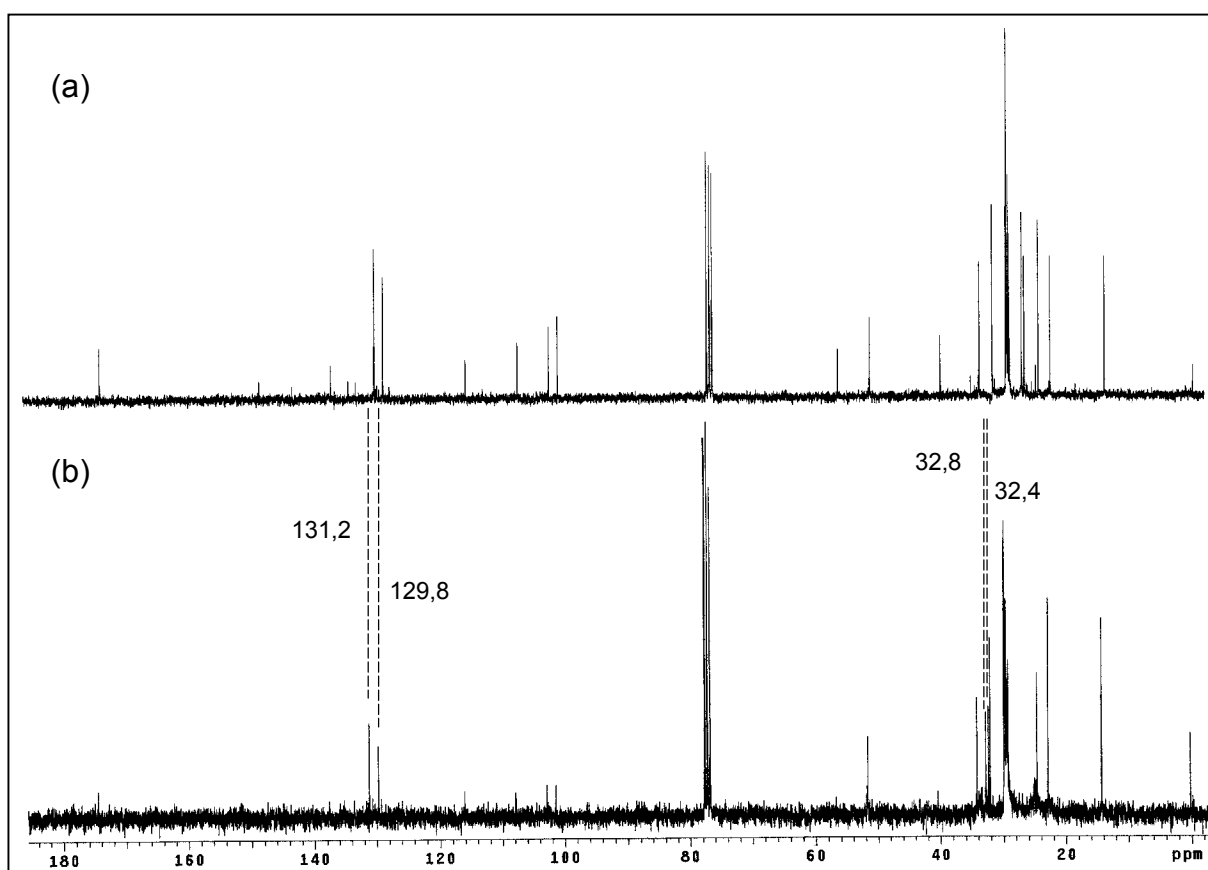


Figura 13: Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de ésteres metílicos dos ácidos graxos da salsinha: (a) não isomerizada e (b) isomerizada.

Tabela 3: Deslocamentos químicos de ésteres metílicos dos ácidos graxos da salsinha isomerizada e não-isomerizada analisados por RMN  $^{13}\text{C}$ 

Éster metílico	Carbonos	Deslocamentos obtidos	Literatura	
			(1)	(2)
18:1 6 <i>t</i>	C <sub>6</sub>	129,75	129,65	129,49
	C <sub>7</sub>	131,21	131,10	131,13
	C <sub>5</sub>	32,39	-	32,21
	C <sub>8</sub>	32,81	-	32,67
18:1 6 <i>c</i>	C <sub>6</sub>	129,28	129,15	129,01
	C <sub>7</sub>	130,71	130,55	130,62
	C <sub>5</sub>	27,04	-	26,88
	C <sub>8</sub>	27,46	-	27,36

(1) Bus *et al.* (1977) – ésteres metílicos; (2) Gunstone *et al.* (1977) – ácidos graxos.

### 5.3 Otimização das condições para a análise cromatográfica de AGTP empregando a coluna CP Sil-88

Na Figura 14 é apresentado o gráfico de ECL em função das temperaturas de análise, para os isômeros geométricos do ácido alfa-linolênico (18:3 9*c*,12*c*,15*c*) presentes em óleos vegetais refinados e para os ácidos araquídico (20:0), gondóico (20:1 11*c*) e alfa-linolênico (Anexos III e IV).

A análise das curvas demonstra que embora a separação dos quatro isômeros geométricos do ácido alfa-linolênico seja possível em temperaturas inferiores à 165 °C, esta condição não é adequada devido à coeluição do ácido 18:3 9*t*,12*c*,15*t* com o ácido araquídico, em torno da temperatura de 160 °C. Além deste fator, a análise em temperaturas inferiores a 160 °C ocasiona um alargamento dos picos, resultando em aumento do limite de detecção, sendo portanto, indesejável.

Na Figura 15 é apresentado o gráfico de ECL em função das temperaturas de análise, para os ésteres metílicos do ácido linoléico (18:2 9*c*,12*c*) e seus isômeros geométricos (Anexos III e IV). Observa-se um aumento na resolução dos ácidos 18:2 9*c*,12*c* e 18:2 9*t*,12*c* a medida que a temperatura aumenta. Contudo, não se verifica

a alteração na resolução entre os ácidos 18:2 9c,12t e 18:2 9t,12c, no intervalo de temperatura estudado.

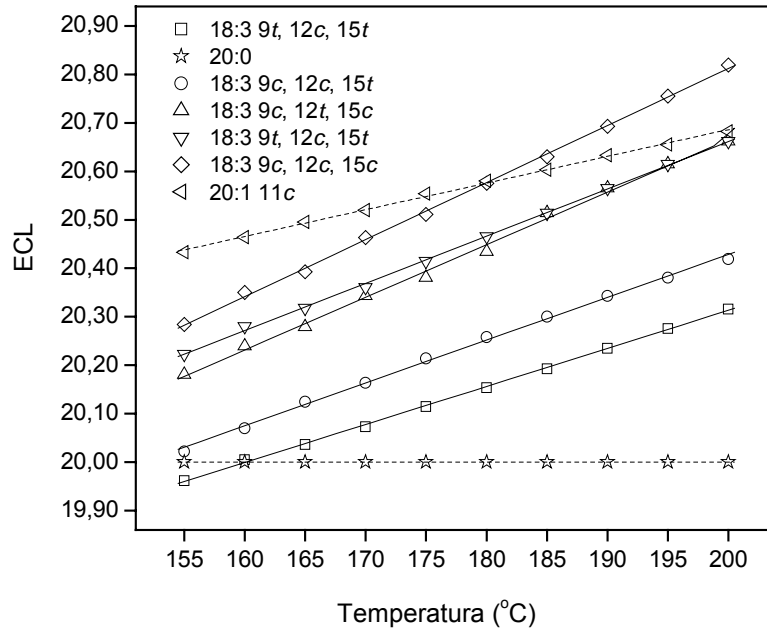


Figura 14: Valores de ECL em função da temperatura obtidos para ésteres metílicos dos ácidos araquídico, gondóico, alfa-linolênico e seus isômeros geométricos; coluna CP Sil-88.

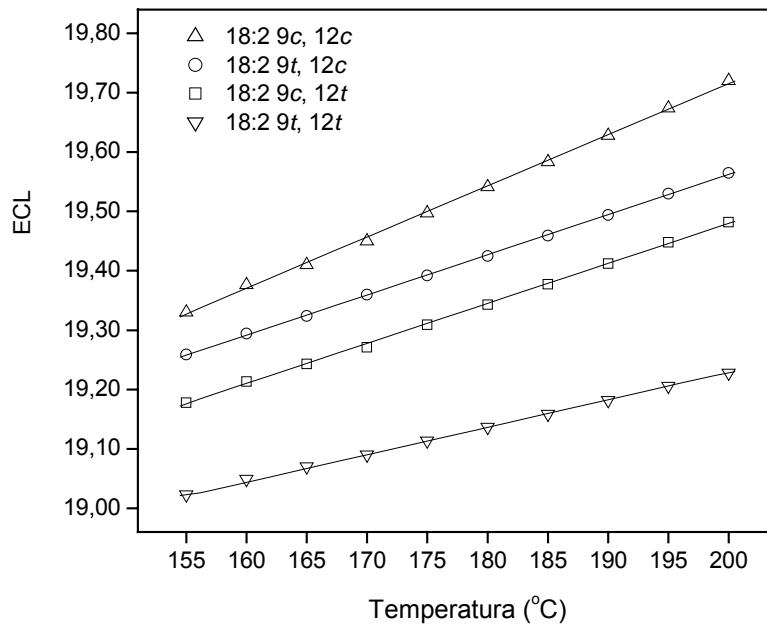


Figura 15 : Valores de ECL em função da temperatura obtidos para ésteres metílicos do ácido linoléico e seus isômeros geométricos; coluna CP Sil-88.



Para determinar a temperatura mais adequada para a análise isotérmica, foram estabelecidos alguns parâmetros considerados relevantes para a análise:

- a) a diferença de ECL entre os ácidos gordoico e alfa-linolênico.
- b) a diferença de ECL entre os ácidos linoléico e 18:2 9*t*,12*c*.
- c) a diferença de ECL entre os ácidos 18:3 9*t*,12*c*,15*c* e 18:3 9*c*,12*t*,15*c*.

Na Figura 16 são apresentadas as curvas destas diferenças de ECL em função da temperatura de análise (Anexo IV). Considerando que a menor resolução entre dois ácidos graxos só foi possível se a diferença de seus valores de ECL fosse igual a 0,032 ou superior, pode-se concluir que para a separação dos ácidos gordoico e alfa-linolênico, a temperatura não deve estar no intervalo entre 175 e 185 °C. Em relação aos ácidos linoléico e 18:2 9*t*,12*c*, observa-se o aumento na resolução com o aumento da temperatura, sugerindo o emprego da temperatura mais elevada possível. Para a separação parcial entre os ácidos 18:3 9*t*,12*c*,15*c* e 18:3 9*c*,12*t*,15*c* é necessário que a temperatura de análise esteja entre 165 e 175 °C. Assim, para possibilitar a separação parcial destes isômeros do alfa-linolênico, a análise foi conduzida na temperatura de 170 °C até a eluição do ácido gordoico (Anexo V).

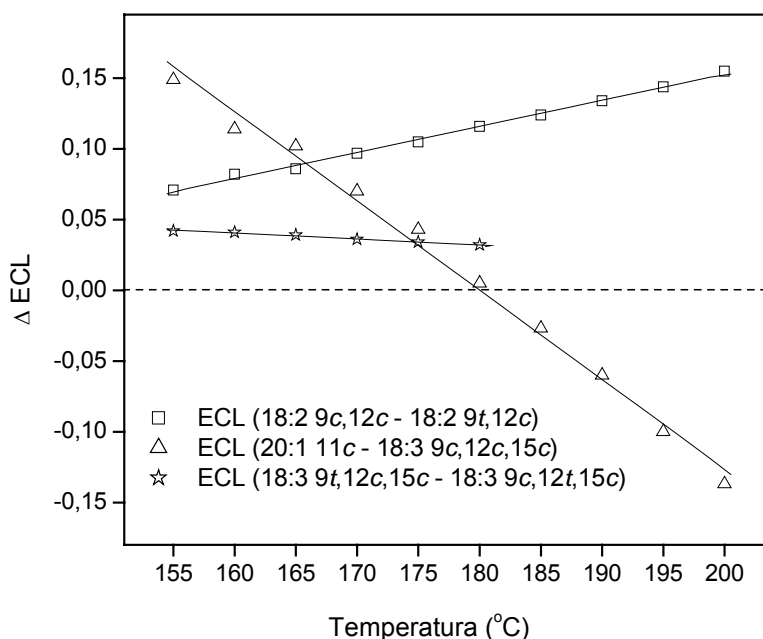


Figura 16: Efeito da temperatura de análise sobre as diferenças de ECL para ésteres metílicos de ácidos graxos que poderiam coeluir; coluna CP Sil-88.

#### 5.4 Otimização das condições para a análise cromatográfica de AGTM e AGTP empregando a coluna CP Select CB-FAME

Na Figura 17 são apresentados o gráfico de ECL em função das temperaturas de análise, para os ésteres metílicos de ácidos graxos octadecenóicos *cis* e *trans* (Anexos VI e VII). Para os ácidos graxos 18:1 13*c*, 18:1 14*c*, 18:1 15*c*, 18:1 15*t* e 18:1 16*t* não foi possível a obtenção de padrões ou a sua preparação através da isomerização. Assim, a determinação dos seus valores de ECL foi realizada a partir das frações *cis* e *trans*, obtidas após a CCD/Ag<sup>+</sup> dos ésteres metílicos de gorduras parcialmente hidrogenadas (Anexos VIII e IX). A identificação destes ésteres foi efetuada com base na ordem de eluição descrita na literatura para colunas de alta polaridade, que ocorre progressivamente a partir da dupla ligação na posição Δ5 (Scholfield, 1981; Bannon *et al.*, 1988; Wolff & Bayard, 1995b; Precht & Molketin, 2000).

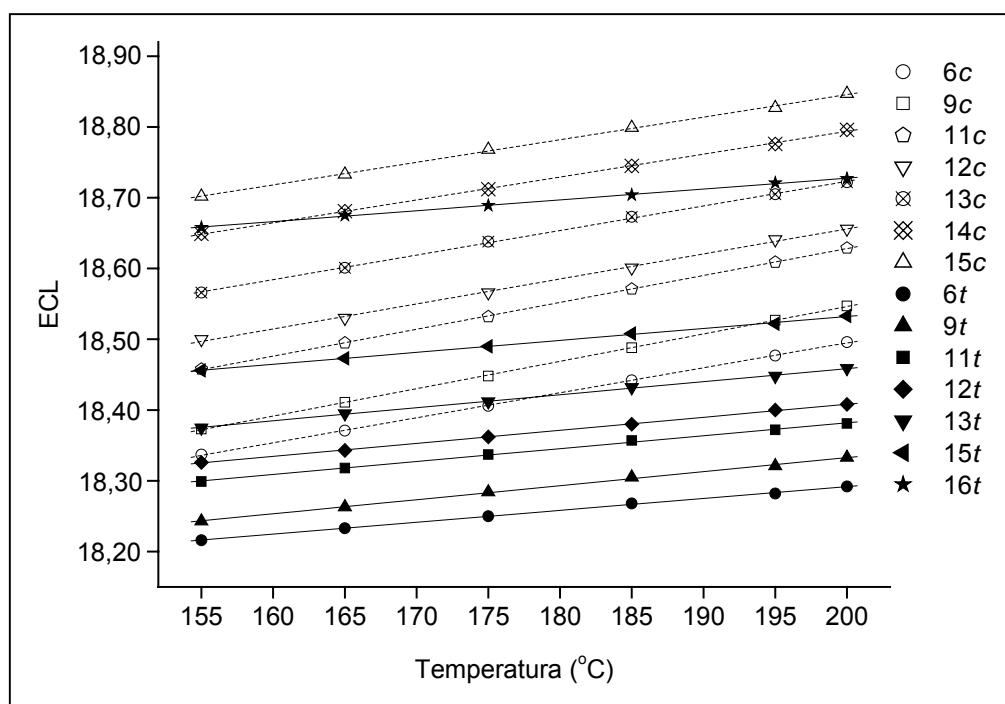


Figura 17: Valores de ECL em função da temperatura para ésteres metílicos de ácidos graxos octadecenóicos *cis* e *trans*; coluna CP Select CB-FAME.

A análise das curvas indica que a resolução parcial entre os ésteres do ácidos 18:1 9*c* (oléico) e 18:1 13*t* torna-se possível a partir de 180 °C ( $\Delta ECL > 0,03$ ). Contudo, é preciso considerar que em gorduras parcialmente hidrogenadas de origem vegetal, a concentração de ácido oléico é razoavelmente elevada, ocorrendo

em níveis de até 35% do total de ácidos graxos (Basso *et al.*, 1999; Azevedo, 1999). Esta condição implica em uma diminuição do valor de ECL do éster do ácido oléico, que resulta na coeluição com o éster do ácido 18:1 13*t*, mesmo em temperaturas ligeiramente acima de 180 °C. Como a resolução entre estes dois ésteres torna-se maior a medida que a temperatura de análise aumenta, seria apropriado empregar na análise a maior temperatura possível.

Para os ésteres metílicos do ácido linoléico e seus isômeros geométricos, as curvas de ECL (Figura 18) indicam de forma similar ao observado para a coluna CP-Sil 88, o aumento da resolução entre os ácidos linoléico e 18:2 9*t*,12*c* a medida que a temperatura aumenta (Anexos X e XI). Foi verificado também que há uma diferença maior entre os valores de ECL para os ésteres dos ácidos linoelaídico (18:2 9*t*,12*t*) e 18:2 9*c*,12*t*, em relação a coluna CP-Sil 88.

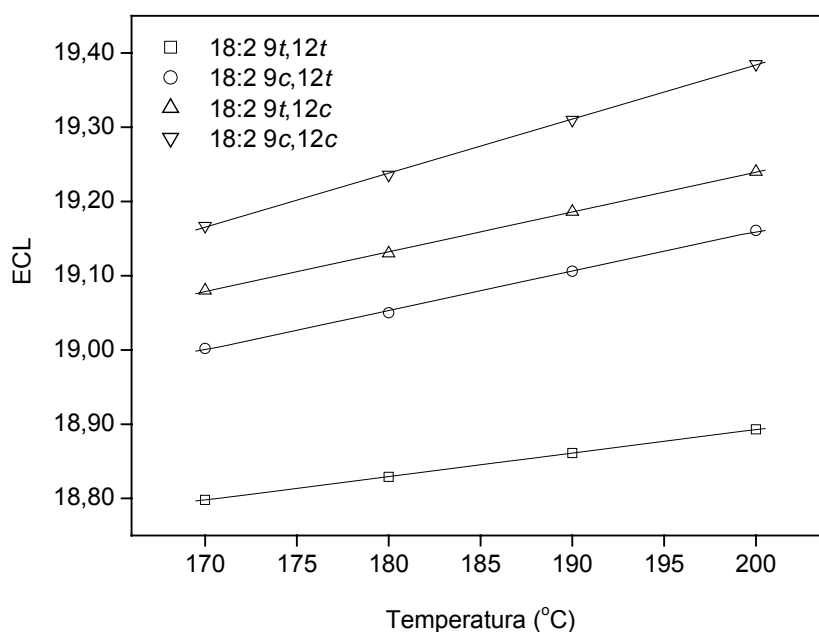


Figura 18: Valores de ECL do ácido linoléico e de seus isômeros geométricos em função da temperatura; coluna CP Select CB-FAME.

Na Figura 19 são apresentadas as curvas de ECL para o éster metílico do ácido alfa-linolênico e seus isômeros geométricos (Anexos X e XI). A análise das curvas indica que a resolução parcial entre os ésteres dos ácidos 18:3 9*t*,12*c*,15*c* e 18:3 9*c*,12*t*,15*c* é possível em temperaturas ao redor de 170 °C. Contudo, nesta temperatura ocorre a coeluição entre os ésteres dos ácidos araquídico e alfa-linolênico, não sendo adequada para a análise. Ao redor de 180 °C e até cerca de 190 °C, observa-se a coeluição do éster do ácido araquídico com os ésteres dos

ácidos 18:3 9*t*,12*c*,15*c* e 18:3 9*c*,12*t*,15*c*, tornando este intervalo de temperatura inapropriado para a análise.

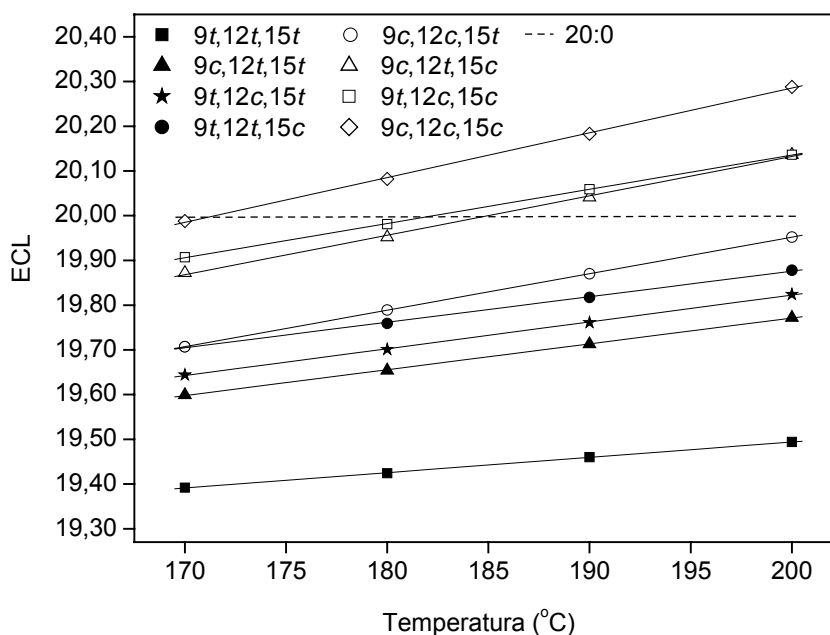


Figura 19: Valores de ECL em função da temperatura para os ésteres metílicos do ácido alfa-linolênico e seus isômeros geométricos; coluna CP Select CB-FAME.

Para a otimização da temperatura de análise foram considerados os seguintes parâmetros:

- a) a diferença de ECL entre os ésteres dos ácidos oléico e 18:1 13*t*.
- b) a diferença de ECL entre os ésteres dos ácidos 18:3 9*t*,12*c*,15*c* e araquídico.
- c) a diferença de ECL entre os ésteres dos ácidos araquídico e 18:3 9*c*,12*c*,15*t*.
- d) a diferença de ECL entre os ésteres dos ácidos linoléico e 18:2 9*t*,12*c*.

As curvas das diferenças de ECL em função da temperatura de análise são apresentadas na Figura 20 (Anexo XI). A análise destas curvas demonstra que ao efetuar a determinação simultânea de AGTM e AGTP, a temperatura da coluna deve ser superior a 190 °C para aumentar a resolução entre os ésteres dos ácidos 18:1 13*t* e oléico, bem como possibilitar a separação total entre o araquidato de metila e a mistura constituída pelos ésteres dos ácidos 18:3 9*t*,12*c*,15*c* e 18:3 9*c*,12*t*,15*c*. Esta condição também possibilita uma maior resolução entre os ésteres dos ácidos linoléico e 18:2 9*t*,12*c*. Nesse sentido, a análise a 200 °C seria apropriada, contudo, verifica-se a diminuição da resolução entre os ésteres dos ácidos araquídico e

18:3 9c,12c,15t com o aumento da temperatura. Assim, a análise foi efetuada a 197 °C até a eluição do araquidato de metila, para evitar a coeluição com o éster do ácido 18:3 9c,12c,15t (Anexo XII)

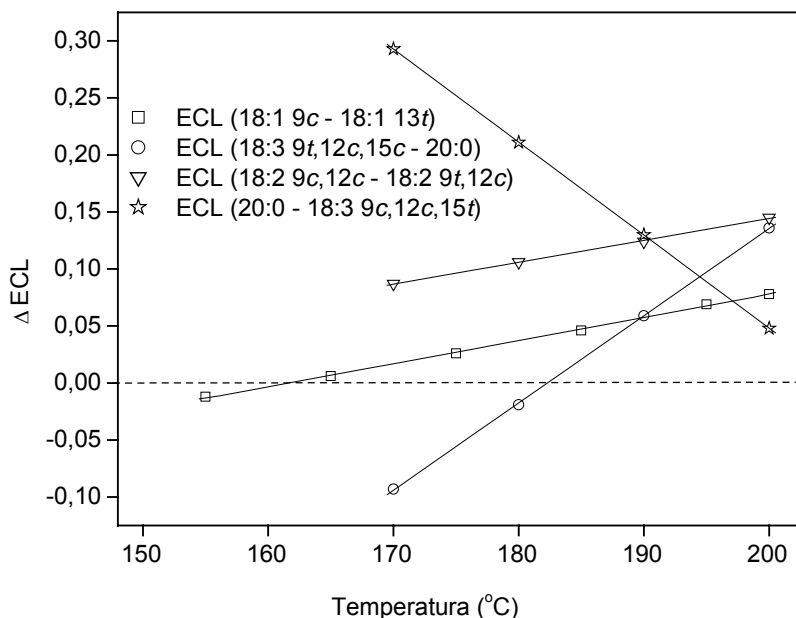


Figura 20: Efeito da temperatura de análise sobre as diferenças de ECL para ésteres metílicos de ácidos graxos com possibilidade de coeluição; coluna CP Select CB-FAME.

### 5.5 Desenvolvimento de sistema para diferenciação entre ácidos graxos octadecenóicos *cis* e *trans*

Na Tabela 4 são apresentados os valores do coeficiente angular para as curvas de ECL dos ésteres metílicos de ácidos graxos octadecenóicos (Figura 17). O coeficiente angular variou de  $3,19 \cdot 10^{-3}$  a  $3,87 \cdot 10^{-3}$  para os ésteres dos ácidos graxos *cis*, e de  $1,53 \cdot 10^{-3}$  a  $1,98 \cdot 10^{-3}$  para os *trans*. Estes resultados indicam que o valor deste coeficiente pode ser empregado para discriminar os AGT de seus isômeros *cis*, contribuindo para a identificação deste grupo de ácidos. Dessa forma, os valores de ECL obtidos na temperatura de 185 °C foram plotados em relação ao valor do coeficiente angular obtido para cada éster (Figura 21), sendo observados dois grupos distintos. O grau de diferença entre os dois grupos foi avaliado pelo teste t de Student, sendo obtida uma diferença altamente significativa ( $P < 0,00001$ ).

Tabela 4: Coeficiente angular das curvas de ECL para ésteres octadecenóicos

Ácido graxo	Coeficiente angular ( $\Delta$ ECL. $^{\circ}$ C $^{-1}$ ). $10^{-3}$	ácido graxo	Coeficiente angular ( $\Delta$ ECL. $^{\circ}$ C $^{-1}$ ). $10^{-3}$
18:1 6 <i>t</i>	1,68	18:1 6 <i>c</i>	3,53
18:1 9 <i>t</i>	1,98	18:1 9 <i>c</i>	3,87
18:1 11 <i>t</i>	1,82	18:1 11 <i>c</i>	3,80
18:1 12 <i>t</i>	1,84	18:1 12 <i>c</i>	3,53
18:1 13 <i>t</i>	1,84	18:1 13 <i>c</i>	3,47
18:1 15 <i>t</i>	1,69	18:1 14 <i>c</i>	3,23
18:1 16 <i>t</i>	1,53	18:1 15 <i>c</i>	3,19

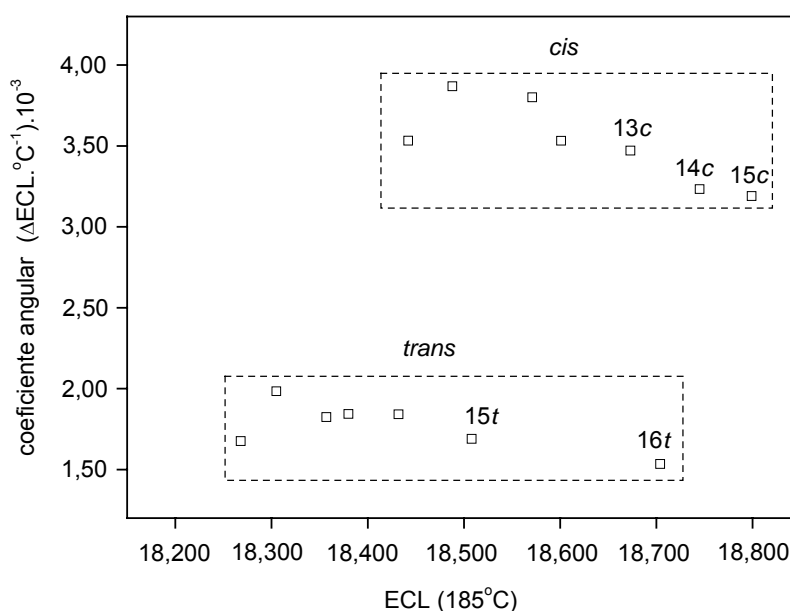


Figura 21: Sistema para discriminação entre ácidos octadecenóicos *cis* e *trans*.

### 5.6 Quantificação de AGTP em óleo de soja refinado

Na Tabela 5 são apresentados os valores dos fatores de resposta experimental e teórico para os ésteres metílicos dos ácidos araquídico, behênico, linoléico e alfa-linolênico. Os fatores experimentais para os ésteres dos ácidos graxos saturados apresentaram maior proximidade com os fatores teórico do que os fatores obtidos para os ésteres dos ácidos linoléico e alfa-linolênico. Esta diferença ocorreu possivelmente devido a instabilidade oxidativa dos ésteres metílicos de

ácidos graxos insaturados, que limita a obtenção e manutenção de padrões desta natureza com elevado grau de pureza livres de autoxidação (Bannon *et al.*, 1986).

Tabela 5: Valores do fator de resposta para ésteres metílicos dos ácidos araquídico, behênico, linoléico e alfa-linolênico, em relação ao tricosanoato de metila

éster metílico	fator de resposta		
	experimental*		teórico
	1:1	2:1	
20:0	1,006 ± 0,015	1,014 ± 0,015	1,019
22:0	0,996 ± 0,013	0,983 ± 0,011	1,006
18:2 9c,12c	1,052 ± 0,020	-	1,021
18:3 9c,12c,15c	1,058 ± 0,023	-	1,014

\* Os valores são médias de 6 repetições, acompanhados de seu desvio-padrão.

O uso de padrões de ésteres de ácidos graxos saturados permitiu verificar que o equipamento estava otimizado. Nesta condição, foram utilizados os fatores de resposta teóricos para a determinação quantitativa dos ácidos graxos poliinsaturados, conforme recomendado por Bannon *et al.*, (1986), Shanta & Ackman, (1990), Joseph & Ackman (1992).

Para a quantificação dos AGTP 18:2 e 18:3 foram utilizados os fatores de resposta teóricos dos ácidos linoléico e alfa-linolênico, respectivamente, pois apresentam o mesmo número de insaturações e de carbonos ativos (Ackman & Sipos, 1964). Os limites de detecção e quantificação, estimados a partir de diluições sucessivas de uma solução padrão de araquidato de metila, apresentaram os valores de 0,15 e 0,50 mg g<sup>-1</sup> de óleo, respectivamente.

Na Figura 22 são apresentadas as curvas obtidas para a verificação da concordância entre os fatores de resposta experimental e teórico, para o éster metílico do ácido araquídico, na faixa de concentração utilizada para a quantificação dos AGTP e do ácido alfa-linolênico. Foi observado uma boa proximidade entre o fator teórico e os valores obtidos para o fator experimental (Tabela 6), o que demonstrou que a quantificação poderia ser efetuada no intervalo de 0,02 a 4,50 mg mL<sup>-1</sup>.

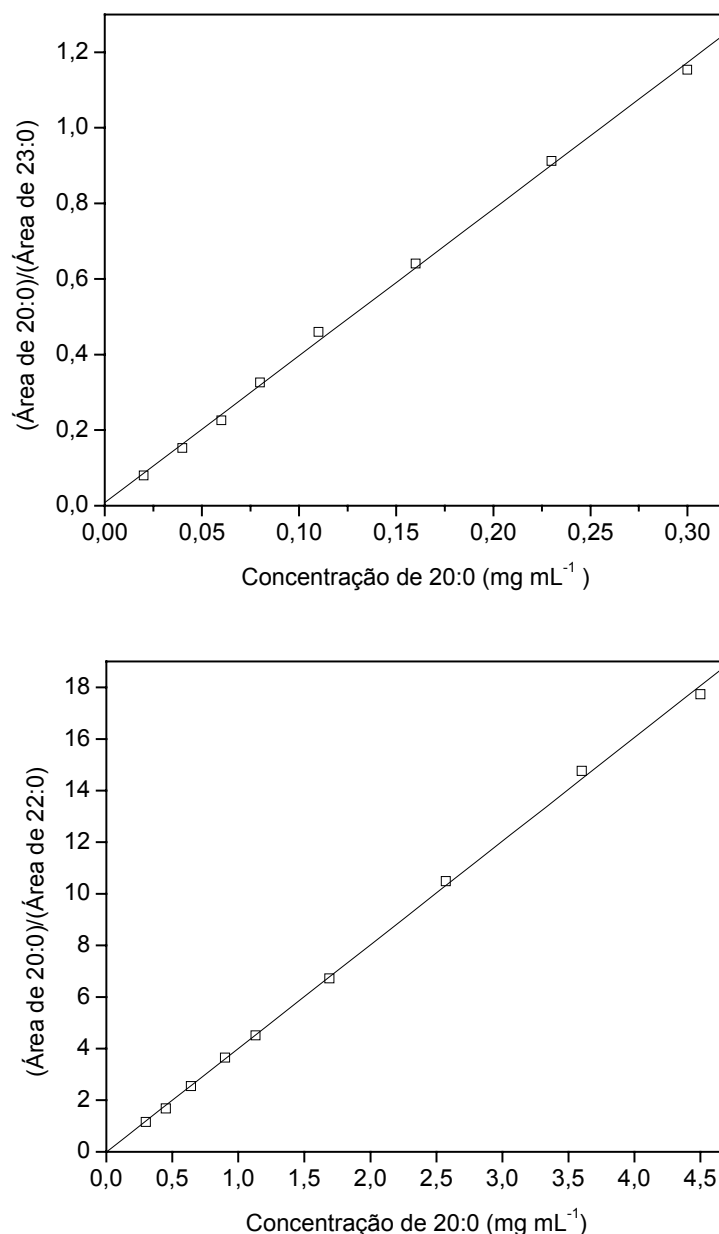


Figura 22: Curvas empregadas na avaliação do fator de resposta do instrumento para o araquidato de metila.

Tabela 6: Coeficientes da regressão linear e fatores de resposta para as curvas de calibração do araquidato de metila

faixa de concentração (mg mL <sup>-1</sup> )	y = a + bx		r	F <sub>R</sub>
	a	b		
4,50 – 0,30	- 0,01804	4,01788	0,99957	0,996
0,30 – 0,02	0,00849	3,88216	0,99919	1,030



Na Tabela 7 são apresentados os resultados do estudo da recuperação realizado com o ácido araquídico. A recuperação variou de 102,07 a 103,18%, apresentando o valor médio de 102,63%. Estes resultados sugerem que a quantificação efetuada apresentou uma exatidão adequada, uma vez que a região entre 80,0 e 110,0% tem sido considerada aceitável em estudos de validação de métodos (Caulcutt & Boddy, 1994).

Tabela 7: Concentrações de ácido araquídico envolvidas no teste de recuperação

amostra	concentração (mg g <sup>-1</sup> )		recuperação (%)
	adicionada	recuperada	
3,61 ± 0,22*	1,70	5,42 ± 0,28	102,07
3,61 ± 0,22	5,50	9,40 ± 0,34	103,18

\*Os valores são médias de cinco repetições, analisadas em triplicata acompanhados de seu desvio-padrão.

Na Tabela 8 são apresentadas as concentrações em mg g<sup>-1</sup> de óleo dos AGTP e de alfa-linolênico nas marcas de óleo de soja analisadas. A concentração total de AGTP variou de 5,8 a 30,2 mg g<sup>-1</sup>, apresentando um valor médio de 18,4 mg g<sup>-1</sup> de óleo. Os isômeros geométricos do ácido alfa-linolênico constituíram o maior grupo de AGTP, com sua concentração variando de 3,9 a 16,3 mg g<sup>-1</sup> de óleo. Neste grupo, os ácidos mono-*trans* representaram em média 93,2% do total de isômeros *trans*, sendo o ácido 18:3 9*c*,12*c*,15*t* o maior constituinte. A presença do ácido 18:3 9*t*,12*c*,15*t* foi observada em todos os lotes das marcas B, C e D, e na maioria dos lotes da marca A, sendo significativamente maior (P<0,05) para a marca C. Este ácido graxo é originado principalmente do ácido 18:3 9*c*,12*c*,15*t* e a sua formação é muito favorecida pelo emprego de temperaturas de desodorização superiores a 245 °C (Wolff, 1993b).

No grupo dos AGTP 18:2 a concentração total variou de 1,9 a 14,0 mg g<sup>-1</sup> de óleo, sendo observadas diferenças significativas (P<0,05) entre a marca C e as marcas A, B e E. Em nenhuma das marcas avaliadas foi detectada a presença do ácido 18:2 9*t*,12*t*. O ácido graxo 18:2 9*c*,12*t* foi encontrado em concentrações maiores que o ácido 18:2 9*t*,12*c* em todas as marcas, representando em média 55,7% deste grupo. A predominância deste ácido graxo foi confirmada por Camacho

*et al.* (2001) ao estudar a cinética de isomerização do ácido linoléico durante a desodorização do óleo de soja. Estes autores concluíram que a formação de 18:2 9*c*,12*t* é cerca de 10% maior que a de 18:2 9*t*,12*c* em 240 °C, tornando-se 35% maior em 260 °C.

Tabela 8: Concentrações de ácidos graxos *trans* poliinsaturados em óleo de soja refinado

ácidos graxos	concentrações (mg g <sup>-1</sup> )/marcas				
	A	B	C	D	E
18:2 9 <i>c</i> ,12 <i>t</i>	3,1 ± 0,9 <sup>a,c</sup>	4,4 ± 2,3 <sup>a,d</sup>	7,6 ± 2,3 <sup>b</sup>	6,1 ± 2,1 <sup>b,d</sup>	1,1 ± 0,2 <sup>c</sup>
18:2 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i>	2,3 ± 0,9 <sup>a,c</sup>	3,9 ± 2,2 <sup>a,d</sup>	6,4 ± 2,0 <sup>b</sup>	4,8 ± 2,2 <sup>b,d</sup>	0,8 ± 0,2 <sup>c</sup>
18:3 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>t</i>	0,5 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,8 ± 0,5 <sup>a,c</sup>	1,8 ± 0,5 <sup>b</sup>	1,2 ± 0,7 <sup>c</sup>	nd
18:3 9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>t</i>	3,8 ± 0,9 <sup>a,c</sup>	5,0 ± 2,1 <sup>a,b</sup>	7,2 ± 2,4 <sup>b</sup>	5,9 ± 0,7 <sup>a,b</sup>	2,1 ± 0,7 <sup>c</sup>
18:3 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i> ,15 <sup>1</sup>	3,5 ± 0,9 <sup>a,c</sup>	4,9 ± 2,3 <sup>a,b</sup>	7,3 ± 2,5 <sup>b</sup>	5,8 ± 0,6 <sup>a,b</sup>	1,8 ± 0,6 <sup>c</sup>
18:3 9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>c</i> <sup>2</sup>	35,6 ± 4,4 <sup>a</sup>	30,7 ± 6,0 <sup>a</sup>	34,7 ± 4,6 <sup>a</sup>	37,4 ± 7,6 <sup>a</sup>	60,1 ± 6,0 <sup>b</sup>
18:2 <i>trans</i> <sup>3</sup>	5,4 ± 1,8 <sup>a,c</sup>	8,3 ± 4,5 <sup>a,d</sup>	14,0 ± 4,2 <sup>b</sup>	10,9 ± 4,1 <sup>b,d</sup>	1,9 ± 0,3 <sup>c</sup>
18:3 <i>trans</i> <sup>4</sup>	7,8 ± 2,1 <sup>a,c</sup>	10,7 ± 4,8 <sup>a,d</sup>	16,3 ± 5,4 <sup>b</sup>	12,9 ± 5,1 <sup>b,d</sup>	3,9 ± 1,8 <sup>c</sup>
AGTP <sup>5</sup>	13,2 ± 3,8 <sup>a</sup>	19,0 ± 9,2 <sup>a,b</sup>	30,2 ± 9,5 <sup>c</sup>	23,8 ± 7,5 <sup>b,c</sup>	5,8 ± 2,0 <sup>a</sup>
GI (%)	17,8 ± 4,4 <sup>a</sup>	25,4 ± 9,0 <sup>a,b</sup>	31,5 ± 10,0 <sup>b</sup>	25,1 ± 4,4 <sup>a,b</sup>	6,0 ± 2,2 <sup>c</sup>

nd = não detectado (limite de detecção = 0,15 mg g<sup>-1</sup>); <sup>1</sup>inclui o isômero 18:3 9*c*, 12*t*, 15*c*; <sup>2</sup>frequentemente representado por 18:3n-3; <sup>3,4</sup>somatória dos ácidos graxos *trans*. <sup>5</sup> Somatória de ácidos graxos *trans* 18:2 e 18:3. <sup>6</sup>Grau de isomerização. Médias seguidas de diferentes letras na mesma linha são diferentes significativamente ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Embora o teor de ácido linoléico no óleo de soja seja muito maior que o de alfa-linolênico, observa-se a ocorrência de teores mais elevados de AGT 18:3 para todas as marcas avaliadas. Isto ocorre devido às ligações do ácido alfa-linolênico serem mais lábeis que as do ácido linoléico, resultando em uma seletividade de isomerização 25 vezes maior para o 18:3n-3, quando a desodorização do óleo é efetuada a 200 °C. Na temperatura de 260 °C a seletividade diminui para 12, conforme demonstrado por Hénon *et al.* (1999).

O grau de isomerização do ácido alfa-linolênico variou de 6,0 a 31,5%, apresentando um valor médio de 21,2%. Estes valores indicam que as condições

empregadas pela indústria durante a etapa de desodorização variam amplamente e que temperaturas muito elevadas são utilizadas por alguns fabricantes. Em estudos realizados com óleo de soja em outros países, foram obtidos graus de isomerização médios de 8,3% em Israel (Enig, 1984), 17,5% na Bélgica (Wolff, 1993a), 22,0% na Inglaterra (Wolff, 1993a) e 12,6% na França (Wolff, 1992a). A comparação destes valores com os obtidos no presente estudo indica que o GI do ácido alfa-linolênico em óleos brasileiros tem sido razoavelmente elevado, sugerindo uma redução significativa da ingestão diária da forma *cis* deste ácido graxo, pela população brasileira.

Com base no consumo *per capita* do óleo de soja no Brasil (Reis, 2000), que é de 8,0 litros/ano (aproximadamente 7,5 kg/ano), é possível estimar a contribuição deste óleo na ingestão diária de AGTP da população. Assim, empregando a média entre todas as marcas avaliadas, a ingestão de AGTP e 18:3 *trans* corresponde a 0,4 e 0,2 g/dia, respectivamente. Para a ingestão de ácido alfa-linolênico, a contribuição do óleo de soja corresponde 0,8 g/dia.

O efeito da ingestão de AGTP sobre a saúde humana vem sendo recentemente investigado e diferentemente dos ácidos graxos *trans* monoinsaturados, não foram observadas alterações significativas nos níveis plasmáticos da LDL, HDL e Lp[a]. Contudo, estes ácidos graxos influenciam significativamente a razão entre a LDL e a HDL em relação à dietas praticamente isentas de AGTP. Esta razão tem sido um dos mais importantes indicadores do risco previsível de doenças cardiovasculares e assim o aumento da ingestão de AGTP pode ter influência nesse sentido (Chardigny, 2001).

### **5.7 Quantificação de AGTM e AGTP em gorduras parcialmente hidrogenadas**

Na Tabela 9 são apresentados os valores dos fatores de resposta experimental e teórico para os ésteres metílicos dos ácidos elaídico, linoléico, alfa-linolênico, araquídico, henecosanóico (21:0) e behênico. Os ésteres dos ácidos graxos saturados e do ácido elaídico apresentaram uma boa concordância entre os valores dos fatores de resposta teórico e experimental, demonstrando que o equipamento estava otimizado. Contudo, foram verificadas diferenças expressivas para os ésteres dos ácidos poliinsaturados, particularmente para o alfa-linolenato,

cujo fator obtido experimentalmente foi 15,7% maior que o fator calculado. Embora tenha sido utilizada uma mistura padrão lacrada, mantida conforme as recomendações do fabricante, o seu armazenamento por cerca de 10 meses possivelmente contribuiu para a oxidação deste éster de ácido graxo, resultando na diferença observada em relação ao fator teórico.

Tabela 9: Valores do fator de resposta para ésteres metílicos dos ácidos elaídico, linoléico, alfa-linolênico, araquídico, heneicosanóico e behênico, em relação ao tricosanoato de metila

éster metílico	fator de resposta	
	experimental*	teórico
18:1 <i>9t</i>	1,018 ± 0,018	1,028
18:2 <i>9c,12c</i>	1,062 ± 0,016	1,021
18:3 <i>9c,12c,15c</i>	1,173 ± 0,022	1,014
20:0	1,037 ± 0,008	1,019
21:0	1,002 ± 0,008	1,012
22:0	0,990 ± 0,005	1,006

\* médias de 6 injeções, acompanhados de seu desvio-padrão

Na quantificação dos AGT 18:1, 18:2 e 18:3 foram empregados os fatores de resposta teóricos dos ácidos elaídico, linoléico e alfa-linolênico, respectivamente, uma vez que possuem o mesmo número de insaturações e carbonos ativos. Os limites de detecção e quantificação, determinados a partir da diluição sucessiva de uma solução padrão de elaidato de metila, foram de 0,28 mg g<sup>-1</sup> e 0,93 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Na Figura 23 são apresentadas as curvas utilizadas para a avaliação do fator de resposta experimental do elaidato de metila, na faixa de concentração empregada na quantificação dos AGTM e AGTP. Foi verificada uma boa concordância entre o fator teórico e os valores obtidos para o fator experimental (Tabela 9), demonstrando que a quantificação poderia ser realizada no intervalo de 0,03 a 6,86 mg mL<sup>-1</sup>.

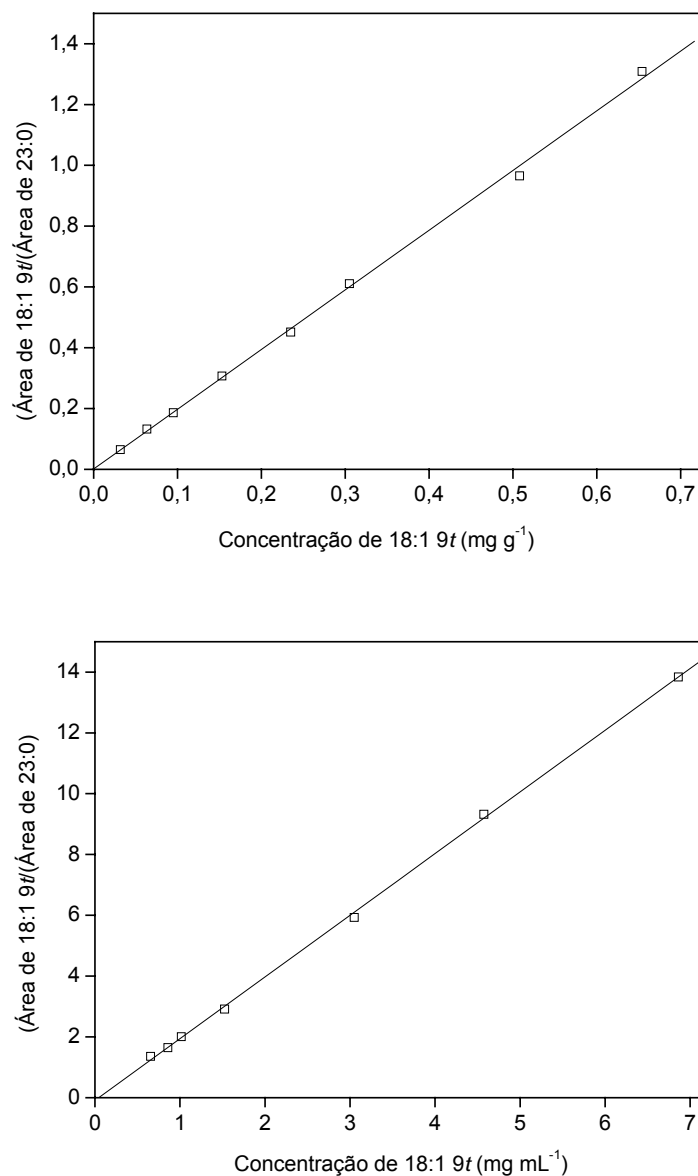


Figura 23: Curvas empregadas na avaliação do fator de resposta do instrumento para o elaidato de metila.

Tabela 10: Coeficientes da regressão linear das curvas e o seus fatores de resposta para as curvas de calibração do elaidato de metila

faixa de concentração (mg g <sup>-1</sup> )	y = a + bx		r	F <sub>R</sub>
	a	b		
6,86 – 0,65	-0,0881	2,02915	0,99974	0,986
0,65 – 0,03	0,0013	1,96342	0,99927	1,019

Na Tabela 11 são apresentadas as concentrações de elaidato de metila envolvidas no teste de recuperação. Para os níveis de concentração deste padrão que foram adicionados a amostras de gorduras parcialmente hidrogenadas, a recuperação variou de 97,60 a 103,28%, tendo o valor médio de 100,56%. Estes resultados indicam uma exatidão adequada para o intervalo de concentração empregado na quantificação dos AGT.

Tabela 11: Concentrações de elaidato de metila envolvidas no teste de recuperação

amostra	concentração (mg g <sup>-1</sup> )		recuperação (%)
	adicionada	recuperada	
7,72 ± 0,49	3,60	11,41 ± 0,79	100,80
88,30 ± 5,14	55,00	139,86 ± 6,56	97,60
173,07 ± 9,32	90,00	271,70 ± 3,95	103,28

\*os valores são médias de cinco repetições, analisadas em duplicata acompanhados de seu desvio-padrão.

Na avaliação da exatidão efetuada com o ácido 18:1 13*t* as recuperações foram de 98,12% e 99,27% (Tabela 12), apresentando a média de 98,70%. Além de indicar uma exatidão adequada da quantificação, estes resultados confirmam que nas condições em que a análise foi realizada, houve uma boa separação entre os ésteres dos ácidos 18:1 13*t* e 18:1 9*c*, mesmo com uma concentração razoável do último (159,50 mg g<sup>-1</sup>).

Tabela 12: Concentrações do ácido 18:1 13*t* envolvidas no teste de recuperação

amostra	concentração (mg g <sup>-1</sup> )		recuperação (%)
	adicionada	recuperada	
nd	17,00	16,68 ± 0,36	98,12
nd	30,00	29,78 ± 0,92	99,27

\*os valores são médias de cinco repetições, analisadas em duplicata, com o desvio-padrão; nd = não detectado (limite de detecção = 0,28 mg g<sup>-1</sup>).

Nas Tabelas 13 e 14 são apresentadas as concentrações dos AGT 18:1, 18:2 e 18:3 nas amostras de gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas analisadas. A concentração dos AGT 18:1 variou amplamente, ocorrendo desde 1,18 mg g<sup>-1</sup> até 233,75 mg g<sup>-1</sup>, constituindo o principal grupo de isômeros *trans* das amostras em que a concentração total de AGT foi maior que 85,0 mg g<sup>-1</sup>. Os AGTP 18:2 abrangeram os isômeros 18:2 9*t*,12*t*, 18:2 9*c*,12*t* e 18:2 9*t*,12*c*, cujas concentrações variaram de 0,96 a 14,71 mg g<sup>-1</sup>, de 1,68 a 25,49 mg g<sup>-1</sup> e de 1,63 a 25,61 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente, sendo os isômeros *mono-trans* encontrados em todas as amostras avaliadas. Entre os AGTP 18:3 os isômeros *mono-trans* também foram predominantes, sendo constituídos pelo ácido 18:3 9*c*,12*c*,15*t*, cuja a concentração variou de 2,46 a 7,90 mg g<sup>-1</sup> e pela mistura dos ácidos 18:3 9*t*,12*c*,15*c* e 18:3 9*c*,12*t*,15*c*, que teve a concentração variando de 2,71 a 14,51 mg g<sup>-1</sup> de gordura. A presença do isômero 18:3 9*t*,12*c*,15*t* foi observada para a maioria das amostras, com a concentração entre 0,94 e 7,95 mg g<sup>-1</sup>.

Tabela 13: Concentração dos AGT 18:1 e 18:2 nas gorduras hidrogenadas

amostra	concentração (mg g <sup>-1</sup> )					
	18:1 6-11 <i>t</i>	18:1 12 <i>t</i>	18:1 13 <i>t</i> <sup>2</sup>	18:2 9 <i>t</i> ,12 <i>t</i>	18:2 9 <i>c</i> ,12 <i>t</i>	18:2 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i>
1	89,29 ± 4,93	14,45 ± 1,20	15,38 ± 1,15	2,09 ± 0,18	4,84 ± 0,30	4,73 ± 0,32
2	2,53 ± 0,28	nd	nd	nd	8,86 ± 0,65	9,16 ± 0,72
3	63,64 ± 2,67	7,58 ± 0,46	8,51 ± 0,40	5,18 ± 0,24	15,34 ± 0,86	16,07 ± 0,83
4	138,82 ± 4,41	21,86 ± 0,94	23,71 ± 0,89	3,81 ± 0,15	4,77 ± 0,17	4,14 ± 0,15
5	173,76 ± 5,02	25,02 ± 1,28	25,49 ± 1,60	14,71 ± 0,70	17,49 ± 0,68	19,99 ± 0,61
6	1,68 ± 0,15	nd	nd	nd	7,24 ± 0,50	7,09 ± 0,60
7	22,80 ± 1,50	6,14 ± 0,50	nd	nd	6,58 ± 0,26	6,53 ± 0,32
8	6,31 ± 0,38	2,01 ± 0,14	nd	nd	8,02 ± 0,54	7,78 ± 0,46
9	55,03 ± 3,01	8,14 ± 0,61	8,32 ± 0,58	1,09 ± 0,09	3,19 ± 0,23	2,56 ± 0,20
10	109,66 ± 5,58	9,97 ± 0,73	10,40 ± 0,77	0,96 ± 0,09	1,68 ± 0,13	1,63 ± 0,14
11	1,18 ± 0,10	nd	nd	nd	5,81 ± 0,34	5,60 ± 0,41
12	1,39 ± 0,13	nd	nd	1,03 ± 0,07	25,49 ± 1,43	25,61 ± 1,10
13	188,73 ± 8,11	21,60 ± 1,62	23,42 ± 1,55	13,98 ± 0,58	23,26 ± 1,12	23,85 ± 1,16

<sup>1</sup>inclui o isômero 14*t*; nd = não detectado (limite de detecção = 0,28 mg g<sup>-1</sup>).

Estes resultados indicam que a concentração de AGT varia consideravelmente entre os diversos tipos de gorduras hidrogenadas, refletindo as diferenças na temperatura, pressão, tempo de reação, velocidade de agitação, tipo e quantidade de catalisador, empregados por cada fabricante no processo de hidrogenação. Além disso, as indústrias podem produzir gorduras empregando exclusivamente a hidrogenação, ou efetuar inúmeras combinações entre óleos vegetais e gorduras com diferentes graus de hidrogenação, mediante a aplicação da interesterificação (Azevedo, 1999).

Tabela 14: Concentração dos AGT 18:3 e somatórias entre os AGT em gorduras hidrogenadas

amostra	concentração (mg g <sup>-1</sup> )			somatórias (mg g <sup>-1</sup> )		
	18:3 <i>tct</i>	18:3 <i>cct</i>	18:3 <i>tcc</i> <sup>1</sup>	AGTM <sup>2</sup>	AGTP <sup>3</sup>	AGT <sup>4</sup>
1	1,07 ± 0,08	5,18 ± 0,31	4,95 ± 0,28	119,12 ± 5,20	22,86 ± 0,64	141,98 ± 5,24
2	1,96 ± 0,20	8,74 ± 0,61	9,31 ± 0,76	2,53 ± 0,28	38,03 ± 1,39	40,56 ± 1,42
3	4,12 ± 0,18	6,63 ± 0,37	7,39 ± 0,31	79,73 ± 2,74	54,73 ± 1,32	134,46 ± 3,04
4	nd	3,42 ± 0,14	3,23 ± 0,11	184,38 ± 4,59	19,37 ± 0,32	203,75 ± 4,61
5	0,94 ± 0,06	3,34 ± 0,15	3,59 ± 0,12	224,27 ± 5,42	60,06 ± 1,17	284,33 ± 5,55
6	1,75 ± 0,13	7,70 ± 0,48	8,31 ± 0,59	1,68 ± 0,15	32,09 ± 1,10	33,77 ± 1,11
7	1,44 ± 0,06	6,23 ± 0,22	6,75 ± 0,30	28,94 ± 1,58	27,53 ± 0,56	56,47 ± 1,68
8	2,31 ± 0,20	5,95 ± 0,45	6,46 ± 0,47	8,32 ± 0,41	30,52 ± 0,98	38,84 ± 1,06
9	nd	3,73 ± 0,24	3,78 ± 0,27	71,49 ± 3,13	14,35 ± 0,48	85,84 ± 3,17
10	nd	2,46 ± 0,19	2,71 ± 0,18	130,03 ± 5,67	9,44 ± 0,34	139,47 ± 5,69
11	1,65 ± 0,14	4,41 ± 0,28	4,81 ± 0,33	1,18 ± 0,10	22,28 ± 0,70	23,46 ± 0,71
12	7,95 ± 0,41	7,90 ± 0,52	14,51 ± 0,58	1,39 ± 0,13	82,49 ± 2,01	83,88 ± 2,02
13	7,38 ± 0,43	7,70 ± 0,49	13,68 ± 0,75	233,75 ± 8,41	89,85 ± 1,98	323,60 ± 8,64

<sup>1</sup>inclui o isômero 18:3 9c,12t,15c; <sup>2</sup>somatória dos AGTM; <sup>3</sup>somatória dos AGTP; <sup>4</sup>somatória do total de AGT; nd = não detectado (limite de detecção = 0,28 mg g<sup>-1</sup>).

Foi observada uma forte correlação entre a somatória da concentração dos AGTM e o total de AGT ( $r= 0,97$ ;  $p<0,0001$ ), o que indica que a diminuição na concentração de AGT em gorduras hidrogenadas é dependente da diminuição na concentração dos AGT 18:1. Por outro lado entre os AGTP e o total de AGT não foi verificada correlação significativa ( $r= 0,49$ ;  $p= 0,0916$ ), assim como, entre as



somatórias de AGTM e AGTP ( $r = 0,25$ ;  $p = 0,415$ ). Também foi obtida uma correlação pronunciada entre os ácidos 18:2 9c,12t e 18:2 9t,12c ( $r = 0,997$ ;  $p < 0,0001$ ), que associada ao coeficiente angular da curva (1,06), sugere que a isomerização do ácido linoléico durante o processo de hidrogenação não é seletiva.

Nas amostras em que a concentração de AGTM foi inferior a  $8,50 \text{ mg g}^{-1}$ , verificou-se a predominância dos AGTP. Isto demonstra que com a diminuição da concentração de AGT nas gorduras obtidas através da hidrogenação, os AGTP possivelmente passarão a ser o principal grupo de isômeros *trans* presentes nestas gorduras. Embora o efeito da ingestão deste grupo de isômeros pareça ter uma menor influência sobre o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Chardigny, 2001), será necessário nos próximos anos, estabelecer níveis de ingestão diária destes AGT, que possam ser considerados inócuos.

## 6. CONCLUSÕES

A isomerização do óleo de linhaça é uma alternativa adequada para a preparação de misturas de isômeros geométricos dos ácidos linoléico e alfa-linolênico, reduzindo significativamente o seu custo. A obtenção de isômeros *trans* pode ainda ser facilmente efetuada a partir de soluções em heptano de seus ésteres metílicos na configuração *cis*, conforme demonstrado para os isômeros 18:1 6*t* e 18:1 12*t*.

A análise de ácidos graxos sob a forma de ésteres iso-propílicos permitiu a separação dos isômeros 18:3 9*c*,12*t*,15*t* e 18:3 9*t*,12*c*,15*t*, indicando que o emprego de outras formas de ésteres pode influenciar a resolução entre os ácidos graxos.

Os valores de ECL apresentam dependência linear com a temperatura, no intervalo de 155 a 200 °C. A aplicação desta propriedade permitiu determinar pela diferença de ECL entre os ésteres metílicos de ácidos graxos que poderiam coeluir, que a temperatura mais apropriada para a separação de todos os AGTP presentes no óleo de soja, está em torno de 170 °C para a coluna CP Sil-88. Para a determinação simultânea de AGTM e AGTP em gorduras hidrogenadas, empregando a coluna CP Select CB-FAME, foi verificado que a temperatura mais apropriada para a análise está ao redor de 197 °C.

Pelo coeficiente angular das curvas de ECL em função da temperatura, obtidas para os ácidos octadecenóicos, foi possível diferenciar os isômeros 18:1 *cis* e *trans*.

A avaliação do fator de resposta experimental para o araquidato de metila, na faixa de concentração empregada na quantificação dos AGTP e do ácido alfa-linolênico, apresentou boa concordância com seu valor do fator de resposta teórico. Uma condição semelhante foi verificada para o fator experimental do elaidato de metila, no intervalo de concentração utilizado para a quantificação de AGTM e AGTP em gorduras hidrogenadas.

Os testes de recuperação indicaram que a metodologia empregada na quantificação de AGTP em óleo de soja, e de AGTM e AGTP em gorduras hidrogenadas, apresentou uma exatidão adequada.

O tratamento térmico empregado pela indústria brasileira de óleo de soja na etapa de desodorização, foi excessivo nos últimos anos, o que ficou caracterizado

pelo elevado grau de isomerização do ácido alfa-linolênico na maioria das marcas monitoradas.

Com a diminuição da concentração de AGT nas gorduras obtidas por hidrogenação, os AGTP possivelmente passarão a ser o principal grupo de isômeros *trans* presentes nestas gorduras.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ackman, R. G.; Sipos, J. C. Application of specific response factors in the gas chromatographic analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detectors. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 41, p. 377-378, 1964.

Ackman, R. G. The analysis of fatty acids and related materials by gas-liquid chromatography. **Progr. Chem. Fats Other Lipids**, v. 12, p. 165-284, 1972.

Ackman, R. G. Natural *trans* fatty acids. *In*: Sébédio, J. L.; Christie, W. W. (editores). **Trans fatty acids in human nutrition**. Dundee: The oil press, 1998, 318p.

Ackman, R. G.; Mag, T. K. *Trans* fatty acids and the potential for less in technical products. *In*: Sébédio, J. L.; Christie, W. W. (editores). **Trans fatty acids in human nutrition**. Dundee: The oil press, 1998, 318p.

Ackman, R. G. The gas chromatograph in practical analyses of common and uncommon fatty acids for the 21st century. **Anal. Chem. Acta**, v. 465, p. 175-192, 2002.

ACS-American Chemical Society. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in Environmental Chemistry. **Anal. Chem.**, v. 52, p. 2242-2249, 1980.

Adlof, R. O. Separation of *cis* and *trans* unsaturated fatty acid methyl esters by silver ion high-performance liquid chromatography. **J. Chromatog. A**, v. 659, p. 95-99, 1994.

Allen, R. R.; Kiess, A. A. Isomerization during hydrogenation. I. Oleic acid. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 32, p. 400-405, 1955.

Allen, R. R.; Kiess, A. A. Isomerization during hydrogenation. III. Linoleic acid. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 33, p. 355-400, 1956.

Allen, R. R. Hydrogenation. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 58, p. 166-169, 1981.

Allinger, N. L.; Cava, M. P.; de Jongh, D. C.; Jonhson, C. R.; Lebel, N. A.; Stevens, C. L. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1978, 961p.

Amoedo, L. H. G.; Murandian, L. B. A. Determination of *trans*-10-hydroxy-2-decenoic acid in royal jelly from São Paulo state, Brazil. **Ciênc. Tecnol. Alimen.**, v. 23, p. 62-65, 2003.

Anderson, J. T.; Grande, F.; Keys, A. Hydrogenated fats in the diet and lipids in the serum man. **J. Nutr.**, v. 75, p. 388-394, 1961.

Aro, A.; Jauhiainen, M.; Partanen, R.; Salmine, N. L.; Mutanen, M. Stearic acid, *trans* fatty acids, and dairy fat: effects on serum and lipoprotein, lipids apolipoproteins, lipoprotein[a], and lipid *transfer* proteins in health subjects. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 65, 1419-1426, 1997.

Aro, A.; Amaral, E.; Kesteloot, H.; Rimestad, A.; Thamm; van Poppel, G. *Trans* fatty acids in french fries, soups, and snacks from 14 european countries: The TRANSFAIR study. **J. Food Compos. Anal.**, v. 11, p. 170-177, 1998.

Ascherio, A.; Katan, M. B.; Zock, P.L.; Stampfer, M. J.; Willett, W. C. *Trans* fatty acids and coronary heart disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p. 1994-1998, 1999.

Aursand, M.; Grasdalen, H. Interpretation of the <sup>13</sup>C-NMR spectra of omega-3 fatty acids and lipid extracted from the white muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Chem. Phys. Lipids.**, v. 62, p. 239-251, 1992.

Azevedo, C. H. **Teores de isômeros *trans* em gorduras vegetais hidrogenadas avaliados por diferentes técnicas instrumentais.** 96 p. Dissertação (mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

Bannon, C. D.; Craske, J. D.; Hilliker, A. E. Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. Validation of theoretical relative response factors of unsaturated esters in the flame ionization detector. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 63, p. 105-110, 1986.

Bannon, C. D.; Craske, J. D.; Norman, L. M. Effect of overload of capillary gas-liquid chromatographic columns on the equivalent chain lengths of C<sub>18</sub> unsaturated fatty acid methyl esters. **J. Chromatogr.**, v. 447, p. 43-52, 1988.

Barry, E. F. Columns: packed and capillary/column selection in gas chromatography *In: Grob, R. L. (editor). Modern practice of gas chromatography.* New York: John Wiley & Sons, 1995, 887p.

Basso, R.; Almeida-Gonçalves, I.; Mancini-Filho, J. Avaliação qualitativa e quantitativa dos ácidos graxos *trans* em gorduras vegetais hidrogenadas. **Bol. SBCTA**, v. 33, p. 57-63, 1999.

- Bauman, D. E.; Baumgard, L. H.; Corl, B. A.; Griinari, J. M. Biosynthesis of conjugated acid in ruminants. *Proc. Am. Soc Anim. Sci.*, 1999. Disponível em: <<http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0937.pdf>>. Acesso em: 1 nov 2005.
- Blond, J. P.; HENCHIRI, C.; Precigou, P.; Grandgirard, D. A.; Sébédio, J. L. Effect of 18-3 n-3 geometrical-isomers of heated linseed oil on the biosynthesis of arachidonic-acid in rat. **Nutr. Res.**, v. 10, p. 69-79, 1990.
- Brenner, R. R. Effect of unsaturated acids on membrane structure and enzyme kinetics. **Prog. Lipid Res.**, v. 23, p. 69-96, 1984.
- Brito, M. S.; Villavicencio, A. L. C. H. Mancini-Filho, J. Effects of irradiation on *trans* fatty acids formation in ground beef. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 63, p. 337-340, 2002.
- Bruhl, L. Determination of *trans* fatty acids in cold pressed oils and dried seeds. **Fett/Lipid**, v. 98, p. 380-383, 1996.
- Bus, J.; Sies, I.; Jie, M. S. F. L. K. <sup>13</sup>C-NMR of double and triple bond carbon atoms of unsaturated fatty acids methyl esters. **Chem. Phys. Lipids.**, v. 18, p. 130-144, 1977.
- Camacho, M. L.; Victoria, M.; Mendez, R.; Constante, M. G.; Constante, E. G. Kinetics of the *cis-trans* isomerization of linoleic acid in the deodorization and physical refining of edible fats. **Eur. J. Lipid. Sci. Technol.**, v. 103, p. 85-92, 2001.
- Carlson, S. E.; Clandinin, M. T.; Cook, H. W.; Emken, E. A.; Filer-Junior, L. J. *Trans* fatty acids: infant and fetal development. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 66, p. 717S-736S, 1997.
- Caulcutt, R.; Boddy, R. **Statistics for Analytical Chemists**. London: Chapman & Hall, 1994, 253p.
- Chardigny, J. M.; Bretillon, L.; Sébédio, J. L. New insights in health effects of *trans* alpha-linolenic acid isomers in humans. **Eur. J. Lipid. Sci. Technol.**, v. 103, p. 478-482, 2001.
- Christie, W. W. Some recent advances in the chromatographic analysis of lipids. **Analisis**, v. 26, p. 34-40, 1998.
- Cyberlipid. **Monoenoic fatty acids**. Disponível em: <<http://www.cyberlipid.org/fa/adiid/0002.htm>>. Acesso em: 11 abr 2006.

Dahlen, G. H. Lp[a] lipoprotein in cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v. 108, p. 111-126, 1994.

Decsi, T.; Koletzko, B. Do *trans* fatty acids impair linoleic acid metabolism in children? **Ann. Nutr. Metab.**, v. 39, p. 36-41, 1995.

Dionisi, F.; Golay, P. A.; Fay, L. B. Influence of milk fat presence on the determination of *trans* fatty acids in fats used for infant formulae. **Anal. Chem. Acta**, v. 465, p. 395-407, 2002.

Dobson, G.; Christie, W. W.; Nikolova-Damyanova, B. Silver ion chromatography of lipids and fatty acids. **J. Chromatogr. B**, v. 671, p.197-222, 1995.

Dobson, G. Spectroscopy and spectrometry of lipids – Part 1. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 103, p. 815-840, 2001.

Dutton, H. J. Hydrogenation of fats and its significance. *In*: Eraken, E. A.; Dutton, H. J. (editores). **Geometrical and positional isomers**. Champaign: American Oil Chemists Society, 1979, 181p.

Emken, E. A. Nutrition and biochemistry of *trans* and positional fatty acid isomers in hydrogenated oils. **Ann Rev Nutr**, v. 4, p. 339-376, 1984.

Enig, M. G.; Budowski, P.; Blondheim, S. H. *Trans*-unsaturated fatty acids in margarines and human subcutaneous fat in Israel. **Hum. Nutr. Clin. Nutr.**, v. 38, p. 223-230, 1984.

FDR – Food and Drug Regulations. **Regulations amending the food and drugs regulations (1094 – Food Irradiation)**. Canada Gazette, v. 136, n. 47, 23 nov. 2002. Disponível em: <<http://canadagazette.gc.ca/part1/2002/20021123/html/regte1-e.html>>. Acesso em: 08 nov 2005.

Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J. Biol. Chem.** v. 226, p. 497-503, 1956.

Fox, R. Regulation in the European Union. *In*: Rossell, J. B (editor). **Frying: improvement quality**. New York: CRC Press, 2001, 369p.

FSANZ – Food Standards Australia New Zealand. **Erucic acid in foods: a toxicological review and risk assessment**. Technical reports series n. 21, jun. 2003. Disponível em: <[http://www.foodstandards.gov.au/\\_srcfiles/Erucic%20acid%20monograph.pdf](http://www.foodstandards.gov.au/_srcfiles/Erucic%20acid%20monograph.pdf)>. Acesso em: 16 nov 2005.

Gertz, C. Preface. *In*: Rossell, J. B (editor). **Frying: improvement quality**. New York: CRC Press, 2001, 369p.

Ghotra, B. S.; Dyal, S. D.; Narine S. S. Lipid shortenings: a review. **Food Res. Int.**, v. 35, p. 1015-1048, 2002.

Grandgirard, A.; Julliard, F.; Prevost, J.; Sébédio, J. L. Preparation of geometrical isomers of linolenic acid. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 64, p.1434-1440, 1987.

Gray, J. I.; Russel, L. F. Hydrogenation catalysts – their effect on selectivity. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 56, p. 36-56, 1979.

Griinari, J. M.; Nurmela, K.; Dwyer, D. A.; Barbano, D. M.; Bauman, D. E. Variation of milk fat concentration of conjugated linoleic acid and milk fat percentage is associated with a change in ruminal biohydrogenation. **J. Anim. Sci.**, v. 77 (supl.), p. 117-118, 1999.

Gunstone, F.D.; Pollard, M.R.; Scrimgeour, C. M.; Vedanayaga, H. S. <sup>13</sup>C Nuclear magnetic resonance studies of olefinic fatty acids and esters. **Chem. Phys. Lipids.**, v. 18, p.115-129, 1977.

Gunstone, F. D.; Harwood, J. L.; Padley, F. B. **The Lipid Handbook**. London: Chapman and Hall, 1986, 551p.

Gunstone, F. D. Movements towards tailor-made fats. **Prog. Lip. Res.**, v. 37, p.277-305, 1998.

Hartman, L.; Lago, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, v. 22, p. 475-477, 1973.

Hasman, J. M. Trans supression in hydrogenated oils. **Inform**, v. 6, p. 1206-1213, 1995.

Hénon, G.; Kemény, Z.; Recseg, K.; Zwobada, F.; Kovari, K. Deodorization of vegetable oils. Part I: Modeling the geometrical isomerization of polyunsaturated fatty acids. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 76, p. 73-81, 1999.



Holmer, G. Biochemistry of *trans*-monoenoic fatty acids. *In*: Sébédio, J.L.; Christie W. W. (editores). **Trans fatty acids in human nutrition**. Dundee: The Oil Press, 1998, 318p.

Hornstra, G. A.; van Houwelingen, A. C.; Kester, D. M.; Sundram, K. A. A palm oil enriched diet lowers serum lipoprotein [a] in normocholesterolemic volunteers. **Atherosclerosis**, v. 90, p. 91-93, 1991.

Hu, F. B.; Manson, J. E.; Willett, W. C. Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: a critical review. **J. Am. Coll. Nutr.**, v. 20, p. 5-19, 2001.

Hunter, J. E. Dietary levels of trans fatty acids: basis for health concerns and industry efforts to limit use. **Nutr. Res.**, v. 25, p. 499-513, 2005.

IFST - Institute of Food Science & Technology. **The use of irradiation for food quality and safety**. 1998. Disponível em:<<http://www.ifst.org/hottop11.htm>>. Acesso em: 08 nov 2005.

ISO - International Organization for Standardization. **Animal and vegetable fats and oils – preparation of methyl esters fatty acids**, ISO, Geneve, Method ISO 5509, p. 1-6, 1978.

Jenkins, T. C. Feeding oleamide to lactating Jersey cows. 1. Effects on lactation performance and milk fatty acid composition. **J. Dairy Sci.**, v. 83, p. 332-337, 2000.

Johnson, L. A. Recovery, refining, converting, and stabilizing edible fats and oils. *In*: Akoh, C. C.; Min, D. B. (editores). **Food Lipids**. New York: Marcel Dekker, 1998, 816p.

Joseph, J. D.; Ackman, R. G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oils ethyl esters: collaborative study. **J. AOAC Int.**, v. 75, p. 488-506, 1992.

Judd, J. T.; Clevidence, B. A.; Muesing, R. A.; Wittes, J.; Sunkin, M. E.; Podczasy, J. J. Dietary *trans* fatty acids: effects of plasma lipids and lipoproteins on healthy men and women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 59, p. 861-868, 1994.

Judd, J.T.; Baer, D. J.; Clevidence, B. A.; Muesing, R. A.; Chen, S. C.; Weststrat, J. A.; Meijer, G. W.; Wittes, J.; Lichtenstein, A. H.; Vilella-Bach, M.; Schaefer, E. J. Effects of margarine compared with those of butter on blood lipid profiles related to

cardiovascular disease risk factors in normolipemic adults fed controlled diets. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 68, p. 768-777, 1998.

Katan, M. B.; Mensink, R. P.; Zock, P. L. *Trans* fatty acids and their effect on lipoproteins in humans. **Annu. Rev. Nutr.**, v.15, p. 473-493, 1995.

Karabulut, I.; Kayahan, M.; Yaprak, S. Determination of changes in some physical and chemical properties of soybean oil during hydrogenation. **Food. Chem.**, v. 81, 453-456, 1995.

Khanal, R. C.; Dhiman, T. R. Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): a review. **Pak. J. Nutr.**, v. 3, p. 72-81, 2004.

Kirstein, D.; Hoy, C. E.; Holmer, G. Effect of dietary fats on the delta-6-desaturation and delta-5-desaturation of fatty-acids in rat-liver microsomes. **Br. J. Nutr.**, v. 50, p. 749-753, 1983.

Koga, T.; Nonaka, M.; Gu, J. Y.; Sugano, M. Linoleic and alpha-linolenic acids differently modify the effects of elaidic acid on polyunsaturated fatty acid metabolism and some immune indices in rats. **Br. J. Nutr.**, v. 77, p. 645-656, 1997.

Ledoux, M.; Laloux, L.; Wolff, R. L. Analytical methods for determination of trans-C18 fatty acid isomers in milk fat. A review. **Analisis**, v. 28, p. 402-412, 2000.

Ledoux, M.; Rouzeau, A.; Bas, P.; Sauvant, D. Occurrence of *trans*-C18:1 fatty acid isomers in goat milk: effect of two dietary regimens. **J. Dairy Sci.**, v. 85, p.190-197, 2002.

Lichtenstein, A. H.; Ausman, L. M.; Carrasco, W.; Jenner, J. L.; Ordovas, J. M.; Schaefer, E. J. Hydrogenation impairs the hypolipidemic effect of corn oil in humans. Hydrogenation, *trans* fatty acids, and plasma lipids. **Arterioscler. Thromb.**, v. 13, p. 154-161, 1993.

Lichtenstein, A. H.; Ausman, L. M.; Jalbert, S. M.; Schaefer, E. J. Effects of different forms of dietary hydrogenated fats on serum lipoprotein cholesterol levels. **N. Engl. J. Med.**, v. 340, p.1933-1940, 1999.

Lippi, G.; Guidi, G. Biochemical risk factors and patient's outcome: The case of lipoprotein(a). **Clin. Chim. Acta**, v. 280, p. 59-71, 1999.

Lovejoy, J. C. Dietary fatty acids and insulin resistance. **Curr. Atheroscler. Rep.**, v. 1, p. 215-220, 1999.

Maia, E. L.; Roddriguez-Amaya, D. B. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 53, n. 1/2, p. 27-35, 1993.

Mahfouz, M. M.; Smith, T. L.; Kummerow, F. A. Effect of dietary fats on desaturase activities and the biosynthesis of fatty-acids in rat-liver microsomes. **Lipids**, v. 19, p. 214-222, 1984.

Mensink, R. P.; Katan, M. B. Effect of dietary *trans* fatty acids on high-density and low-density lipoprotein cholesterol levels in healthy subjects. **N. Engl. J. Med.**, v. 323, p. 439-445, 1990.

Mensink, R. P.; Zock, P. L.; Katan, M. B.; Hornstra, G. Effect of dietary *cis* and *trans* fatty acids on serum lipoprotein[a] levels in humans. **J. Lipid. Res.**, v. 33, p. 1493-1501, 1992.

Min, D. B. **Food Lipids**. 2005. Disponível em: <<http://class.fst.ohio-state.edu/fst821>>. Acesso em: 10 out 2005.

Miyake, Y.; Yokomizo, K. Determination of *cis* and *trans* 18:1 fatty acid isomers in hydrogenated vegetable oils by high-resolution carbon nuclear magnetic resonance. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 75, p. 801-805, 1998.

Moreno, M. C. M. M.; Olivares, D. M.; López, F. J. A.; Adelantado, J. V. G.; Reig, F. B. Determination of unsaturation grade and *trans* isomers generated during thermal oxidation of edible oils and fats by FTIR. **J. Mol. Struct.**, v. 482, p. 551-556, 1999.

Mosley, E. E.; Powell, G. L.; Riley, M. B.; Jenkins, T. C. Microbial biohydrogenation of oleic acid to *trans* isomers in vitro. **J. Lipid Res.**, v. 43, p. 290-296, 2002.

Mossoba, M. M.; Mcdonald, R. E.; Armstrong, D. J.; Page, S. W. Identification of minor C18 triene and conjugated diene isomers in hydrogenate soybean oil and margarine by GC-MI-FT-IR Spectroscopy. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 29, p. 324-330, 1991.

Muller, H.; Jordal, O.; Seljeflot, I.; Kierulf, P.; Kirkhus, E.; Ledsaak, O. Effect on plasma lipids and lipoproteins of replacing partially hydrogenated fish oil with vegetable fat in margarine. **Br. J. Nutr.**, v. 80, p. 243-251, 1998.

Nawar, W. W. Lipids. *In*: Fenema, O. R. (editor). **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1996, 1069p.

Neff, W. E.; Adlof, R. O.; El-Agaimy, M. Silver ion high-performance liquid-chromatography of the triacylglycerols of crepis-alpina seed oil. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 71, p. 853-855, 1994.

Nestel, P.; Noakes, M.; Belling, B.; Mcarthur, R.; Clinfton, P.; Janus, E.; Abbey, M. Plasma lipoprotein lipid and Lp[a] changes with substitution of elaidic acid for oleic acid in the diet. **J. Lipid. Res.**, v. 33, p.1029-1036, 1992.

Okonek, D. V.; Berben, P. H.; Martelli, G. Precious metal catalysis for fats and oils applications. *In*: Latin American Congress and Exhibit on Fats and Oils Processing, 6., 1995, Campinas. **Proceedings**. Campinas: Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras, 1995. p. 39-46.

Peene, J.; Zeeuw, J.; Biermans, F.; Joziasse, L. **CP-Select CB for FAME**. 2003. Disponível em: [http://www.varianinc.com/image/vimage/docs/products/consum/gccolumns/select/shared/Pitt2003\\_300\\_8P\\_FAME.pdf](http://www.varianinc.com/image/vimage/docs/products/consum/gccolumns/select/shared/Pitt2003_300_8P_FAME.pdf). Acesso em: 23 abr 2006.

Pelaez-Alvarez, V. M., Szmrecsányi, T., Tango, J. S. Determinants of technological innovation in the shortening industry. *In*: International meeting on fats and oils, 1., 1991, Campinas. **Proceedings**. Campinas: Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras, 1991. p. 129-137

Pfeffer, P. E.; Luddy, F. E.; Unruh, J. Analytical <sup>13</sup>C NMR: A rapid, nondestructive method for determining the *cis*, *trans* composition of catalytically treated unsaturated lipid mixtures. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 54, p. 380-386, 1977.

Precht, D.; Molquentin, J. *Trans* fatty acids: Implications for health, analytical methods in edible fats and intake. **Nahrung**, v. 39, p. 343-374, 1995.

Precht, D.; Molquentin, J. Identification and quantitation of *cis/trans* C16:1 and C17:1 fatty acid positional isomers in German human milk lipids by thin-layer chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. **Eur. J. Lipid Sci Technol**. v. 102, p. 102-113, 2000.

Rakoff, H.; Emken, E. Synthesis and properties of methyl 9,12,15-octadecatrienoate geometric isomers. **Chem. Phys. Lipids.**, v. 31, p. 215-235, 1982.

Ratanayake, W. M. N.; Beare-Rogers, J. L. Problems of analyzing C18 *cis* and *trans* fatty acids of margarine on the SP-2340 capillary column. **J. Chromatogr. Sci.**, v. 28, p. 633-639, 1990.

Ratnayake, W. M. N. Determination of *trans* unsaturation by infrared spectrophotometry and determination of fatty acid composition of partially hydrogenated vegetable oils and animal fats by gas chromatography/infrared spectrophotometry: collaborative study. **J. AOAC. Int.**, v. 78, p. 783-802, 1995.

Ratnayake, W. M. N. Analysis of *trans* fatty acids. *In*: Sébédio, J. L.; Christie, W. W. (editores). **Trans fatty acids in human nutrition**. Dundee: The oil press, 1998, 318p.

Reis, J. M. L. O consumo domiciliar dos alimentos nos planos cruzado e real. **Rev. Pol. Agric.**, v. 9, p. 13-35, 2000.

Romero, A.; Cuesta, C.; Sánchez-Muniz, F. J. Trans fatty acid production in deep fat frying of frozen foods with different oils and frying modalities. **Nutr. Res.**, v. 20, p. 599-608, 2000.

Rossell, J. B. Introduction. *In*: Rossell, J. B. (editor). **Frying: improvement quality**. New York: CRC Press, 2001, 369p.

Sacchi, R.; Addeo, F.; Paolillo, L. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR of virgin olive oil: an overview. **Magn. Reson. Chem.**, v. 35, p. 133-145, 1997.

Salmerón, J.; Hu, F. B.; Manson, J. E.; Stampfer, M.J.; Colditz, G. A.; Rimm, E. B.; Willett, W. C. Dietary fat intake and risk of type 2 diabetes in women. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, p. 1019-1026, 2001.

Sanibal, E. A. A.; Mancini-Filho, J. Perfil de ácidos graxos *trans* de óleo e gordura hidrogenada de soja no processo de fritura. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, p. 27-31, 2004.

Schaefer, E. J. Lipoproteins, nutrition and heart disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 75, p. 191-212, 2002.

Scholfield, C. R. Gas chromatographic equivalent chain lengths of fatty acids methyl esters on Silar 10C glass capillary column. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 58, p. 662-663, 1981.

- Scrimgeour, C. M.; Macvean, A.; Fernie, C.; Sébédio, J. L.; Riemersma, A. R. Dietary *trans* alpha-linolenic acid does not inhibit delta-5 and delta-6 desaturation of linoleic acid in man, **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 103, p.341-349, 2001.
- Sedman, J.; Van de Voort, F. R.; Ismail, A. A.; Maes, P. Industrial validation of Fourier transform infrared *trans* and iodine value analyses of fats and oils. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 75, p. 33-39, 1998.
- Shanta, N. C.; Ackman, R. G. Nervonic acid versus tricosanoic acid as internal standards in quantitative gas chromatographic analysis of fish longer-chain n-3 polyunsaturated acid methyl ester. **J. Chromatog. B**, v. 533, p. 1-10, 1990.
- Shereve, R. N.; Brink, J. A. **Indústrias de processos químicos**. Guanabara: Koogan, 1997, 717p.
- Shurtleff, W.; Aoyagi, A. **History of soy oil hydrogenation and of research on the safety of hydrogenated vegetable oils**. 2004. Disponível em:<<http://www.thesoydai.lyclub.com/SFC/MSPproducts501.asp>>. Acesso em: 10 mar 2005.
- Sommerfeld, M. *Trans* unsaturated fatty acids in natural products and processed foods. **Prog. Lipid. Res.**, v. 22, p. 221-233, 1983.
- Sugano, M.; Ikeda, I. Metabolic interactions between essential and *trans* fatty acids. **Curr. Opin. Lipidol.**, v. 7, p. 38-42, 1996.
- Sundram, K.; Ismail, A.; Hayes, K. C.; Jeyamalar, R.; Pathmanathan, R.; *Trans* (elaidic) fatty acids adversely affect the lipoprotein profile relative to specific saturated fatty acids in humans. **J. Nutr.**, v. 127, p. 514S-520S, 1997.
- Stampfer, M.J.; Sacks, F. M.; Salvini, S.; Willett, W. C.; Hennekens, C. H. A prospective-study of cholesterol, apolipoproteins, and the risk of myocardial-infarction. **N. Engl. J. Med.**, v. 325, p. 373-381, 1991.
- Takagi, T.; Itabashi, Y. Occurrence of mixtures of geometrical-isomers of conjugated octadecatrienoic acids in some seed oils - analysis by open-tubular gas-liquid-chromatography. **Lipids**, v. 16, p. 546-551, 1981.
- Tasan, M.; Demirci, M. *Trans* FA in sunflower oil at different steps of refining, **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 80, p. 825-828, 2003.

Tulloch, A. P.; Bergter, L. Analysis of the conjugated trienoic acid containing oil from *Fevillea trilobata* by  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Lipids**, v. 14, p. 996-1002, 1979.

Tulloch, A. P. C-13 nuclear magnetic-resonance spectroscopic analysis of seed oils containing conjugated unsaturated-acids. **Lipids**, v. 17, p. 544-550, 1982.

Ulberth, F.; Haider, H. J. Determination of low level *trans* unsaturation in fats by fourier transform infrared spectroscopy. **J. Food Sci.**, v. 57, p. 1444-1447, 1992.

Verghese, A.; Prasad, A. K.; Khase, S.; Bhatia, R. Immune profile in respiratory viral infections in asthmatics. **Indian J. Allergy Asthma Immunol.**, v. 15, p. 87-92, 2001.

Warner, K. Chemistry of frying fats. *In*: Akoh, C. C.; Min, D. B. (editores). **Food Lipids**. New York: Marcel Dekker, 1998, 816p.

Weiland, S. K.; von Mutius, E.; Husing, A.; Asher, M. I. Intake of *trans* fatty acids and prevalence of childhood asthma and allergies in Europe. **Lancet**, v. 353, p. 2040-2041, 1999.

Weiss, T. **Food oils and their uses**. 2. ed. Connecticut: The AVI Publishing Company INC, 1983, 310p.

Wolff, R. L.; Sébédio, J. L. Geometrical isomers of linolenic acid in low-calorie spreads marketed in France. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 68, p. 719-725, 1991.

Wolff, R. L. *Trans* polyunsaturated fatty acids in French edible rapeseed and soybean oils. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 69, p. 106-110, 1992a.

Wolff, R. L. Resolution of linolenic acid geometrical isomers by gas-liquid chromatography on a capillary column coated with a 100% cyanopropyl polysiloxane film (CP<sup>TM</sup>Sil 88). **J. Chromatogr. Sci.**, v. 30, p. 17-22, 1992b.

Wolff, R. L. Further studies on artificial geometrical isomers of alpha-linolenic acid in edible acid-containing oils. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 70, p. 219-224, 1993a.

Wolff, R. L. Heat-induced geometrical isomerisation of alpha-linolenic acid: effect of temperature and heating time on the appearance of individual isomers. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 70, p. 425-430, 1993b.

Wolff, R. L. Contribution of *trans*-18:1 acids from dairy fat to european diets. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 71, p. 277-283, 1994.

Wolff, R. L. Content and distribution of trans-18:1 acids in ruminant milk and meat fats. Their importance in European diets and their effect on human milk. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 72, p. 259-272, 1995a.

Wolff, R. L.; Bayard, C. C. Improvement in the resolution of individual *trans*-18:1 isomers by capillary gas-liquid chromatography: use of a 100 m CP-Sil 88 column. **J. Am. Oil. Chem. Soc.**, v. 72, p. 1197-1202, 1995b.

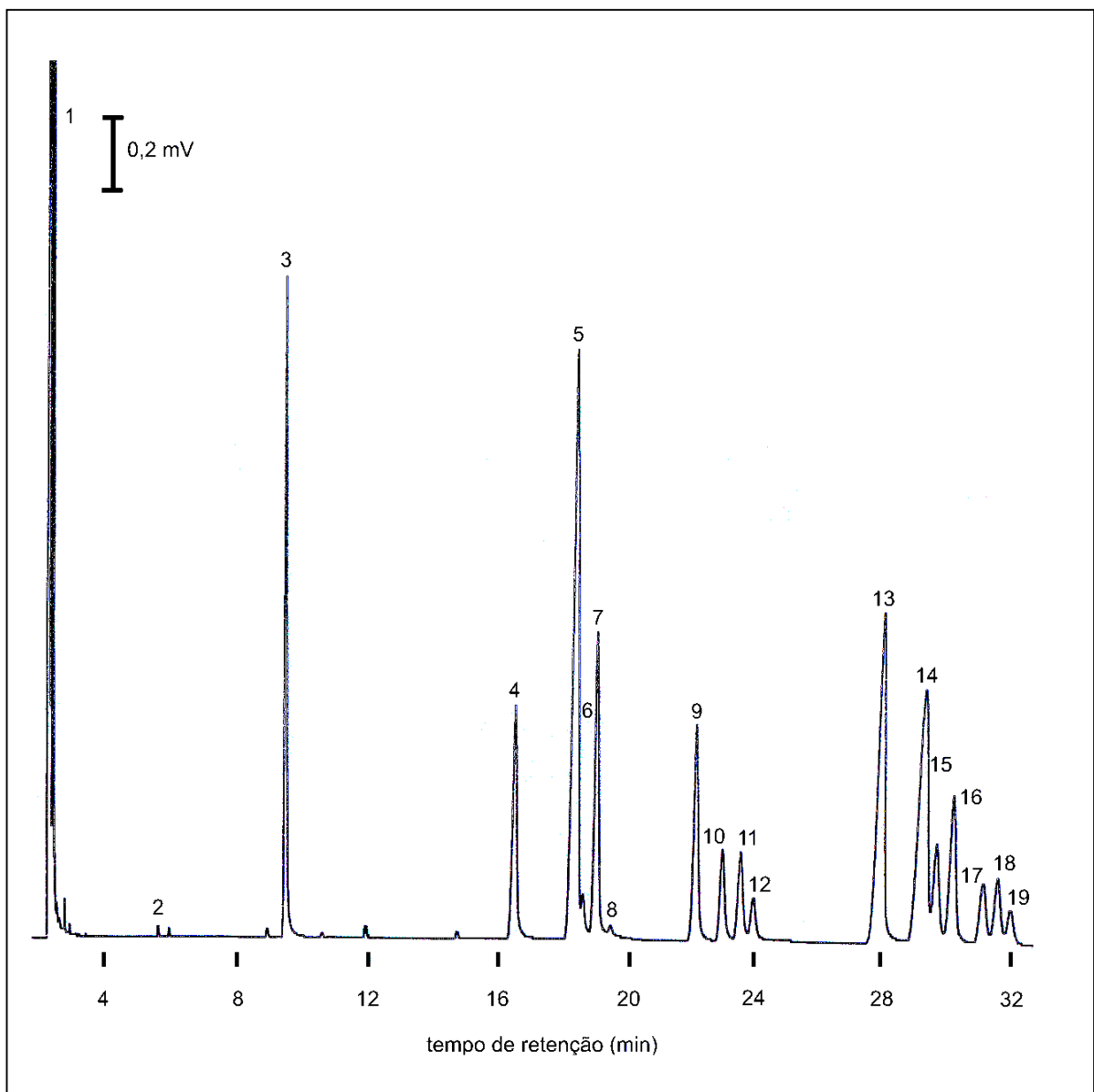
Wolff, R. L. Are *trans* isomers of alpha-linolenic acid of nutritional significance for certain populations? **Lipids**, v. 37, p.1147-1148, 2002.

Zock, P. L.; Katan, M.B. Hydrogenation alternatives: effects of *trans* fatty acids and stearic acids versus linoleic acid on serum lipids and lipoproteins in humans. **J Lipid Res** v. 33, 399-410, 1992.

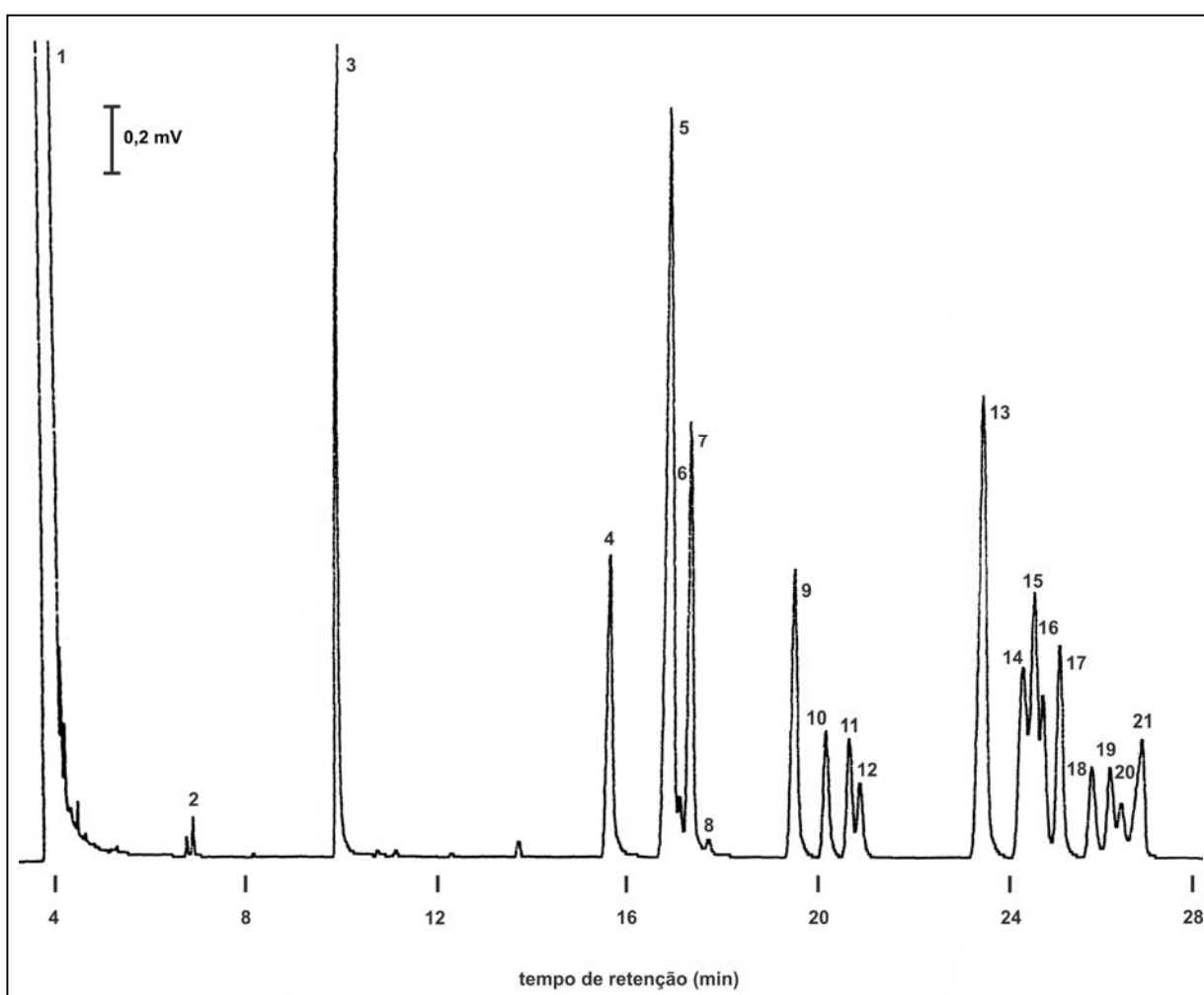


## 8. ANEXOS

**ANEXO I:** Cromatograma dos ésteres metílicos, preparados a partir do óleo de linhaça isomerizado. (1) solvente; (2) 14:0; (3) 16:0; (4) 18:0; (5) 18:1 9*t*; (6) 18:1 11*t*; (7) 18:1 9*c*; (8) 18:1 11*c*; (9) 18:2 9*t*,12*t*; (10) 18:2 9*c*,12*t*; (11) 18:2 9*t*,12*c*; (12) 18:2 9*c*,12*c*; (13) 18:3 9*t*,12*t*,15*t*; (14) 18:3 9*c*,12*t*,15*t* + 18:3 9*t*,12*c*,15*t*; (15) 18:3 9*c*,12*c*,15*t*; (16) 18:3 9*t*,12*t*,15*c*; (17) 18:3 9*c*,12*t*,15*c*; (18) 18:3 9*t*,12*c*,15*c*; (19) 18:3 9*c*,12*c*,15*c* – Coluna CP Sil-88 (50 m x 0,25 mm x 0,25 μm) - Análise em 150 °C.



**ANEXO II:** Cromatograma dos ésteres isopropílicos, preparados a partir do óleo de linhaça isomerizado. (1) solvente; (2) 14:0; (3) 16:0; (4) 18:0; (5) 18:1 9*t*; (6) 18:1 11*t*; (7) 18:1 9*c*; (8) 18:1 11*c*; (9) 18:2 9*t*,12*t*; (10) 18:2 9*c*,12*t*; (11) 18:2 9*t*,12*c*; (12) 18:2 9*c*,12*c*; (13) 18:3 9*t*,12*t*,15*t*; (14); 18:3 9*c*,12*t*,15*t*; (15) 18:3 9*t*,12*c*,15*t*; (16) 18:3 9*c*,12*c*,15*t*; (17) 18:3 9*t*,12*t*,15*c*; (18) 18:3 9*c*,12*t*,15*c*; (19) 18:3 9*t*,12*c*,15*c*; (20) 18:3 9*c*,12*c*,15*c* (21) 20:0 (adicionado a amostra). – Coluna CP Sil-88 (50 m x 0,25 mm x 0,25 μm) - Análise em 165 °C.



**ANEXO III:** Valores de comprimento equivalente de cadeia (ECL), calculados a partir do tempo de retenção corrigido de ésteres metílicos dos ácidos gordoico, araquídico, linoléico e alfa-linolênico, e seus isômeros geométricos.

Ésteres de ácidos graxos	ECL/Temperatura (°C)				
	155	160	165	170	175
18:2 9 <i>t</i> ,12 <i>t</i>	19,023 ± 0,004	19,049 ± 0,003	19,070 ± 0,005	19,090 ± 0,006	19,114 ± 0,006
18:2 9 <i>c</i> ,12 <i>t</i>	19,178 ± 0,004	19,213 ± 0,004	19,243 ± 0,006	19,272 ± 0,005	19,309 ± 0,005
18:2 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i>	19,259 ± 0,004	19,294 ± 0,003	19,324 ± 0,007	19,356 ± 0,005	19,392 ± 0,006
18:2 9 <i>c</i> ,12 <i>c</i>	19,330 ± 0,004	19,376 ± 0,003	19,410 ± 0,005	19,450 ± 0,004	19,497 ± 0,004
18:3 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>t</i>	19,962 ± 0,002	20,005 ± 0,005	20,037 ± 0,005	20,073 ± 0,004	20,115 ± 0,005
18:3 9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>t</i>	20,022 ± 0,004	20,070 ± 0,005	20,125 ± 0,004	20,164 ± 0,003	20,214 ± 0,004
18:3 9 <i>c</i> ,12 <i>t</i> ,15 <i>c</i>	20,181 ± 0,004	20,239 ± 0,004	20,279 ± 0,006	20,325 ± 0,004	20,381 ± 0,005
18:3 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>c</i>	20,223 ± 0,003	20,280 ± 0,004	20,318 ± 0,007	20,361 ± 0,005	20,415 ± 0,005
18:3 9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>c</i>	20,284 ± 0,003	20,350 ± 0,006	20,393 ± 0,005	20,463 ± 0,005	20,511 ± 0,004
20:0	20,004 ± 0,003	19,999 ± 0,003	20,001 ± 0,001	20,002 ± 0,002	20,001 ± 0,003
20:1 11 <i>c</i>	20,433 ± 0,002	20,464 ± 0,004	20,495 ± 0,003	20,520 ± 0,002	20,554 ± 0,001

Os valores são médias de seis determinações, acompanhados de seu desvio-padrão.

Coluna CP Sil-88 (50 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

**ANEXO III: (continuação)**

Ésteres de ácidos graxos	ECL/Temperatura (°C)				
	180	185	190	195	200
18:2 9 <i>t</i> ,12 <i>t</i>	19,137 ± 0,001	19,159 ± 0,002	19,182 ± 0,002	19,206 ± 0,002	19,228 ± 0,002
18:2 9 <i>c</i> ,12 <i>t</i>	19,343 ± 0,002	19,377 ± 0,003	19,412 ± 0,003	19,448 ± 0,003	19,482 ± 0,002
18:2 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i>	19,425 ± 0,001	19,459 ± 0,003	19,494 ± 0,003	19,530 ± 0,002	19,565 ± 0,002
18:2 9 <i>c</i> ,12 <i>c</i>	19,541 ± 0,002	19,583 ± 0,003	19,628 ± 0,003	19,674 ± 0,003	19,720 ± 0,002
18:3 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>t</i>	20,154 ± 0,002	20,193 ± 0,001	20,235 ± 0,002	20,276 ± 0,003	20,316 ± 0,003
18:3 9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>t</i>	20,258 ± 0,003	20,300 ± 0,001	20,343 ± 0,004	20,381 ± 0,003	20,419 ± 0,004
18:3 9 <i>c</i> ,12 <i>t</i> ,15 <i>c</i>	20,434 ± 0,003	20,514 ± 0,001	20,565 ± 0,004	20,615 ± 0,003	20,662 ± 0,004
18:3 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>c</i>	20,466 ± 0,003	20,514 ± 0,002	20,565 ± 0,004	20,615 ± 0,004	20,662 ± 0,004
18:3 9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>c</i>	20,575 ± 0,003	20,630 ± 0,003	20,693 ± 0,004	20,755 ± 0,003	20,819 ± 0,003
20:0	20,002 ± 0,001	19,998 ± 0,002	20,000 ± 0,001	19,999 ± 0,001	20,001 ± 0,002
20:1 11 <i>c</i>	20,580 ± 0,001	20,603 ± 0,004	20,633 ± 0,002	20,655 ± 0,003	20,682 ± 0,002

Os valores são médias de seis determinações, acompanhados de seu desvio-padrão.

Coluna CP Sil-88 (50 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

**ANEXO IV:**

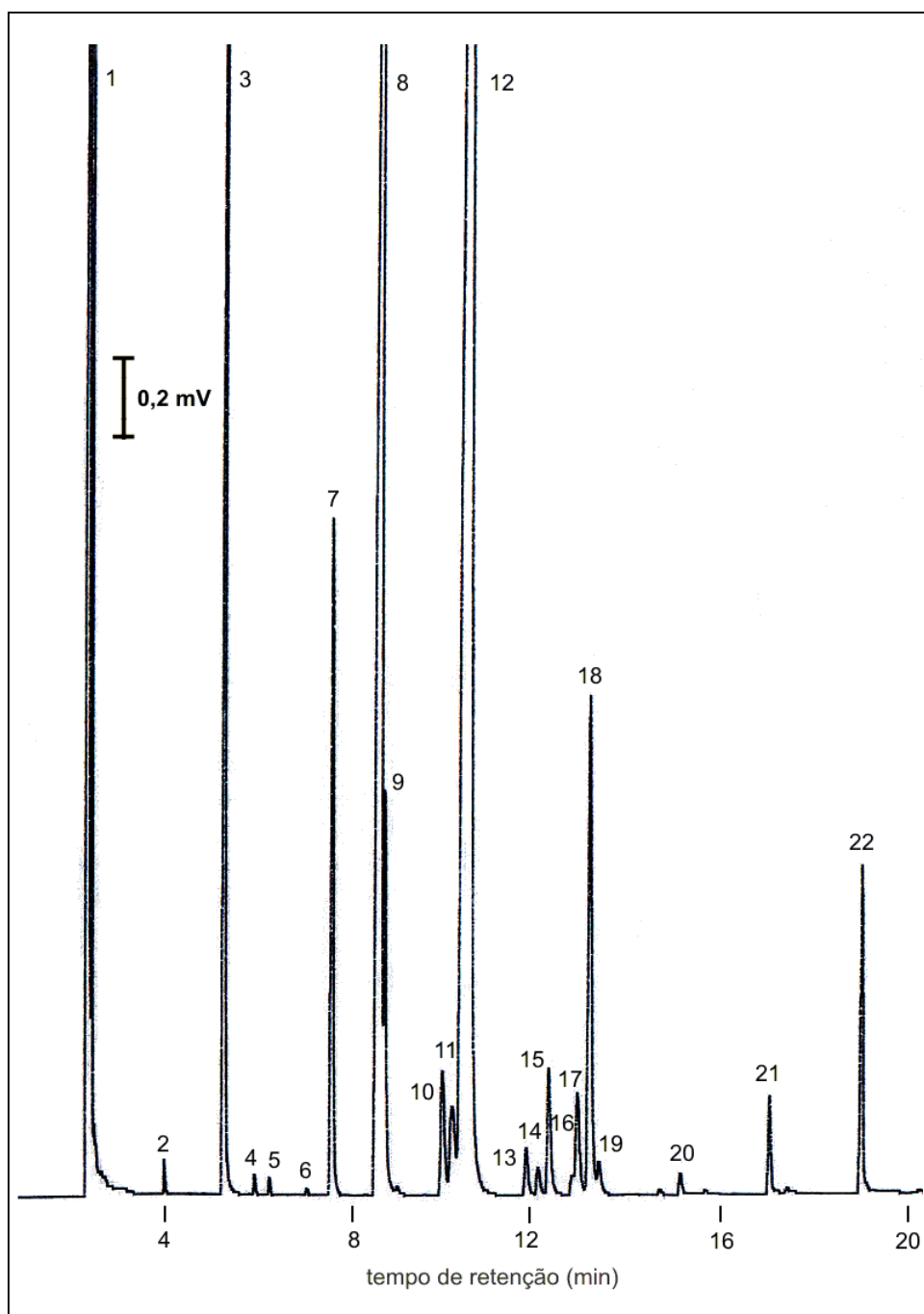
(a) Valores dos coeficientes angular, linear e de correlação, para as equações obtidas da análise de regressão linear dos valores de ECL relacionados no ANEXO III.

Ésteres de ácidos graxos	Parâmetros da regressão linear (ECL = a + bT)		
	a	b (10 <sup>-3</sup> )	r
18:2 9t,12t	18,322	4,526	0,9998
18:2 9c,12t	18,128	6,757	0,9997
18:2 9t,12c	18,205	6,785	0,9998
18:2 9c,12c	17,987	8,641	0,9995
18:3 9t,12c,15t	18,744	7,845	0,9997
18:3 9c,12c,15t	18,661	8,839	0,9991
18:3 9c,12t,15c	18,481	10,922	0,9982
18:3 9t,12c,15c	18,712	9,747	0,9996
18:3 9c,12c,15c	18,457	11,776	0,9995
20:1 11c	19,585	5,507	0,9991

(b) Valores dos coeficientes angular, linear e de correlação, para as equações obtidas da análise de regressão linear dos valores de  $\Delta$ ECL.

$\Delta$ ECL	Parâmetros da regressão linear		
	a	b (10 <sup>-3</sup> )	r
(20:1) – (18:3 9c,12c,15c)	1,137	- 6,320	- 0,9960
(18:2 9c,12c) – (18:2 9c,12t)	0,216	1,840	0,9982
(18:3 9t,12c,15c) – (18:3 9c,12t,15c)	0,108	- 0,423	- 0,9930

**ANEXO V:** Cromatograma dos ésteres metílicos de uma amostra de óleo de soja refinado. (1) solvente; (2) 14:0; (3) 16:0; (4) 16:1 9c; (5) 17:0; (6) 17:1 10c; (7) 18:0; (8) 18:1 9c; (9) 18:1 11c; (10) 18:2 9c,12t; (11) 18:2 9t,12c; (12) 18:2 9c,12c; (13) 20:0; (14); 18:3 9t,12c,15t; (15) 18:3 9c,12c,15t; (16) 18:3 9c,12t,15c; (17) 18:3 9t,12c,15c; (18) 18:3 9c,12c,15c; (19) 20:1 11c; (20) 20:2 11c, 14c; (21) 22:0; (22) 23:0 – padrão interno. - Coluna CP Sil-88 (50 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m). Análise efetuada a 170 °C por 12 min sendo então elevada a 15 °C min<sup>-1</sup> à 225 °C, permanecendo nesta temperatura por 10 min.



**ANEXO VI:** Valores de comprimento equivalente de cadeia (ECL), calculados a partir do tempo de retenção corrigido de ésteres metílicos de ácidos graxos octadecenóicos *cis* e *trans*.

Ésteres de ácidos graxos	ECL/Temperatura (°C)					
	155	165	175	185	195	200
18:1 6 <i>c</i>	18,337 ± 0,001	18,371 ± 0,000	18,406 ± 0,001	18,442 ± 0,001	18,477 ± 0,001	18,496 ± 0,002
18:1 6 <i>t</i>	18,216 ± 0,000	18,233 ± 0,001	18,250 ± 0,001	18,268 ± 0,001	18,282 ± 0,002	18,292 ± 0,001
18:1 9 <i>c</i>	18,373 ± 0,000	18,411 ± 0,001	18,448 ± 0,001	18,488 ± 0,001	18,527 ± 0,001	18,547 ± 0,001
18:1 9 <i>t</i>	18,243 ± 0,001	18,263 ± 0,002	18,284 ± 0,001	18,305 ± 0,001	18,321 ± 0,002	18,333 ± 0,001
18:1 11 <i>c</i>	18,458 ± 0,000	18,495 ± 0,000	18,532 ± 0,001	18,571 ± 0,000	18,609 ± 0,001	18,629 ± 0,002
18:1 11 <i>t</i>	18,299 ± 0,001	18,318 ± 0,001	18,337 ± 0,000	18,357 ± 0,001	18,372 ± 0,001	18,381 ± 0,002
18:1 12 <i>c</i>	18,500 ± 0,001	18,530 ± 0,002	18,566 ± 0,003	18,601 ± 0,002	18,641 ± 0,001	18,656 ± 0,002
18:1 12 <i>t</i>	18,326 ± 0,002	18,343 ± 0,002	18,362 ± 0,003	18,380 ± 0,003	18,400 ± 0,002	18,408 ± 0,002
18:1 13 <i>c</i>	18,566 ± 0,003	18,601 ± 0,002	18,638 ± 0,001	18,673 ± 0,002	18,705 ± 0,001	18,722 ± 0,001
18:1 13 <i>t</i>	18,375 ± 0,003	18,395 ± 0,003	18,412 ± 0,004	18,432 ± 0,003	18,448 ± 0,004	18,459 ± 0,003
18:1 14 <i>c</i>	18,649 ± 0,002	18,681 ± 0,002	18,712 ± 0,002	18,745 ± 0,002	18,776 ± 0,003	18,796 ± 0,004
18:1 15 <i>t</i>	18,456 ± 0,003	18,473 ± 0,004	18,490 ± 0,003	18,508 ± 0,002	18,522 ± 0,003	18,533 ± 0,004
18:1 15 <i>c</i>	18,702 ± 0,002	18,733 ± 0,001	18,768 ± 0,001	18,799 ± 0,001	18,827 ± 0,001	18,847 ± 0,003
18:1 16 <i>t</i>	18,658 ± 0,002	18,675 ± 0,002	18,689 ± 0,003	18,704 ± 0,003	18,721 ± 0,002	18,727 ± 0,002

Os valores são médias de cinco determinações, acompanhados de seu desvio-padrão.

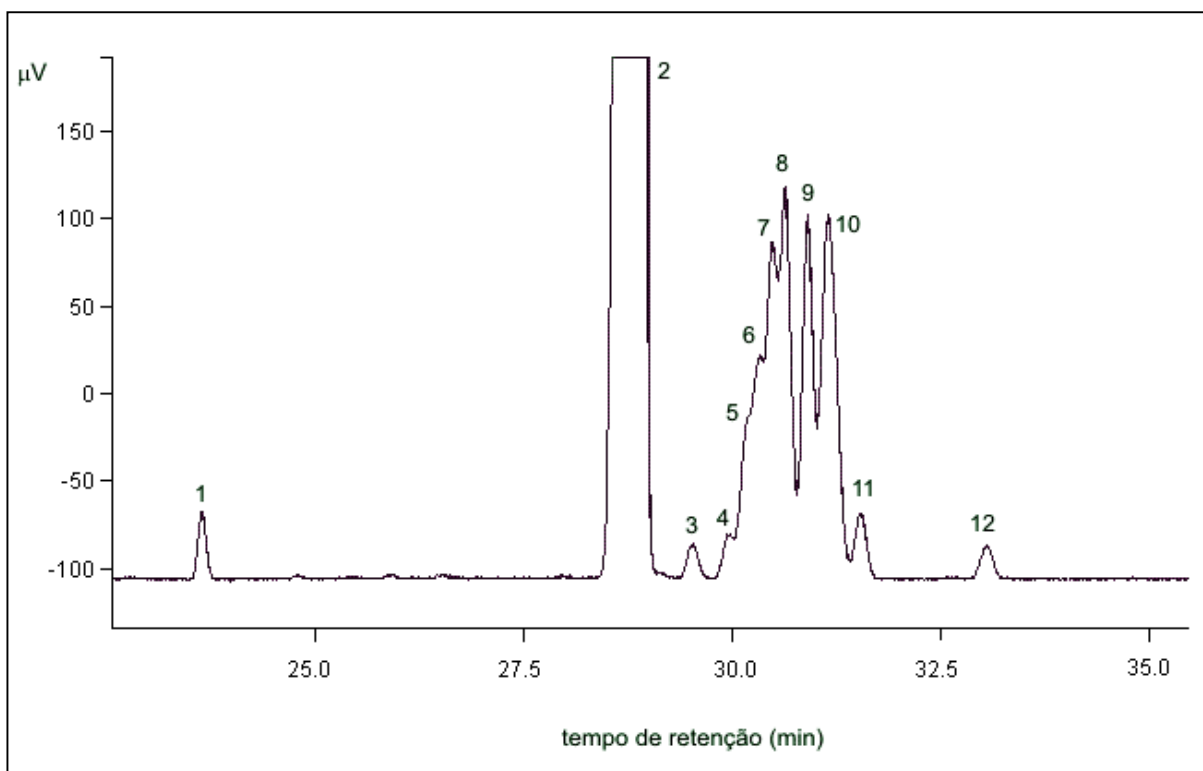
Coluna CP Select CB-FAME – (100 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

**ANEXO VII:** Valores dos coeficientes angular, linear e de correlação, para as equações obtidas da análise de regressão linear dos valores de ECL relacionados no ANEXO VI.

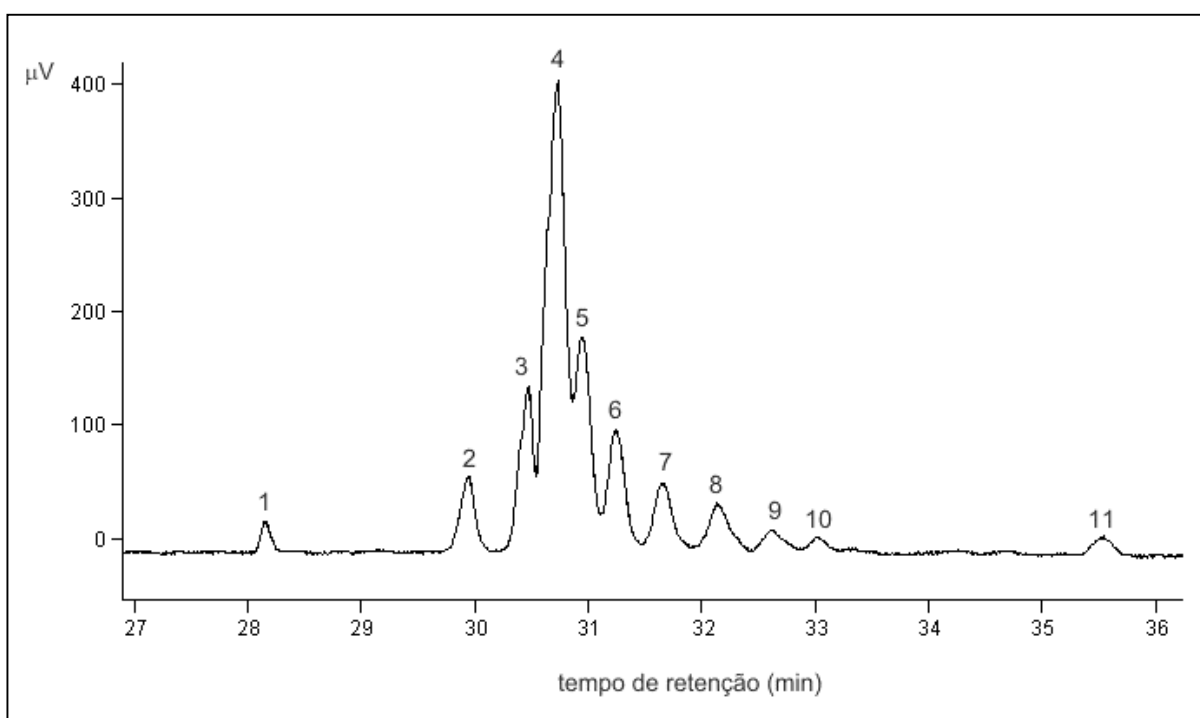
Ésteres de ácidos graxos	Parâmetros da regressão linear (ECL = a + bT)		
	a	b (10 <sup>-3</sup> )	r
18:1 6c	17,789	3,533	0,9999
18:1 6t	17,957	1,676	0,9995
18:1 9c	17,773	3,869	0,9999
18:1 9t	17,936	1,984	0,9993
18:1 11c	17,868	3,801	0,9999
18:1 11t	18,017	1,825	0,9992
18:1 12c	17,950	3,532	0,9993
18:1 12t	18,040	1,844	0,9998
18:1 13c	18,029	3,471	0,9997
18:1 13t	18,090	1,842	0,9995
18:1 14c	18,147	3,233	0,9997
18:1 15t	18,194	1,690	0,9994
18:1 15c	18,208	3,190	0,9995
18:1 16t	18,421	1,534	0,9995



**ANEXO VIII:** Cromatograma dos ésteres metílicos de ácidos graxos saturados e AGT 18:1, provenientes de gordura parcialmente hidrogenada previamente fracionada por CCD/Ag<sup>+</sup>. (1) 17:0; (2) 18:0; (3) 18:1 4*t*; (4) 18:1 5*t*; (5) 18:1 6-8*t*; (6) 18:1 9*t*; (7) 18:1 10*t*; (8) 18:1 11*t*; (9) 18:1 12*t*; (10) 18:1 13-14*t*; (11) 18:1 15*t*; (12) 18:1 16*t*. Coluna CP Select CB-FAME (100 m x 0,25 mm x 0,25 μm) - Análise foi efetuada a 175 °C por 40 min.



**ANEXO IX:** Cromatograma dos ésteres metílicos do ácidos graxos 18:1 *cis*, provenientes de gordura parcialmente hidrogenada previamente fracionada por CCD/Ag<sup>+</sup>. (1) 18:0; (2) 18:1*t* (3) 18:1 6–8*c*; (4) 18:1 9*c*; (5) 18:1 10*c*; (6) 18:1 11*c*; (7) 18:1 12*c*; (8) 18:1 13*c*; (9) 18:1 14*c*; (10) 18:1 15*c*; (11) 18:1 16*c*. Coluna CP Select CB-FAME (100 m x 0,25 mm x 0,25 μm) - Análise foi efetuada a 175 °C por 40 min.



**ANEXO X:** Valores de comprimento equivalente de cadeia (ECL), calculados a partir do tempo de retenção corrigido de ésteres metílicos de ácidos graxos octadienóicos e octatrienóicos, *cis* e *trans*.

Ésteres de ácidos graxos	ECL/Temperatura (°C)			
	170	180	190	200
18:2 9 <i>t</i> ,12 <i>t</i>	18,793 ± 0,002	18,823 ± 0,001	18,855 ± 0,001	18,888 ± 0,001
18:2 9 <i>c</i> ,12 <i>t</i>	19,002 ± 0,001	19,050 ± 0,001	19,106 ± 0,002	19,161 ± 0,002
18:2 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i>	19,080 ± 0,001	19,130 ± 0,002	19,186 ± 0,001	19,240 ± 0,002
18:2 9 <i>c</i> ,12 <i>c</i>	19,167 ± 0,001	19,236 ± 0,002	19,310 ± 0,001	19,385 ± 0,001
18:3 9 <i>t</i> ,12 <i>t</i> ,15 <i>t</i>	19,392 ± 0,001	19,424 ± 0,001	19,460 ± 0,001	19,494 ± 0,001
18:3 9 <i>c</i> ,12 <i>t</i> ,15 <i>t</i>	19,599 ± 0,002	19,654 ± 0,002	19,713 ± 0,001	19,772 ± 0,001
18:3 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>t</i>	19,644 ± 0,001	19,701 ± 0,001	19,761 ± 0,001	19,824 ± 0,002
18:3 9 <i>t</i> ,12 <i>t</i> ,15 <i>c</i>	19,707 ± 0,001	19,759 ± 0,001	19,817 ± 0,002	19,878 ± 0,002
18:3 9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>t</i>	19,707 ± 0,001	19,789 ± 0,002	19,870 ± 0,001	19,952 ± 0,003
18:3 9 <i>c</i> ,12 <i>t</i> ,15 <i>c</i>	19,872 ± 0,002	19,952 ± 0,003	20,041 ± 0,002	20,136 ± 0,001
18:3 9 <i>t</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>c</i>	19,907 ± 0,002	19,981 ± 0,003	20,059 ± 0,002	20,136 ± 0,001
18:3 9 <i>c</i> ,12 <i>c</i> ,15 <i>c</i>	19,988 ± 0,002	20,082 ± 0,002	20,183 ± 0,002	20,288 ± 0,002

Os valores são médias de cinco determinações, acompanhados de seu desvio-padrão.

Coluna CP Select CB-FAME – (100 m x 0,25 mm x 0,25 µm)

## ANEXO XI

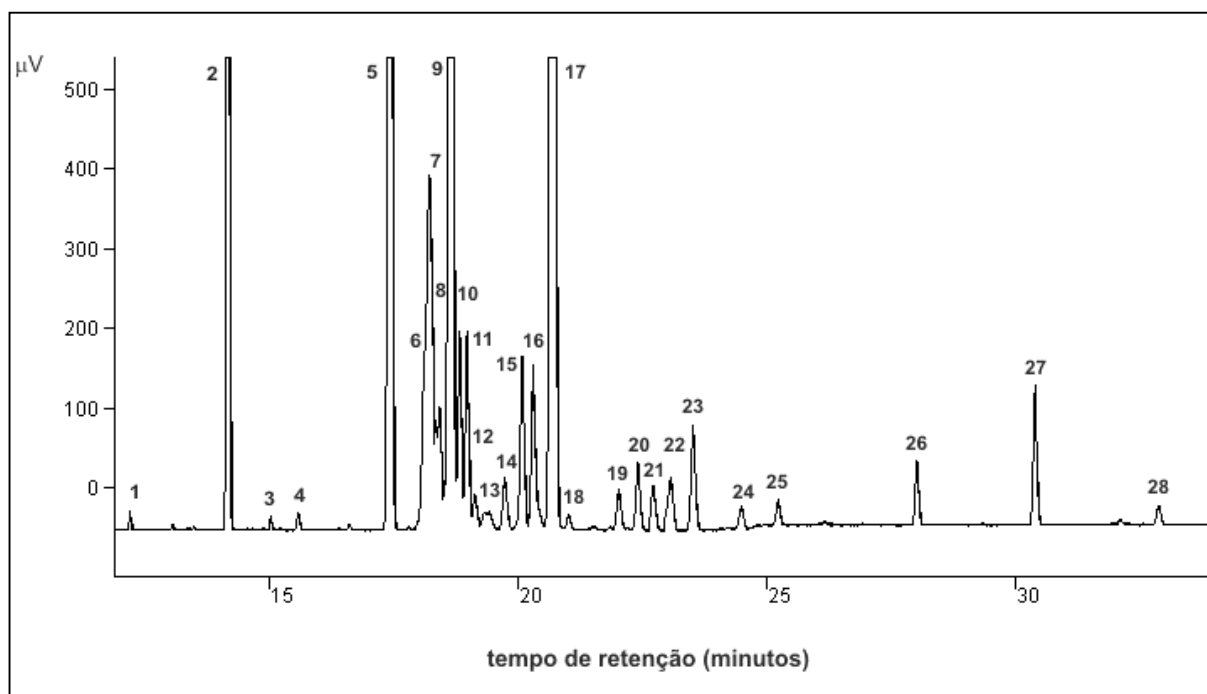
(a) Valores dos coeficientes angular, linear e de correlação, para as equações obtidas da análise de regressão linear dos valores de ECL relacionados no ANEXO X.

Ésteres de ácidos graxos	Parâmetros da regressão linear (ECL = a + bT)		
	a	b (10 <sup>-3</sup> )	r
18:2 9t,12t	18,253	3,170	0,9998
18:2 9c,12t	18,094	5,330	0,9994
18:2 9t,12c	18,167	5,360	0,9997
18:2 9c,12c	17,928	7,280	0,9998
18:3 9t,12t,15t	18,810	3,420	0,9998
18:3 9c,12t,15t	18,615	5,780	0,9999
18:3 9t,12c,15t	18,623	6,000	0,9998
18:3 9t,12t,15c	18,734	5,710	0,9994
18:3 9c,12c,15t	18,320	8,160	1,0000
18:3 9c,12t,15c	18,370	8,810	0,9993
18:3 9t,12c,15c	18,606	7,650	0,9999
18:3 9c,12c,15c	18,283	10,010	0,9997

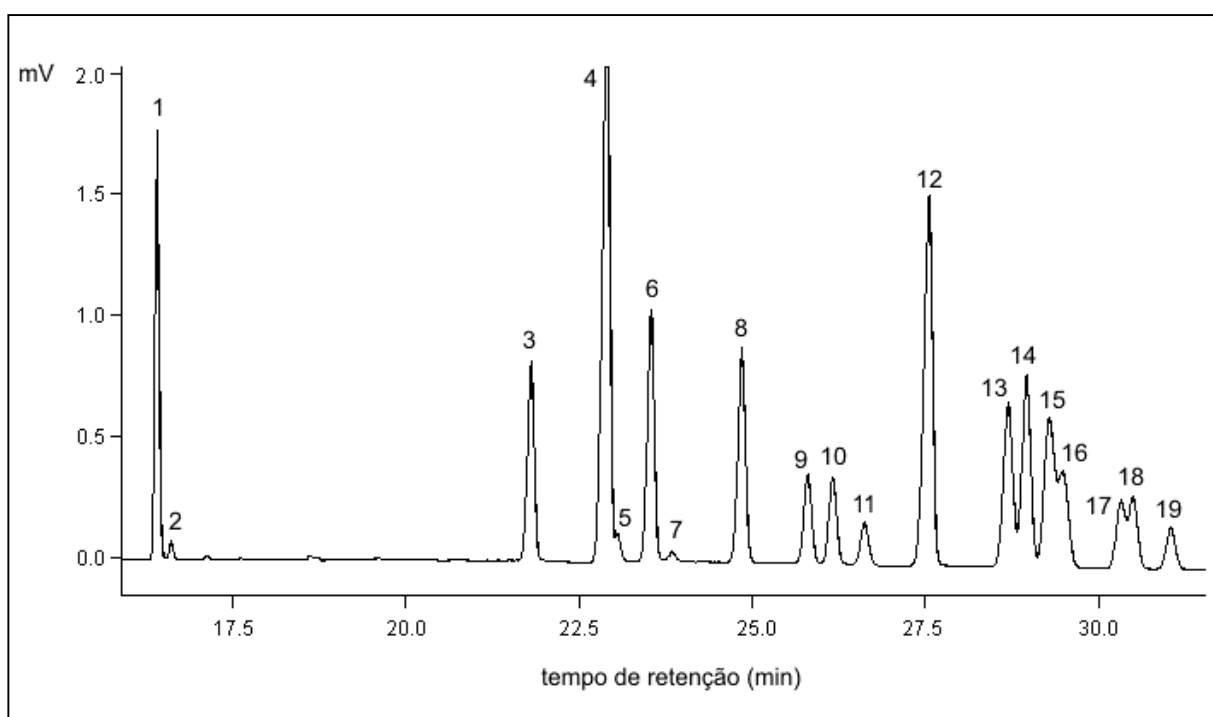
(b) Valores dos coeficientes angular, linear e de correlação, para as equações obtidas da análise de regressão linear dos valores de  $\Delta$ ECL.

$\Delta$ ECL	Parâmetros da regressão linear		
	a	b (10 <sup>-3</sup> )	r
(18:1 9c) – (18:1 13t)	- 0,318	2,027	0,9994
(18:3 9t,12c,15c) – (20:0)	-1,395	7,650	0,9999
(18:2 9c,12c) – (18:2 9t,12c)	- 0,240	1,920	0,9995
(20:0) – (18:3 9c,12c,15t)	1,680	- 8,160	-1,0000

**ANEXO XII:** Cromatograma dos ésteres metílicos de uma amostra de gordura parcialmente hidrogenada. (1) 14:0; (2) 16:0; (3) 16:1 9c; (4) 17:0; (5) 18:0; (6) 18:1 6-11t, (7) 18:1 12t, (8) 18:1 13t, (9) 18:1 9c + 18:1 15t, (10) 18:1 11c; (11) 18:1 12c; (12) 18:1 13c + 18:1 16t, (13) 18:1 14c + 18:15c; (14) 18:2 9t,12t, (15) 18:2 9c,12t, (16) 18:2 9t,12c; (17) 18:2 9c,12c; (18) não identificado; (19) 18:3 9t,12c,15t, (20) 18:3 9c,12c,15t, (21) 20:0; (22) 18:3 9t,12c,15c + 18:3 9c,12t,15c; (23) 18:3 9c,12c,15c; (24) 20:1 11c; (25) 20:2 11c, 14c; (26) 22:0; (27) 23:0 – padrão interno; (28) 24:0. Coluna CP Select CB-FAME (100 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m) - Análise foi efetuada a 197 °C por 23 min, sendo então elevada a 225 °C, a taxa de 20 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo por 15 min nesta temperatura.



**ANEXO XIII:** Cromatograma dos ésteres metílicos do óleo de linhaça isomerizado. (1) 16:0; (2) não identificado; (3) 18:0; (4) 18:1 9*t*; (5) 18:1 11*t*; (6) 18:1 9*c*; (7) 18:1 11*c*; (8) 18:2 9*t*,12*t*; (9) 18:2 9*c*,12*t*; (10) 18:2 9*t*,12*c*; (11) 18:2 9*c*,12*c*; (12) 18:3 9*t*,12*t*,15*t*; (13); 18:3 9*c*,12*t*,15*t*; (14) 18:3 9*t*,12*c*,15*t*; (15) 18:3 9*t*,12*t*,15*c*; (16) 18:3 9*c*,12*c*,15*t*; (17) 18:3 9*c*,12*t*,15*c*; (18) 18:3 9*t*,12*c*,15*c*; (19) 18:3 9*c*,12*c*,15*c*. Coluna CP Select CB - FAME (100 m x 0,25 mm x 0,25 μm) - Análise efetuada em 180 °C por 35 min.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)